



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

MARIA JULIANE PASSOS

**EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP-15) E DO
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE FOLÍCULOS OVARIANOS BOVINOS**

SOBRAL

2012

MARIA JULIANE PASSOS

**EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP-15) E DO
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE FOLÍCULOS OVARIANOS BOVINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

SOBRAL

2012

MARIA JULIANE PASSOS

**EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP-15) E DO
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE FOLÍCULOS OVARIANOS BOVINOS**

Aprovada em: 27/02/2012.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva - Examinadora
(Universidade Federal do Ceará- UFC)

Dra. Lúcia Helena Sider - Examinadora
(Embrapa Caprinos e Ovinos)

*À minha mãe, Maria José
Passos, por ser meu porto
seguro e me proporcionar a
mais pura forma de amor
Com todo o amor do mundo,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai misericordioso e de infinita bondade, a quem devo toda a força que me fez acreditar que eu era capaz, e nunca me deixou desistir. Obrigada meu Deus por sempre estar ao meu lado, me iluminando, me guiando, me protegendo e cuidando de mim, com sua bondade, e sempre me dando forças pra lutar. Tudo que sou devo a Ti.

À minha querida e amada mãezinha, minha borota Maria José Passos, meu maior exemplo de mulher, batalhadora e vencedora. Quem me ensinou a ser correta, quem me enche de amor e quem não canso de dizer: EU TE AMO. Você é o meu porto seguro, é por causa dos seus ensinamentos que hoje sou mais feliz. Obrigada por abrir mão dos seus sonhos para realizar os meus. Essa vitória é sua.

Ao meu amado Cleuton Monteiro, o “Keko”, um presente enviado pelo meu Senhor, por tudo que representa em minha vida. Pelo apoio incondicional durante toda essa caminhada, por sempre estar ao meu lado. Por entender meus momentos de ausência, acreditar em mim e sempre me olhar e dizer que ia dar tudo certo. Você sabe realmente como me fazer feliz. Seu amor é uma das bases da minha vida, meu príncipe, meu anjo *“Acredita em anjo? Pois é, eu sou o seu.”* Eu te amo.

Aos meus queridos irmãos Washington, Neyla, Alan e Ângelo, pelo amor e confiança dedicados a mim, por estarem sempre torcendo por mim, mesmo sem entender muito o que faço (risos) . Amo demais esses cabeções.

À minha família, a grande família Passos, meus tios, tias, primos por sempre acreditarem e torcerem por mim. Às minhas queridas cunhadas Nina e Cleomar, o meu mais sincero agradecimento. Amo cada um de vocês!

À minha princesinha Luanina, minha sobrinha tão amada, que enche meu coração de alegria somente pelo fato de existir. Você é a jóia rara da Tia Julinha. Cada gesto de carinho seu me faz transbordar de felicidade. Amo você minha Lua!

Ao meu orientador e “Pai Científico”, Dr. José Roberto Viana Silva, a quem devo toda a gratidão, por ter me iniciado na vida científica, pelo exemplo de Pesquisador e de pessoa, pelo seu caráter e profissionalismo. Por cada dia de orientação, cada palavra, cada artigo discutido, cada ensinamento e cada minuto de seu tempo dedicado a mim. Obrigada por ter acreditado em meu potencial.

À querida pesquisadora Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva, um exemplo de profissional a ser seguido, que me ensinou que não há vitória sem esforço e dedicação. Pelas palavras de apoio, incentivo, por me ensinar o caminho correto, e sempre dizer que sou capaz. Pela amizade, caráter, companheirismo e acima de tudo pelo seu profissionalismo. Não poderia deixar de agradecer também ao seu esposo o Dr. Vando, sempre disposto a ajudar. Obrigada por tudo que fizeram por mim.

Ao grande amigo Jackson Costa, a quem considero um irmão que Deus colocou na minha vida. Obrigada por todo o apoio e atenção, por está sempre ao meu lado, mesmo quando estava nas crises de “abuso”... Pelas inúmeras dúvidas esclarecidas, pelos momentos de descontração e por cada palavra amiga. Obrigada.

À minha amiga Gisvani Lopes, que com seu jeitinho único de ser conquistou para sempre um lugar no meu coração. Estamos juntas desde o começo desta caminhada, uma dando força a outra não é Gica? É muito bom poder compartilhar com você cada um desses momentos e olhar hoje e dizer: Nós conseguimos. Eu amo você amiga.

Ao meu amigo e “Neno” Anderson Weiny, com quem dividi todos os momentos de minha vida acadêmica, quando nos encontramos no primeiro dia de aula na graduação e tivemos a certeza que íamos ser amigos. E hoje chegamos aqui juntos. São muitos momentos felizes juntos Neno. E chegou o grande dia amigo, nós conseguimos! Amo você!

Não posso deixar de falar de uma pessoa que é o meu braço direito em tudo. Minha “secretária”, minha amiga Moêmia Portela, que nunca me deixa na mão. Tudo que eu precisar dela ela resolve. A quem eu tenho liberdade de brigar quando é preciso, aconselhar e ouvir dela palavras que sempre me confortam. Você é muito importante na minha vida.

À queridíssima e adorada Regislane Ribeiro, com quem sempre pude contar, e além de sua grande ajuda, sempre me proporcionou os momentos mais felizes no laboratório com seu jeito alegre de ser, e, que com seu esforço, como ela sempre diz será sim uma “pesquisadora renomada”. Muito obrigada.

Não poderia deixar de agradecer uma pessoa que esteve comigo desde a preparação para entrar no mestrado: Danielle Val. Obrigada pelas noites de estudo, pelo companheirismo de sempre, por cada momento feliz que passamos juntas, pela longas conversas e pela confiança.

À minha amiga Larisse Alves, minha “nêga”, que mesmo não estando sempre presente, sei que torce por mim sempre e que nossa amizade é eterna. Aquela que eu posso passar meses sem ver, porém, quando, nos encontramos, o brilho nos nossos olhos traduz o que é uma amizade.

Aos meus amigos lindos Jordânia Marques e Clayrtiano, por sua imensa amizade e apoio incondicional. Palavras são poucas para expressar o quanto “sou louca” por vocês. E obrigada por deixarem minha vida sempre mais feliz, e ainda mais agora com a chegada do nosso lindo e amado João Artur. Obrigada por tudo!

Aos meus grandes amigos, por serem tão especiais pra mim. O meu obrigada à Maikon Ferro, Hortência Mota, Lidiane Veras, Anna Adelaide, Cândido Inácio Eleones Filho, Nilson Martins, Najara, Carlos Alexandre e a pequena Ana Luiza “da titia”, que amo tanto, Sávio Cavalcante, Aderaldo Fontenele (Netinho), Leila Sabóia, Janiele Alcântara, Daniel Costa e Maríla por estarem sempre orando e acreditando em mim meus melhores!Agradeço também a alguém muito especial que passou pela minha vida, minha querida Fernanda (...sei que onde estiver estará olhando por mim amiga...), Abençoados são aqueles que possuem amigos. Eu posso me considerar assim... “*Amigos são testemunhas vivas de nossas vidas*”, e é por todos os momentos felizes que compartilhamos juntos que agradeço por existirem. Obrigada!

À minha equipe, minha “família cultivo”, meus queridos Renato Passos, Rodri; Rossi, Katianne Freitas, Taiã Gomes, Ellen Vasconcelos, Gleison Ribeiro, Diego Tavares, Glaucinete Borges e Karen dos Anjos por todo o companheirismo. O trabalho com vocês fica sempre melhor! Parte dessa vitória é de vocês! Às minhas queridas Cintia Guedes e Emanuela Rebouças, a quem sempre vou considerar parte de minha equipe. Saudade de vocês!

Aos funcionários da Faculdade de Medicina de Sobral pela convivência, atenção e disponibilidade durante todos esses anos. Agradeço especialmente as queridas Gade, Diná e Tia Fátima, por sempre estarem dispostas a cuidar de todos nós.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maranguape, por sua disponibilidade em nos ensinar e ajudar. Agradeço aos integrantes do Núcleo de Biotecnologia de Sobral, especialmente à amiga Amélia Araújo, simplesmente por sua amizade! Agradeço a toda equipe: João Garcia, Auxiliadora, Áurea, Nyanne, Raulzito, Tatiana, Aurilene, Jedson, Vitória e Cleane, pela ajuda de sempre.

Agradeço à Mariana Donato, a Mari, por toda a receptividade e apoio dispensado. Obrigada por tudo! À Dra. Christina Peixoto, a equipe do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), obrigada pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello pela disposição em ajudar na realização das estatísticas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da UFC, pelos ensinamentos repassados.

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

Aos integrantes da banca, agradeço pela participação e colaboração para o aprimoramento e enriquecimento deste trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do nosso projeto.

Aos meus colegas de mestrado, companheiros desta jornada, Flávio Evaristo, Manuela Almeida, Ellen de Vasconcelos, Ronaldo Farias, Nágila Carneiro, Gleiciane Queiroz, Robérth Fiúza, Daniel de Brito, Joseíres Fontenelle, Luciana de Castro e Nairley Sá.

À todos que mesmo não tendo sido citados, mas que direta ou indiretamente me incentivaram nessa jornada, pelo simples fato de torcer por mim, ou por quaisquer gesto de carinho e atenção, e por me fazerem acreditar cada vez mais que cada um de nós é do tamanho dos seus sonhos.

A cada um de vocês o meu mais sincero Muito Obrigada!

*“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é dele
a vitória alcançada em minha vida”.*
(Pe. Fábio de Melo)

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo 1) avaliar o efeito da BMP-15 e do FSH, sozinhos ou em diferentes associações sobre o crescimento, sobrevivência e formação de antro em folículos secundários bovinos e 2) avaliar os níveis de expressão do RNAm para os receptores de BMP-15 (BMPR-IB e BMPR-II) em folículos crescidos *in vitro*. Com relação ao cultivo, folículos secundários foram microdissecados e cultivados por doze dias em α -MEM⁺ sozinho, ou suplementado com BMP-15 e/ou FSH, sozinhos ou em diferentes associações. Após o cultivo, foram avaliados o diâmetro folicular, a viabilidade e a taxa de formação de antro. A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real, utilizando folículos cultivados nos diferentes tratamentos, para comparações dos níveis de RNAm. Após o período de cultivo verificou-se que a utilização da BMP+FSH (0-12) estimulou um aumento significativo no diâmetro folicular em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), bem como estimulou a formação da cavidade antral de forma mais efetiva que o controle (MEM) e a BMP-15 sozinha ($p < 0,05$). No entanto, em relação à sobrevivência, após 12 dias o tratamento BMP+FSH (0-12) reduziu significativamente a viabilidade folicular em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que os níveis de RNAm para o receptor de BMP-15 do tipo I (BMPR-IB) foram significativamente maiores nos folículos cultivados com MEM quando comparado aos demais tratamentos, enquanto que os níveis de RNAm para o receptor do tipo II (BMPR-II) não diferiram entre os tratamentos. Os maiores níveis de RNAm para o receptor de FSH foram detectados em folículos cultivados com BMP-15 sozinha. Em conclusão, este estudo demonstrou que a combinação de BMP-15 + FSH durante todo o período de cultivo (D0-D12) acelera o crescimento de folículos pré-antrais bovinos cultivados por 12 dias, mas este efeito reduz a viabilidade folicular, afetando a integridade ultra-estrutural dos folículos. Além disso, a adição de BMP isoladamente aumentou os níveis de expressão de RNAm para FSHR após 12 dias de cultivo, mostrando que BMP-15 e FSH podem contribuir significativamente para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais cultivados por 12 dias nesta espécie.

Palavras-chave: bovinos, folículos ovarianos, RNAm, BMP-15

ABSTRACT

This study aims to 1) evaluate the effect of BMP-15 and FSH, alone or in different combinations on the *in vitro* development, survival and antrum formation of bovine secondary follicles and 2) quantify the levels of mRNA expression for BMP-15 receptors (BMPR-IB and BMPR-II), FSH receptor and Kit Ligand in follicles grown *in vivo* and *in vitro*. With regard to culture, secondary follicles were microdissected and cultured for twelve days in α -MEM+ alone, or supplemented with BMP-15 and/or FSH, alone or in various associations. After culture, follicular diameter were evaluated, viability and rate of antrum formation. For the analyzes gene expression, by real time PCR, were used follicles cultured in the different treatments for comparisons of the levels of mRNA. After the culture period it was found that the association of BMP+FSH (0-12) stimulated a significant increase in follicular diameter in relation to other treatments ($p < 0.05$), as well as stimulated the formation of antral cavity more effectively the control (MEM) and BMP-15 alone ($p < 0.05$). However, for survival, after 12 days treatment BMP+FSH (0-12) significantly reduced follicular viability when compared to other treatments ($p < 0.05$). The results showed that the levels of mRNA for BMP receptor type I (BMPR-IB) were significantly higher in follicles cultured with MEM when compared to other treatments, while levels of mRNA for the receptor type II (BMPR-II) did not differ between treatments. The highest levels of mRNA for the FSH receptor were detected in follicles cultured with BMP-15 alone. In conclusion, this study demonstrated that combination of BMP-15+FSH (D0-D12) accelerates the growth of bovine preantral follicles cultured for 12 days, but this effect reduces the follicular viability, affecting the ultrastructural integrity of the follicles. Furthermore, the addition of BMP alone increased expression levels of RNAm for FSHR after 12 days of culture , showing that BMP-15 and FSH may contribute significantly to the *in vitro* development of preantral follicles cultured for 12 days in this specie.

Keywords: bovines, ovarian follicles, mRNA, BMP-15

LISTA DE TABELAS

Artigo 1: Effect of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) on development of bovine ovarian follicles

Tabela 1 - Primer pairs used in real-time PCR for quantification of BMP-15, their receptors and proteins of follicular fluid in cultured bovine follicles	64
Tabela 2 - Follicular diameters (mean \pm SD) of bovine follicles cultured <i>in vitro</i> for 12 days in different treatments	65
Tabela 3 - Percentage of survival of bovine follicles cultured for 12 days and different treatments.....	66

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Possíveis destinos dos folículos primordiais após sua formação..... 25

Figura 2- Via de sinalização celular da BMP-15, seus receptores do tipo I e II (BMP-IB e BMP-II) e os mensageiros intracelulares (SMADS 1, 5, 8 e 4)..... 38

ARTIGO 1: Effect of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) on development of bovine ovarian follicles

Figure 1- Viability assessment of bovine preantral follicles cultured using fluorescent probes (A, B: MEM); (C, D: BMP-15); (E, F: FSH); (G, H: BMP-15 + FSH-D0 a D12); (I, J: BMP-15 + FSH- D6 a D12)..... 67

Figure 2 - Ultrastructural analysis from bovine follicles cultured for 12 days in MEM alone (A and B), supplemented with BMP-15 (C and D) or BMP-15 + FSH (D0-D12) (E and F)..... 68

Figure 3- Relative expression of mRNA for BMP-IB (A), BMP-II (B), FSH-R (C), in bovine follicles cultured for 12 days in MEM, FSH, BMP-15, BMP-15+FSH (D0-D12) or BMP-15+FSH (D6-D12)..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AKT	: Proteína kinase
ALK-2	: do inglês, activin receptor-like kinase type 2
ALK-6	: do inglês, activin receptor-like kinase type 6
Bcl – 2	: do inglês, B-cell lymphoma 2
BLIMP-1	: Proteína de maturação indutora de linfócitos B
BMP	: Proteína Morfogenética Óssea
BMP-15	: Proteína Morfogenética Óssea 15
BMP-4	: Proteína Morfogenética Óssea 4
BMPR	: Receptor para Proteína Morfogenética Óssea
BMPR- IB	: Receptor para Proteína Morfogenética Óssea tipo I-B
BMPR-II	: Receptor para Proteína Morfogenética Óssea tipo II
BSA	: Albumina sérica bovina
cAMP	: Adenosina – 3', 5' – monofosfato cíclico
cDNA	: Ácido desoxirribonucleico complementar
CGPs	: Células Germinativas Primordiais
c-Kit	: Receptor para kit ligand
CO ₂	: Dióxido de carbono
CT	: Cycle threshold
CYP19	: Aromatase CYP19
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
dNTP	: Desoxirribonucleotídeo
DTT	: Dithiothreitol (Ditiotreitol)
EGF	: Fator de Crescimento Epidermal
FGF	: Fator de Crescimento Fibroblástico
FGF – 2	: Fator de Crescimento Fibroblástico 2
FGFR	: Receptor para Fator de Crescimento Fibroblástico
<i>Fig a</i>	: Fator de linha germinal alfa
FIV	: Fertilização <i>in vitro</i>

FOP	: Falha ovariana pré-matura
FOPA	: Folículo ovariano pré-antral
FOXO3	: Forkhead transcription factor
FSH	: Hormônio Folículo Estimulante
FSH-R	: Receptor para o Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	: Fator de Crescimento e Diferenciação-9
GH	: Hormônio do Crescimento
GH-R	: Receptor para o Hormônio do Crescimento
GnRH	: Hormônio liberador de gonadotrofina
HAS2	: Ácido hialurônico sintetase
IGF	: Hormônio Semelhante à Insulina
IGF – I	: Fator de crescimento semelhante à Insulina – I
IGF – II	: Fator de crescimento semelhante à Insulina II
IGFBPs	: Proteínas de ligação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina – I
ITS	: Insulina, transferrina e selênio
kDa	: Quilodalton
KL	: Kit ligand
LAMOFOPA	: Laboratório de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais
LH	: Hormônio Luteinizante
LH-R	: Receptor para o Hormônio Luteinizante
MEM	: Meio essencial mínimo
MET	: Microscopia eletrônica de transmissão
mL	: Mililitro
mM	: Micromolar
mm	: Milímetro
MOIFOPA	: Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais
mTOR	: Mammalian target of rapamycin (Alvo da rapamicina em mamíferos)
Nanog	: Homeobox protein NANOG
Ng	: Nanograma
°C	: Graus Celcius

Oct4	: Octamer-binding transcription factor 4
OPU	: Ovum pick up
P<0.05	: Probabilidade menor do que 5%
P450scc	: Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
PCNA	: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCOS	: Síndrome de Ovários Policísticos
PCR	: Reação em cadeia da polimerase
Pou5f1	: POU domain, class 5, transcription factor 1
PRDM1	: Domain zinc finger protein 1
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-quinase
PTEN	: Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10
qRT-PCR	: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
rFSH	: FSH recombinante
R-FSH	: Receptor para o hormônio folículo estimulante
RNA	: Ácido ribonucléico
RNAm	: Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	: Transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase
S	: Senso
S.E.M	: Erro padrão da média
SAS	: Statistical Analysis System (Sistema de análises estatísticas)
SCF	: Fator de células tronco
SMADs	: Mensageiros intracelulares
Sox2	: SRY (sex determining region Y)-box
StAR	: Proteína reguladora da estereidogênese aguda
Stra8	: Gene Estimulado pelo ácido retinoico
TE	: Transferência de Embrião
TGF – β	: Superfamília de fatores de crescimento transformante beta
TSC1	: Proteína 1 de Esclerose Tuberosa
TSC2	: Proteína 2 de Esclerose Tuberosa
UBQ	: Ubiquitina

VEGF	: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VIP	: Peptídeo Intestinal Vasoativo
ZP - 1, -2, -3	: Zona pelúcida -1, -2, -3
3 β - HSD	: 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ -5-4 isomerase
μ L	: Microlitro
μ M	: Micrômetro
%	: Percentagem
\pm SD	: Mais ou menos o desvio padrão
μ g	: Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Origem e formação dos folículos primordiais.....	22
2.2. Ativação dos folículos primordiais.....	24
2.3. Crescimento de folículos primários e secundários.....	27
<i>2.3.1. Formação da teca.....</i>	<i>29</i>
<i>2.3.2. Formação do antro.....</i>	<i>31</i>
2.4. Crescimento de folículos antrais.....	32
2.5. Atresia.....	34
2.6. Sistema de cultivo e técnicas de avaliação do crescimento folicular.....	35
2.7. Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15).....	36
2.8. Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	39
2.9. Técnicas para avaliação da eficiência do cultivo <i>in vitro</i>.....	41
3. PROBLEMAS E HIPÓTESES.....	43
4. JUSTIFICATIVA.....	44
5. OBJETIVOS.....	46
5.1. Gerais.....	46
5.2. Específicos.....	46
6. ARTIGO 1: Effect of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) on development of bovine ovarian follicles.....	47
7. CONCLUSÕES.....	70
8. PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

O ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais, que correspondem ao pool de reserva de gametas femininos correspondendo a 90% de toda a população folicular. Apesar do grande número de gametas presentes no ovário, e de estes serem potencialmente fertilizáveis, a eficiência deste órgão ainda é considerada relativamente baixa, pois a maioria dos folículos morre por um processo natural conhecido por atresia folicular. Visando aumentar a eficiência reprodutiva das fêmeas, grandes avanços têm sido alcançados com a aplicação de biotécnicas reprodutivas, tais como a punção oocitária guiada por ultrassom (OPU), fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE). Entretanto, todas essas técnicas utilizam folículos em sua fase final de desenvolvimento, pois, somente oócitos provenientes de folículos antrais, que representam apenas 10% da população folicular ovariana são utilizados. Isto de fato, reduz o aproveitamento do potencial reprodutivo feminino e deixa muito clara a necessidade de se elucidar os complexos mecanismos que regulam a foliculogênese em sua fase inicial, ou pré-antral. Dessa forma, o conhecimento da fisiologia ovariana é fundamental para o desenvolvimento de estratégias para se reduzir as grandes perdas oocitárias que ocorrem naturalmente *in vivo*, bem como para promover o melhoramento genético e aumento da produtividade animal.

Diferentes técnicas vêm sendo empregadas com o intuito de compreender os processos relacionados com a formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos, e posteriormente melhorar o aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas mamíferas. Dentre as técnicas em desenvolvimento, tem se destacado o isolamento e o cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (primordiais, primários e secundários). Considerando que milhares de folículos pré-antrais podem ser isolados de um ovário (De BEM *et al.*, 1997), o cultivo dos folículos *in vitro* até sua completa maturação contribui não apenas para incrementar a produção *in vitro* de embriões, mas especialmente para a compreensão da atuação dos fatores que controlam a foliculogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Até o momento, sabe-se que o crescimento folicular é regulado por gonadotrofinas e por fatores intra-ovarianos (FORTUNE, 2003). As gonadotrofinas, como o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), são indispensáveis para o desenvolvimento de folículos antrais, porém seu papel sobre a foliculogênese inicial ainda não está bem elucidado (FORTUNE, 2003). Além disso, fatores de crescimento de crescimento produzidos pelo oócito e células da granulosa/teca, frequentemente atuam modulando os efeitos desses hormônios, de modo que a foliculogênese pode ser afetada quando um único desses fatores está ausente (THOMAS *et al.*, 2005). Dentre tais fatores, pode ser destacada a Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15), que possui um papel crítico na regulação da foliculogênese mamífera, estando envolvida em diferentes eventos tais como, proliferação das células da granulosa e da teca, atresia e esteroidogênese (WU *et al.*, 2007). Estudos com análises de expressão gênica detectaram o RNAm para esta proteína em todas as categorias de folículos caprinos (SILVA *et al.*, 2004a). Desta forma, a realização de estudos *in vitro* para avaliar o efeito de tais substâncias poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos componentes implicados na foliculogênese e no processo de atresia folicular. Para um melhor entendimento da importância deste trabalho, segue uma breve revisão de literatura onde serão abordados aspectos relacionados à oogênese, foliculogênese e atresia, BMP-15, FSH, cultivo *in vitro* e técnicas de análises utilizadas após o cultivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e formação dos folículos ovarianos

O ovário é um dos órgãos mais importantes do sistema reprodutivo das fêmeas, pois além de ser responsável pela síntese e liberação de um oócito maturo apto a ser fertilizado, produz uma série de substâncias responsáveis pela ciclicidade e manutenção de todo o trato reprodutivo. Em mamíferos, as gônadas indiferenciadas surgem como um espessamento do epitélio celômico na superfície ventrolateral do mesonéfron. As células germinativas primordiais (CGPs) migram do saco vitelino através de diferentes tecidos para colonizar as gônadas primitivas (GUIGON & MAGRE, 2006).

Durante o período de pré-gastrulação, linhagens somáticas de células do epiblasto começam a ser determinadas para iniciarem o processo de diferenciação em células germinativas primordiais. Isso ocorre em algumas células localizadas na região posterior do epiblasto que recebe influência da Proteína Morfogenética Óssea 4, BMP-4 e expressam o fator de transcrição “BLIMP-1”, também conhecido por PRDM1, que é responsável por estimular modificações nas células embrionárias que irão se diferenciar em CGPs.

Segundo LAWSON *et al.*, (1999), a BMP-4 também é capaz de promover a proliferação das CGPs. Ao mesmo tempo, genes de pluripotencialidade como Oct4, Nanog e Sox2 são reativados nas CGPs que estão localizadas no mesoderma extra-embriônico da parede do saco vitelínico, antes de começar a migração para as cristas gonadais (OHINATA *et al.*, 2009). A migração de CGPs do epitélio do saco vitelino, através do intestino posterior embrionário, para, eventualmente, colonizar a crista gonadal é controlada e dirigida pela secreção de citocinas e fatores de crescimento, como o Kit Ligand(KL) (MOLYNEAUX & WYLIE, 2004; KUNWAR *et al.*, 2006). Chegando à gônada primitiva, as CGPs formam os cordões sexuais, perdem a habilidade migratória e passam a se multiplicar pelo processo de mitose. A partir de então, as CGPs restantes se diferenciam formando as oogônias. No entanto, para controlar o número de folículos primordiais que serão formados, grande parte destas células germinativas primordiais morre por apoptose (JUENGEL *et al.*, 2002; SAWYER *et al.*, 2002). As oogônias, por sua vez, passarão

novamente por sucessivas mitoses, com citocinese incompleta, o que deixa as células-filhas ligadas por pontes intercelulares. Pelo fato da citocinese ser incompleta durante estas divisões celulares, as oogônias organizam-se em forma de ninhos de células conectadas, e a maioria das células germinativas nestes ninhos se divide de forma sincrônica (PEPLING *et al.*, 1998). Essas oogônias formadas são marcadas pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno, preparando a célula para divisão meiótica. O ácido retinóico, proveniente das células do mesonéfron atua regulando o início da meiose e a posterior diferenciação das oogônias em oócitos primários (ANDERSON *et al.*, 2008). Em seguida, os oócitos perdem suas pontes intercelulares e são circundados por uma camada de células da pré-granulosa, as quais podem ser derivadas do mesonéfron ou do epitélio da superfície ovariana (McNATTY *et al.*, 2000). Uma vez que o oócito é circundado pelas células somáticas, ocorre uma parada da meiose no estágio de diplóteno da prófase I, também conhecido como estágio de vesícula germinativa (BAKER &FRANCHI, 1967; PICTON *et al.*, 1998), no qual as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência (SAWYER *et al.*, 2002), formando os folículos primordiais e dando início à foliculogênese.

O oócito irá permanecer no estágio de diplóteno até a puberdade, quando um pico de Hormônio Luteinizante (LH) será o estímulo para que a meiose seja retomada, passando pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário. Inicia-se a seguir a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II. Nesta fase ocorrerá a segunda interrupção da meiose, que só será retomada quando ocorrer à fecundação do oócito pelo espermatozóide (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Diversos genes são reguladores chave no desenvolvimento inicial das CGPs, por exemplo, o Kit Ligant e seu receptor c-Kit, que estão diretamente relacionados com os processos de migração, proliferação e/ou sobrevivência destas CGPs (GU *et al.*, 2009). Esta ação ocorre presumivelmente através da via de sinalização AKT/mTOR/BAX (DE MIGUEL *et al.*, 2002, STALLOCK *et al.*, 2003, RUNYAN *et al.*, 2006). Conforme citado anteriormente, o ácido retinóico exerce um papel fundamental na regulação da meiose, e esta ação se dá em resposta a ativação do Gene Estimulado pelo Ácido Retinóico 8 (Stra8).

ANDERSON *et al.*, (2008) e WANG & ROY (2009) demonstraram que durante a formação dos folículos primordiais ocorre um aumento da expressão para os receptores de BMPs, e esta expressão é regulada pela ação do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), havendo uma relação positiva entre este hormônio e as três formas de receptores de BMP (BMPR). Esses resultados sugeriram a primeira evidência da expressão dos receptores de BMPs e um possível papel do FSH na expressão do receptor durante esta fase crítica de morfogênese folicular. Associado a isso, foi relatado também que o FSH regula a expressão do Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9), dos receptores de estrógeno e das BMPs, desempenhando um papel essencial durante a formação do primeiro grupo de folículos primordiais. O FSH pode atuar ainda regulando a ação de E-caderina e N-caderina, importantes glicoproteínas do tipo transmembranárias que possuem um relevante papel na formação dos folículos primordiais (WANG & ROY, 2010). Outros estudos têm revelado que o Fator de Transcrição em Linhagem Germinativa Alfa (Fig α ou Figla), expresso no oócito, parece ter um papel importante na formação de folículos primordiais (SOYAL *et al.*, 2000).

Em camundongas, a primeira etapa da foliculogênese se dá imediatamente após o nascimento (McNATTY *et al.*, 2000). Já em bovinos, a formação dos folículos primordiais tem início durante o desenvolvimento fetal (OHINATA *et al.*, 2005). Nesta espécie, a presença dos primeiros folículos primordiais foi observada aos 90 dias de gestação (YANG & FORTUNE, 2008).

2.2. Ativação dos folículos primordiais

A duração da fertilidade das fêmeas mamíferas é determinada pelo tamanho do *pool* de folículos primordiais iniciais e pela sua taxa de ativação (EDSON *et al.*, 2009). Após a formação, alguns folículos primordiais podem ser estimulados a crescer imediatamente ou, na maioria destes, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram em um período de quiescência até receberem sinais para entrar no *pool* de folículos em crescimento (McGHEE & HSUEH, 2000).

Essa fase de quiescência ou dormência dos folículos primordiais é essencial para a manutenção da sobrevivência dos folículos, uma vez que este fenômeno impede o esgotamento dos folículos primordiais por ativação precoce e/ou a morte folicular (REDDY, 2008). Estudos recentes têm revelado a atuação de diferentes moléculas responsáveis por esta manutenção da quiescência na foliculogênese inicial, incluindo os genes supressores de tumor PTEN, TSC1 e TSC2, o fator de transcrição FOXO3a e pela sobrevivência folicular, como a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (REDDY, *et al.*, 2010). Assim, um folículo primordial formado poderá ter três destinos: 1) permanecer em quiescência; 2) ser ativado e estimulado a se desenvolver até folículo pré-ovulatório; 3) sofrer atresia antes mesmo de ser ativado (Figura 1).

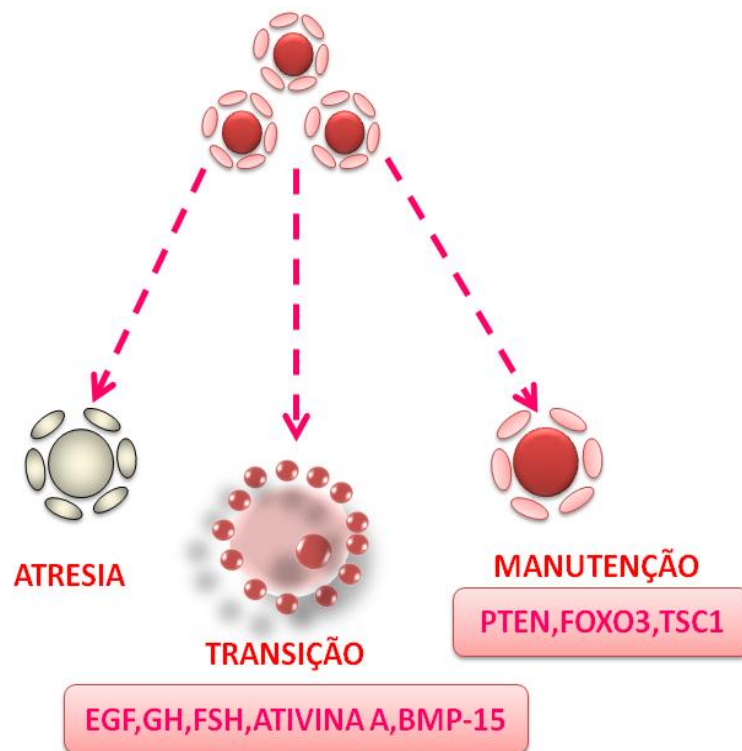


Figura 1: Possíveis destinos dos folículos primordiais após sua formação: atresia folicular, transição para a fase de crescimento ou manutenção no estágio primordial.

A ativação dos folículos primordiais é um processo complexamente regulado e seus mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente elucidados (ADHIKARI & LIU, 2009), podendo ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A principal característica da ativação folicular é o rápido crescimento do oócito incluso no folículo primordial associado às mudanças na morfologia das células da pré-granulosa que passam de pavimentosas a cúbicas (EDSON *et al.*, 2009). Durante esta fase, os folículos que apresentam células da granulosa pavimentosas e cúbicas são denominados folículos de transição (SILVA *et al.*, 2004a). Quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos são denominados primários (GOUGEON & BUSSO, 2000).

A comunicação bidirecional entre oócitos e células somáticas desempenha um papel importante no processo de ativação. O crescimento do oócito depende do suporte de fatores de crescimento e nutrientes secretados pelas células da granulosa. Ao mesmo tempo, os oócitos não são simplesmente receptores passivos, em vez disso, eles têm um papel essencial no controle da proliferação e diferenciação das células da granulosa durante o desenvolvimento dos folículos (SAGA, 2008). Em ratas, durante a ativação folicular e início do desenvolvimento, o oócito cresce rapidamente evidenciando um aumento de quase 300 vezes no volume durante 2 a 3 semanas de fase de crescimento. Esta etapa também é acompanhada por um aumento de 300 vezes nos níveis de RNA e um aumento de 38 vezes na taxa absoluta de síntese protéica, sugerindo que durante o crescimento oocitário ocorre uma intensa atividade metabólica (ADHIKARI & LIU, 2009).

Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais são pouco conhecidos. Acredita-se que a ativação dos folículos primordiais seja regulada por um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios originários do ovário (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Na espécie caprina, diversos estudos já foram realizados com folículos primordiais com o objetivo de se avaliar o papel de diferentes fatores de crescimento na foliculogênese inicial. Estes estudos demonstraram que o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), o Kit Ligand, o GDF-9, o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do tipo I (IGF-I), o Hormônio do Crescimento (GH) e o FSH, bem como a interação do FSH com a progesterona, do Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e do Fator de

Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), (CELESTINO *et al.*, 2009; CELESTINO *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2009; BRUNO *et al.*, 2009; BRUNO *et al.*, 2010; LIMA-VERDE *et al.*, 2010) promovem a ativação folicular aumentando as taxas de folículos em estágio de transição.

Em bovinos, já foi demonstrado que a testosterona estimula o desenvolvimento folicular inicial, promovendo a ativação dos folículos primordiais (YANG & FORTUNE, 2006). A ativina-A é outro fator que tem sido associado a ativação de folículos primordiais e crescimento oocitário em bovinos (McLAUGHLIN & TELFER, 2010). No tocante a BMP-15, por este fator de crescimento está presente em folículos primordiais de algumas espécies evidencia-se que tenha um papel importante na ativação folicular (OTSUKA *et al.*, 2000), sendo expressa em todas as categorias foliculares na espécie caprina (SILVA *et al.*, 2004a).

2.3. Crescimento de folículos primários e secundários

Os folículos primários apresentam um oócito imaturo circundado por uma camada de células da granulosa de forma cuboidal, enquanto que os folículos secundários tem um oócito também imaturo cercado por duas ou mais camadas de células da granulosa. Em geral, o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos exige uma série de eventos coordenados que induzem alterações morfológicas e funcionais no folículo, levando a diferenciação celular e ao desenvolvimento do oócito. Durante o desenvolvimento folicular pré-antral há um aumento progressivo do número de organelas, formação dos grânulos corticais e desenvolvimento das junções tipo *gap* entre o oócito e as células da granulosa (CURCIO, 2005). Em folículos primários, as proteínas que irão formar a zona pelúcida (ZP) já começam a ser sintetizadas e esta estrutura aparece primeiramente ao redor do oócito de folículo primário, como ilhas de material fibrilar situadas em espaços entre as células da granulosa adjacentes e a superfície do oócito (LEE, 2000). A ZP é uma matriz extracelular, composta de três glicoproteínas chamadas de ZP1, ZP2 e ZP3. No entanto, a visualização completa da zona pelúcida é possível apenas em folículos a partir do estágio de secundário (RANKIN *et al.*, 2001). Essa matriz circunda o oócito e tem um papel

importante para a sobrevivência de oócitos em crescimento, contribuindo para o sucesso da fecundação e para a passagem do embrião através do oviduto.

A partir do estágio primário, o crescimento e desenvolvimento dos folículos irá envolver uma série de eventos distintos, como o alargamento do oócito e a proliferação das células da granulosa para formar um tecido de múltiplas camadas. Concomitantemente a essa intensa proliferação das células da granulosa, é evidenciada também a expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) (WANDJI *et al.*, 1997). Além destes eventos, há ainda a condensação das células do estroma em torno da lâmina basal para formar uma camada de células da teca.

O desenvolvimento dos folículos primários parece ser regulado por alguns fatores de crescimento, tais como o Fator de Células Tronco (SCF) ou Kit Ligand (KL). A interação entre o KL e seu receptor tirosina quinase, o c-Kit, parece ter uma papel crítico nesta etapa, pois acredita-se que o KL induz a secreção de mitógenos oocitários responsáveis pelo início da proliferação das células da granulosa (OTSUKA & SHIMASAKI, 2002a; OTSUKA & SHIMASAKI, 2002b; EDSON *et al.*, 2009). Já foi confirmado ainda que, durante a transição de folículos primários para secundários, o KL apresenta um aumento de sua expressão, demonstrando que este fator é importante para o crescimento de folículos primários (CELESTINO *et al.*, 2010).

Quando duas ou mais camadas de células da granulosa se formam ao redor do oócito, o folículo encontra-se no estágio de secundário. Nesta fase, ocorre a diferenciação das células do estroma em células da teca, sendo possível a visualização da zona pelúcida em torno do oócito (FORTUNE, 2003). Na espécie bovina os folículos secundários possuem um diâmetro que varia de 81µm a 250 µm (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997).

É evidenciado nesta categoria folicular um acréscimo no número de junções do tipo *gap* entre o oócito e as células da granulosa. Essas junções atuam na comunicação bidirecional, através da transferência de nutrientes, metabólitos, fatores de estimulação e/ou inibição da meiose, além de fatores de crescimento, neurotrofinas e hormônios (FORTUNE, 2003; SENEDA & BORDIGNON, 2007). O FSH é um fator predominante na sobrevivência folicular, tendo sido demonstrado como um fator estimulador da formação destas junções comunicantes nas células da granulosa (VAN DEN HURK *et al.*, 2000),

atuando após sua ligação à receptores específicos encontrados nas células da granulosa de folículos, desde o estágio de folículos primários. Apesar de serem responsivos às gonadotrofinas, os folículos secundários podem desenvolver-se até o estágio antral com uma quantidade mínima de FSH circulante (VAN DEN HURK *et al.*, 2000; McGEE & HSUEH, 2000).

Ao final do estágio secundário, a ação gonadotrófica é mais intensa, pois já é observado um aumento no número de receptores de FSH nas células da granulosa, amplificando a ação desta gonadotrofina (VAN DEN HURK *et al.*, 2000). Aliado a isto, os receptores para o Hormônio Luteinizante (LH) são sintetizados nas células da teca, sendo iniciada a síntese de andrógenos que subsequentemente serão convertidos em estrógenos, através da ação da enzima aromatase presente nas células da granulosa (BUCCIONE *et al.*, 1990; SENEDA & BORDIGNON, 2007).

2.3.1. Formação da teca

As células da teca são observadas pela primeira vez quando o folículo já possui duas ou mais camadas de células da granulosa (MAGOFFIN & WEITSMAN, 1994). Durante o desenvolvimento dos folículos, quando o espessamento da zona pelúcida torna-se visível (LUCCI *et al.*, 2001) ocorre a formação das células da teca a partir do estroma intersticial. Tem sido proposto que estas células especializadas se originam a partir de células precursoras semelhantes a fibroblastos encontradas no estroma ovariano (HONDA *et al.*, 2007).

Os fatores de crescimento GDF-9 e BMP-15, ambos secretados pelo oócito, além de promoverem a proliferação das células da granulosa, também atuam na formação das células da teca (KNIGHT & GLISTER, 2006). A detecção do receptor c-Kit em células da teca e a expressão aumentada do KL no momento da formação da camada da teca sugere um papel importante deste fator de crescimento também na diferenciação de células do estroma em células da teca (PARROT & SKINNER, 2000). Além disso, o Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) tem sido descrito como importante na formação das células da teca, uma vez que altos níveis deste fator foram detectados em folículos

secundários bovinos no momento do desenvolvimento das camadas tecais (BERISHA *et al.*, 2000; BURATINI *et al.*, 2005).

As células da granulosa e as células da teca começam a interagir durante as fases iniciais da foliculogênese através da sinalização célula-célula, que é mediada principalmente por fatores parácrinos locais e mecanismos justácrinos (SKINNER, 2005). No ovário, interações celulares entre a teca e a granulosa, a teca e o oócito são essenciais para controlar a diferenciação e a proliferação das células foliculares, permitindo o crescimento do oócito e diferenciação final. Essas interações entre as células da granulosa e da teca são necessárias para a biossíntese de estrógeno (BONNET *et al.*, 2008).

Com o crescimento e desenvolvimento dos folículos secundários há conseqüentemente um aumento no número de camadas tecais, ocorrendo uma diferenciação celular. Aquelas células localizadas próximas à membrana basal são denominadas teca interna, enquanto que as células localizadas periféricamente são classificadas como teca externa. Além disso, ocorre a formação de uma extensiva rede de junções do tipo *gap*, que são canais membranários que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundo mensageiros e pequenos metabólitos entre as células (KIDDER & MHAWI, 2002). A formação da camada da teca possibilita também a ocorrência da neoangiogênese, ou formação de vasos sanguíneos. Esse aumento da vascularização folicular e da permeabilidade sanguínea é importante para o fornecimento de fatores endócrinos e para a manutenção da sobrevivência folicular, além de estar relacionado com a posterior formação de antro (SMITZ & CORTVRINDT, 2002; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

As células da teca, mesmo não sendo capazes de produzir estrogênios, produzem andrógenos e agem em interação com as células da granulosa, que por sua vez irão converter estes andrógenos em estrógenos, pela ação da aromatase presente nas células da granulosa adjacentes de folículos em crescimento. Esses estrogênios recém-sintetizados, por sua vez, protegem o folículo dominante da atresia, sendo fundamentais para a sobrevivência dos folículos antrais (YOUNG & McNEILLY, 2010).

2.3.2. Formação de Antro

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A cavidade antral é preenchida por um líquido, denominado de fluido folicular, derivado principalmente do plasma sanguíneo que flui através dos capilares da teca (HERRMANN & SPANEL-BOROWSKI, 1998).

Embora alguns dos mecanismos de desenvolvimento da cavidade antral sejam conhecidos, os sinais iniciais para formação do antro ainda não foram plenamente elucidados (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O fluido folicular é composto basicamente por água, eletrólitos, proteínas séricas, uma alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT *et al.*, 2006), além de moléculas que contribuem para o potencial osmótico na cavidade antral, como os glicosaminoglicanos, tais como o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina e o sulfato de dermatano. Durante o desenvolvimento do folículo, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do tamanho folicular (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Com o aumento do grau de vascularização do folículo, na camada tecal e no início da formação antral, ocorre um acúmulo de líquido folicular. Moléculas com peso molecular inferior a 100kDa atravessam a membrana basal aumentando a pressão osmótica no interior do folículo, estimulando a entrada de água, iniciando a formação do fluido (RODGERS & IRVING-RODGERS, 2010). As células da granulosa também estão relacionadas com a formação do fluido folicular, por secretarem moléculas de grande peso molecular, que não tem a capacidade de atravessar a membrana basal, permanecendo no interior do folículo, gerando um aumento da pressão osmótica (CLARKE *et al.*, 2006). O DNA das células da granulosa degeneradas por estar associado a moléculas maiores também pode contribuir para a formação do fluido folicular (VAN WEZEL *et al.*, 1999; CLARKE *et al.*, 2006).

O fluido antral pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras derivados do sangue ou secreções de células foliculares como gonadotrofinas,

fatores de crescimento, enzimas e proteoglicanos (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Os proteoglicanos também estão diretamente relacionados com a formação do fluido folicular, pois são moléculas que auxiliam no aumento do potencial osmótico, por serem fortemente hidrofílicos, são carregados negativamente e exercem forte atividade osmótica. A Hialuronidase Sintetase 2 (HAS2) é uma enzima que já foi demonstrada em células da granulosa bovina, sendo responsável por catalisar a produção de ácido hialurônico (SCHOENFELDER & EINSPIANIER, 2003). Outro proteoglicano identificado no fluido folicular de bovinos foi o versican, que tem se mostrado presente também na membrana da granulosa (McARTHUR *et al.*, 2000; IRVING-RODGERS *et al.*, 2004). Além do versican, o perlecan foi identificado como sendo mais um proteoglicano de importância no desenvolvimento dos folículos ovarianos, encontrado na lâmina basal de folículos antrais, tanto saudáveis como atresicos. A expressão do perlecan durante a formação do antro é fundamental para a formação do fluido folicular, além de estar envolvido na parte estrutural do folículo, interagindo com vários componentes da lâmina basal, incluindo a laminina, o colágeno do tipo IV e a fibronectina. É provável que o perlecan estabilize a lâmina basal folicular durante a foliculogênese, além de interagir com fatores de crescimento e suas proteínas de ligação, por meio de suas cadeias laterais de sulfato de heparan. A interação de todas essas moléculas culmina com a formação e expansão da cavidade antral, que ocorre de forma contínua até que o folículo chegue ao estágio pré-ovulatório (McARTHUR *et al.*, 2000).

2. 4. Crescimento de folículos antrais

A partir do momento em que a cavidade antral é formada os folículos são classificados como terciários ou antrais. Quando atingem o diâmetro de aproximadamente 3 mm, os folículos antrais apresentam algumas características morfológicas bem específicas uma vez que já possuem células da granulosa diferenciadas em células do *cumulus* e células murais, muitas camadas de células tecais, além da cavidade antral preenchida pelo líquido folicular (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A partir do estágio antral, os folículos passam de responsivos a dependentes de gonadotrofinas.

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por fases distintas de crescimento, como o recrutamento, a seleção e a dominância. Em espécies monovulatórias, somente um folículo é selecionado, dentre os recrutados, para continuar a crescer. Este folículo é chamado de dominante e irá diferenciar-se em folículo ovulatório. O folículo selecionado deve ser capaz de bloquear o crescimento e induzir a atresia dos demais folículos, através da secreção de altas concentrações de estradiol e inibina (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Os mecanismos endócrinos preponderantes nesta regulação envolvem a atuação das gonadotrofinas (FSH e LH) e os hormônios esteróides ovarianos (estradiol e progesterona). Entretanto, vários estudos sustentam a participação de fatores ovarianos parácrinos nos mecanismos de controle, inclusive na mediação e modulação da ação das gonadotrofinas (WEBB *et al.*, 2003).

A dependência de gonadotrofinas irá induzir o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos antrais em ondas foliculares (FORTUNE *et al.*, 2001). Em bovinos, ocorrem aproximadamente duas a três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral (GINTHER, 2000). A emergência de uma onda se caracteriza pelo desenvolvimento de mais de 20 folículos que são estimulados pelo aumento das concentrações plasmáticas de FSH (REIS, 2004). Em bovinos, quando o folículo dominante chega de 4 a 5 mm de diâmetro, o FSH atinge seu pico máximo de concentração (NASSER, 2006). Folículos dominantes e subordinados possuem aproximadamente o mesmo número de receptores de FSH, mas o folículo dominante possui mais receptores de LH que os subordinados. A dominância folicular envolve redução da secreção de FSH hipofisário, induzida pela inibina, e redução da secreção hipotalâmica do Hormônio Regulador das Gonadotrofinas (GnRH) induzida pelo estradiol, atuando na regressão dos folículos subordinados (GINTHER *et al.*, 1996).

Dentre os fatores de crescimento envolvidos na regulação do crescimento e desenvolvimento folicular nesta fase, destaca-se a família dos Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF), formado pelos Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina I e II (IGF-I e IGF-II) e pelas Proteínas de Ligação ao IGF (IGFBPs). O sistema IGF, parece estar diretamente relacionado ao processo de seleção do folículo dominante. Os IGFs atuam sinergicamente com o FSH na promoção de crescimento folicular e produção

de estradiol (FORTUNE *et al.*, 2004). Além de exercerem um papel importante no controle do desenvolvimento folicular, esse sistema também parece estar relacionado à atresia em animais domésticos (MONGET *et al.*, 2002).

No estágio antral final, o oócito já se encontra com o maior diâmetro possível e cessa completamente a transcrição nuclear, atingindo, então, competência para concluir sua divisão meiótica e, em seguida, para ser fertilizado e desenvolver-se em blastocistos (SENEDA & BORDIGNON, 2007). Os folículos pré-ovulatórios apresentam todos os componentes presentes nos folículos terciários, contudo o oócito encontra-se maturo e no estágio final do desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A formação de folículos pré-ovulatórios é um pré-requisito para a ovulação, que irá ocorrer em resposta ao pico de LH, além de ser fundamental para a manutenção da fertilidade feminina (DRUMMOND, 2006).

2.5. Atresia

Estima-se que a população folicular na espécie bovina chegue ao número de 235.000 folículos (BETTERIDGE *et al.*, 1989). No entanto, grande parte destes 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). Evidências têm demonstrado que a apoptose é um dos principais mecanismos bioquímicos responsável pela atresia folicular (MARKSTRÖM *et al.*, 2002), a qual também pode ocorrer por via degenerativa ou necrótica.

A via degenerativa é resultado de processos isquêmicos, causados por alterações na permeabilidade da membrana celular ocasionando a degeneração. Já a via apoptótica, processo de morte celular programada, ocorre quando os fatores parácrinos ou endócrinos não são apropriados para suportar o crescimento folicular e/ou diferenciação das células da granulosa (SILVA *et al.*, 2002), ocasionando um desbalanço entre genes pró e anti-apoptóticos. Estes genes pertencem a duas importantes famílias de reguladores da apoptose, que são a família das caspases e a família Bcl-2. A família Bcl-2 compreende membros

anti-apoptóticos, como Bcl-2, e pró-apoptóticos inclui o Bax, Bid, Bik, DBO e Bcl- XS (MARKSTRÖM *et al.*, 2002).

2.6. Sistemas de cultivo e técnicas de avaliação do crescimento folicular

No sentido de evitar essa grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, bem como melhorar a compreensão do complexo mecanismo da foliculogênese, diversos tipos de sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, que correspondem a 90% da população folicular, vêm sendo empregados, tendo sido obtidos alguns resultados satisfatórios em diferentes espécies.

Dentre os tipos de cultivo *in vitro* atualmente empregados, podemos citar o cultivo do ovário inteiro, que é realizado apenas em roedores devido às pequenas dimensões dos ovários destes animais (EPPIG & O'BRIEN, 1996). Além disso, pode-se realizar o cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano (cultivo *in situ*) (SILVA *et al.*, 2004a, 2004b) ou ainda o cultivo de folículos isolados (COSTA *et al.*, 2011).

O cultivo de folículos isolados pode ser realizado em sistemas diferentes, que compreendem os sistemas bidimensional e tridimensional. No sistema bidimensional, o folículo é cultivado diretamente sobre o substrato. Neste caso, mesmo que os componentes individuais permaneçam funcionais, a arquitetura folicular pode ser alterada devido à aderência dos folículos ao substrato (GOMES *et al.*, 1999). Já no sistema tridimensional, o folículo é internalizado no substrato, permitindo que a arquitetura tridimensional seja mantida, preservando a integridade estrutural do tecido e permitindo as interações entre os folículos, que são essenciais para desenvolvimento normal (ABIR *et al.*, 2006).

A partir desses sistemas de cultivo atualmente empregados, grande avanços já foram obtidos. Os resultados mais satisfatórios foram alcançados em camundongos. Para estes animais, foi obtido o nascimento de crias saudáveis a partir do cultivo *in vitro* em dois passos: inicialmente o cultivo *in situ* para ativação dos folículos primordiais e em seguida o cultivo de folículos isolados (O'BRIEN *et al.*, 2003). Em ruminantes, já foi possível a obtenção de embriões a partir do cultivo de folículos secundários isolados de búfalas (GUPTA *et al.*, 2008), caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011) e

ovinos (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010). No entanto, na espécie bovina, os resultados são ainda limitados, chegando apenas até a formação de antro (GUTIERREZ *et al.*, 2000; ITOH *et al.*, 2002; ROSSETTO *et al.*, 2011).

Devido a essa limitação, se faz necessário o aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo *in vitro* atualmente empregados. Um dos principais fatores que afetam o sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é a composição do meio de base utilizado. Há uma variedade de meios utilizados, dentre eles podemos citar o Meio Essencial Mínimo - MEM (MATOS *et al.*, 2007), Waymouth (EPPIG & O'BRIEN, 1996; MURUVI *et al.*, 2005) e McCoy's (TELFER *et al.*, 2008). O meio de cultivo de base utilizado para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais comumente é suplementado com diferentes fatores e substâncias, porém a eficácia desses fatores adicionais na manutenção do crescimento e da sobrevivência folicular depende da espécie estudada, do próprio sistema de cultivo, da concentração desses fatores e da duração do cultivo.

FIGUEIREDO *et al.*, (1994) descreveram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais bovinos *in vitro* foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina. JEWGENOW *et al.*, (1998) também mostraram que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao meio de cultivo (MEM) é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*. Nesse sentido, uma grande quantidade de fatores de crescimento ainda pode ser inserida ao meio de cultivo, visando à obtenção de resultados ainda mais satisfatórios. Dentre essas substâncias, podemos citar a Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15), que é um fator de crescimento derivado do oócito e o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) que consiste em uma gonadotrofina hipofisária.

2.7. Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15)

A Proteína Morfogenética Óssea -15 (BMP-15) é pertencente à Superfamília de Fatores de Crescimento Transformante Beta (TGF- β). Os membros dessa superfamília possuem entre si semelhanças estruturais, pois possuem sete cisteínas conservadas, as quais estão envolvidas no dobramento da molécula em uma única estrutura tridimensional chamada um nó de cistina (VITT *et al.*, 2001). Alguns integrantes dessa família, como é o

caso da BMP-15 possui uma substituição de uma serina por uma cisteína, normalmente envolvidas na formação de pontes dissulfeto intermolecular. Os ligantes da família TGF- β são traduzidos inicialmente como pré-pró-peptídeos precursores de um peptídeo-sinal amino terminal seguido de um prodomínio e um domínio maduro (MASSAGUÉ, 1998).

A BMP-15 é um fator derivado do oócito e é responsável por promover a proliferação das células da granulosa e estimular o desenvolvimento de folículos primários em roedores, sendo considerado, portanto, um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (OTSUKA *et al.*, 2000; NILSSON & SKINNER, 2002; FORTUNE, 2003). Além disso, outros processos relacionados com o desenvolvimento folicular, incluindo recrutamento do folículo primordial, proliferação das células da teca, atresia e esteroidogênese também são modulados pela BMP-15 (WU *et al.*, 2007). O gene BMP-15 está localizado no cromossomo X, e ratas com deleção do gene para BMP-15 apresentam disfunções nas células do cumulus (YAN *et al.*, 2001).

Os membros da família TGF- β interagem com dois receptores transmembranares serina/treonina quinase, do tipo I e tipo II. Logo, para modular suas ações, a BMP-15 irá ligar-se primeiramente ao seu receptor do tipo II, e posteriormente recrutar o receptor BMP tipo I (IA ou IB) (SHIMASAKI *et al.*, 2004). Uma vez formado este complexo, as proteínas reguladoras (SMADs) são então estimuladas e transportadas do citoplasma para o núcleo, onde podem funcionar como reguladores transcricionais (WOTTON & MASSAGUÉ, 2001) (Figura 2). Foi verificado que a BMP-15 poderia se ligar aos vários receptores de células da granulosa como BMPR-II, receptor de ativina tipo II, ALK-2 e ALK-6. Desses receptores, ALK-6 é o mais eficiente na ligação a BMP-15 e BMPR-II é mais eficaz na bioatividade de BMP-15 (WU *et al.*, 2007).

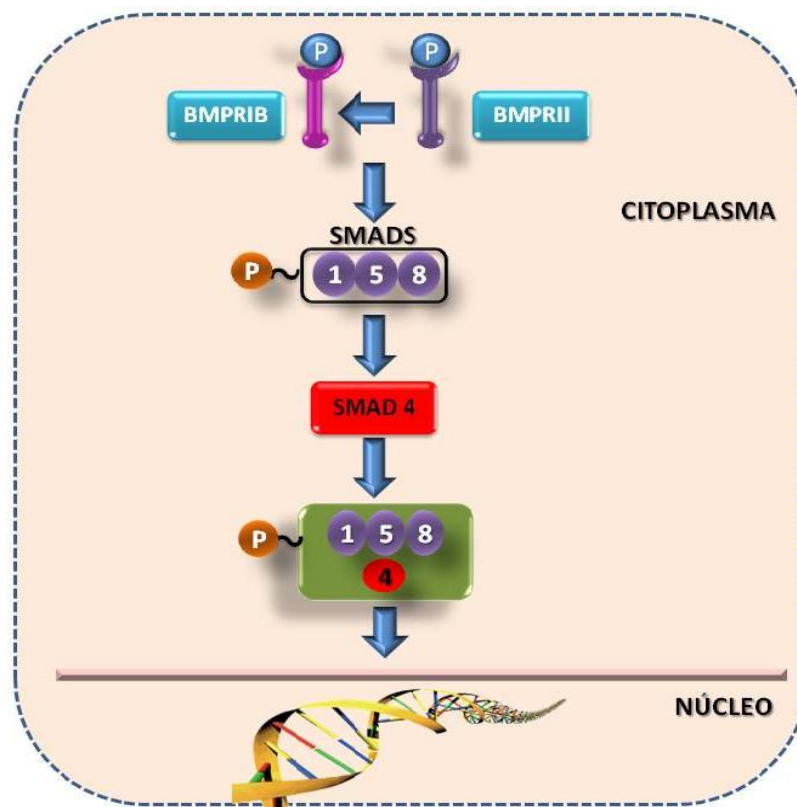


Figura 2. Via de sinalização celular, seus receptores do tipo I e II (BMPRI-B e BMPRII) e seus mensageiros intracelulares (SMADs -1, 5, 8 e 4).

Os RNAs mensageiros para BMP-15, BMPRI-A, BMPRI-B e BMPRII já foram detectados em folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e células da granulosa de folículos antrais caprinos (SILVA *et al.*, 2004a). A BMP-15 também foi localizada exclusivamente em oócitos de folículos bovinos a partir do estágio primordial (JUENGEL *et al.*, 2004), enquanto que em roedores, ovinos e em humanos, a BMP-15 foi detectada principalmente em oócito de folículos primários avançados, estimulando o crescimento folicular (JUENGEL & McNATTY, 2005). A BMP-15 pode promover a sobrevivência folicular através da manutenção de proliferação de células da granulosa e prevenção da luteinização precoce e/ou atresia (KNIGHT & GLISTER, 2006). Esse fator de crescimento têm se mostrado essencial para formação de folículos secundários, uma vez que animais deficientes para essa proteína tiveram o seu desenvolvimento folicular interrompido (McNATTY *et al.*, 2007).

Um estudo recente mostrou que em caprinos, a adição de BMP-15 ao meio de cultivo de folículos primordiais, resultou no aumento no diâmetro folicular e no aumento do percentual de folículos secundários, promovendo assim o crescimento. Neste mesmo estudo foi mostrado ainda que o RNAm para a BMP-15 está presente em todas as categorias foliculares analisadas e que esta proteína estimula a manutenção da integridade folicular (CELESTINO *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrado, em estudos *in vitro*, que a BMP-15 desempenha também um papel fundamental na regulação das funções ovarianas através dos processos de mitose, proliferação, apoptose, metabolismo e expansão através de sinalização mitogênica e transdução (QIAO & FENG, 2010), mostrando que em todas as fases do desenvolvimento folicular a ação da BMP-15 tem um papel relevante.

A BMP-15 é considerada um fator chave obrigatório para a fertilidade feminina de diferentes espécies de mamíferos e já foi demonstrado que a deleção do gene BMP-15 induz a ocorrência de patologias diretamente relacionadas à atividade reprodutiva, tais como síndrome dos ovários policísticos (PCOS) e falha ovariana prematura (FOP). A BMP-15 recombinante humana tem um grande potencial nas tecnologias de reprodução assistida para o tratamento da infertilidade (LI *et al.*, 2009).

Galloway *et al.*, (2000) demonstraram que mutações homozigóticas no gene para BMP-15 ocasionam um aumento da infertilidade em ovelhas (Hanna e Inverdale) devido a um bloqueio na foliculogênese, a partir do estágio primário. Quando esta mutação se dá em heterozigotos, ocorre uma maturação folicular precoce, levando a aumento da taxa de ovulação. Posteriormente, este mesmo fenótipo foi confirmado em um estudo posterior com animais da mesma espécie demonstrando que a BMP-15 está diretamente relacionada à regulação do desenvolvimento folicular e controle da taxa de ovulação em ovelhas (HANRAHAN *et al.*, 2004; McNATTY *et al.*, 2005).

2.8. Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) é um heterodímero formado pela associação não-covalente de duas subunidades, α e β , que por sua vez, são sintetizadas e secretadas pelas células gonadotróficas na hipófise anterior (BROWN & McNEILLY,

1999). A formação deste dímero, com a estruturação quaternária da proteína, é essencial para ligação do FSH ao receptor e para a atividade biológica de FSH (MEDEIROS *et al.*, 2011).

O controle da liberação do FSH é realizado por mecanismos de *feedback* envolvendo a inibina e estrógenos, os quais atuam diretamente na hipófise anterior (ROCHE, 1996). A atuação desta gonadotrofina ocorre após sua ligação a receptores específicos de superfície celular presente nas células alvo, que são exclusivamente as células da granulosa. Em bovinos, já foram detectados receptores de FSH (R-FSH) em folículos primários e secundários (bovinos: WANDJI *et al.*, 1996) e, recentemente, estes receptores também foram detectados nestas mesmas categorias foliculares na espécie caprina (SARAIVA *et al.*, 2010). O papel das gonadotrofinas no controle na foliculogênese inicial é controverso, pois embora folículos a partir da categoria de primários (MÉDURI *et al.*, 2002; SARAIVA *et al.*, 2010) possuam receptores para FSH, o desenvolvimento dos folículos pré-antrais até a formação do antro ocorre na ausência ou em níveis muito baixos deste hormônio (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH ao meio pode contribuir para o crescimento folicular durante o cultivo de folículos secundários, fase que corresponde à fase responsiva ao FSH (CORTVRINDT *et al.*, 1998; WANDJI *et al.*, 1996; FORTUNE *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2007; SARAIVA *et al.*, 2010). Em bovinos, o FSH estimulou o aumento do diâmetro, a sobrevivência folicular e a secreção de progesterona e estradiol em folículos primários e secundários isolados (WANDJI *et al.*, 1996). Nesta mesma espécie, folículos secundários isolados mecanicamente foram cultivados em meio de cultivo suplementado com FSH resultando em crescimento destes folículos até o estágio antral (GUTIERREZ *et al.*, 2000).

Recentemente, o uso do Hormônio Folículo Estimulante em concentrações crescentes promoveu o desenvolvimento folicular *in vitro* em caprinos. A utilização do FSH sequencial resultou em melhores taxas de formação de antro, sendo de grande importância para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, principalmente devido as necessidades crescentes de FSH, de acordo com a fase do desenvolvimento (SARAIVA *et al.*, 2011).

2.9. Técnicas para análise folicular durante o cultivo *in vitro*

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para análise folicular durante o cultivo *in vitro*. Com o auxílio dessas técnicas, pode-se analisar a ativação, o crescimento e a viabilidade folicular ao longo do período de cultivo. Em geral, os estudos realizados com cultivo utilizam as técnicas em conjunto, a fim de se obter uma maior precisão sobre a qualidade folicular (MATOS *et al.*, 2007). Dentre elas podemos destacar a Microscopia de Fluorescência, técnicas de Biologia Molecular e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

A microscopia de fluorescência é uma técnica que se utiliza de 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). Diversos estudos vêm utilizando-se desta técnica com o intuito de avaliar a viabilidade dos folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro* (CELESTINO *et al.*, 2011). A viabilidade folicular é então avaliada com o uso dos marcadores fluorescentes, como a calceína-AM e o etídio homodímero-1. A calceína-AM irá detectar a atividade da enzima esterase intracelular, a qual é característica de células viáveis, enquanto que o etídio homodímero-1, é um marcador que se liga à ácidos nucléicos de células não-viáveis, que apresentam ruptura na membrana plasmática (LOPES *et al.*, 2009).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão é uma técnica capaz de detectar danos às membranas celulares e organelas que não são visíveis ao nível da microscopia de luz. É considerada uma ferramenta importante para discernir a qualidade do folículo e do oócito (LUCCI *et al.*, 2001). Pelo fato de permitir a definição de imagens intracelulares, e estudos da morfologia celular, como aspectos gerais das organelas, o emprego da MET vem sendo bastante difundido (GALLETI, 2003), especialmente no que se refere ao crescimento folicular, bem como atresia, e as alterações ultra-estruturais acarretadas por estes processos.

Por último, dentre as técnicas de Biologia Molecular, destaca-se a PCR em tempo real (qRT-PCR), que vem sendo utilizada com sucesso para avaliar a expressão de um gene por meio da quantificação dos níveis de RNAm em um determinado tipo de célula. Essa análise tem importância fundamental para analisar a expressão de genes específicos antes e

após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Desta forma, a quantificação dos níveis de RNA mensageiro para os receptores de BMP-15 e para o receptor de FSH é essencial para a compreensão da fisiologia ovariana.

3. PROBLEMA E HIPÓTESES

Apesar de ser conhecido o papel da BMP-15 bem como do FSH no desenvolvimento folicular, ainda não se sabe se a associação destas duas substâncias tem uma influência no desenvolvimento folicular e expressão de RNAm para receptores de BMP e de FSH em folículos pré-antrais bovinos. Além disso, levantou-se os seguintes questionamentos: será que a utilização da BMP-15 nos primeiros seis dias de cultivo retarda a diferenciação celular e favorece a multiplicação das células da granulosa? Será que a utilização do FSH somente nos últimos seis dias de cultivo favorece o crescimento e a viabilidade folicular?

Diante do exposto, formularam-se as seguintes hipóteses científicas: (1) A BMP-15 e o FSH, sozinhos ou associação, influenciam positivamente o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos durante 12 dias de cultivo e controla a expressão de RNAm para receptores de BMP e de FSH; (2) A adição de FSH ao meio de cultivo favorece o desenvolvimento folicular; (3) A BMP-15 adicionada ao cultivo favorece a proliferação das células da granulosa e subsequente crescimento e diferenciação dos folículos bovinos cultivados *in vitro*.

4. JUSTIFICATIVA

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina do mundo, com um rebanho de aproximadamente 190 milhões de animais. Aliado a isso, o Brasil aparece como o sexto maior produtor de leite bovino do mundo, produzindo mais de 27 bilhões de litros/ano. Em 2005, a demanda mundial de carne bovina foi de 50,13 milhões de toneladas, e segundo estimativas da Fapri – Food and Agricultural Policy Research Institute, deve haver um aumento do consumo per capita de carne, leite e derivados nos próximos anos. Isso representa uma crescente demanda pela produção de bovinos de alta qualidade genética.

Levando-se em consideração que ao nascimento, o ovário das vacas possui aproximadamente 300.000 oócitos inclusos em folículos pré-antrais, e que uma pequena parte desses oócitos, apenas 0,1%, irão se desenvolver até atingir a ovulação, pode-se vislumbrar o melhoramento do potencial reprodutivo de fêmeas geneticamente superiores através da produção de milhares de embriões a partir de um único par de ovários. Nesse sentido, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito principal de elucidar os mecanismos envolvidos na foliculogênese pré-antral em diferentes espécies, e consequentemente aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas. Para isto, torna-se necessário compreender os mecanismos que regulam a dinâmica folicular e desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* que possibilitem o crescimento de milhares de folículos pré-antrais até estarem aptos a maturação *in vitro*. Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi alcançado. Enquanto em roedores crias saudáveis já foram obtidas a partir do cultivo *in vitro* de folículos primordiais (O'BRIEN *et al.*, 2003), e em búfalos (GUPTA *et al.*, 2008), ovinos (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010) e caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010) já foram obtidos embriões a partir de oócitos provenientes de folículos secundários, em bovinos, os resultados são limitados apenas à formação de antro (McLAUGHLIN *et al.*, 2010).

Até o momento sabe-se que o crescimento e desenvolvimento folicular é orquestrado por hormônios e fatores de crescimento que irão agir de forma autócrina ou

parácrina na regulação deste crescimento. Além do FSH influenciar todos os estágios de desenvolvimento folicular, regula a ação de diferentes fatores de crescimento, tais como a Proteína Morfogenética Óssea 15. A BMP-15 por sua vez, possui um relevante papel no desenvolvimento folicular, regulando processos que vão desde a ativação até a fase de maturação do oócito (OTSUKA *et al.*, 2000; KNIGHT & GLISTER, 2006). Sabendo da importância da ação destas substâncias, espera-se que utilização de ambas em um sistema de cultivo possa trazer resultados significativos no desenvolvimento de folículos bovinos. Além disso, análises da expressão dos receptores de BMP-15 e de FSH podem contribuir para uma melhor compreensão do papel da BMP-15 e do FSH na regulação do desenvolvimento folicular.

5. OBJETIVOS

5.1. Gerais

- Avaliar o efeito da BMP-15 e do FSH sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos bovinos;
- Avaliar o efeito da BMP-15 e do FSH sobre a expressão dos RNAs mensageiros para os receptores de BMP-15 e de FSH após cultivo de folículos secundários bovinos em meio contendo FSH e BMP-15.

5.2. Específicos

- Verificar a influência da BMP-15 e FSH,sozinhos ou em diferentes combinações sobre o crescimento de folículos secundários bovinos bem como sobre a formação de antro;
- Analisar, por microscopia de fluorescência, a viabilidade dos folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* durante um período de 12 dias na presença de BMP-15, FSH ou associação de ambos;
- Analisar a ultra-estrutura de folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* por 12 dias na presença de BMP-15 sozinha ou associada ao FSH;
- Comparar os níveis de RNAs mensageiros para os receptores de BMP-15 e receptor de FSH em folículos secundários bovinos crescidos *in vitro*.

6. ARTIGO I

**Efeito da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e do
Hormônio Folículo Estimulante (FSH) sobre o desenvolvimento
de folículos ovarianos bovinos**

*Effect of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Follicle Stimulating Hormone
(FSH) on development of bovine ovarian follicles*

Artigo em fase de submissão

Effect of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) on development of bovine ovarian follicles

Passos, M.J*, I.R. Brito^a, M.V.A. Saraiva^a; J.J.N. Costa^a; M.A.M. Donato^c; Ribeiro, R.P^a; Cunha; E.V^a; Peixoto, C.A; Campello, C.C^b; J.R. Figueiredo^b, J.R.V. Silva^a

^a Biotechnology Nucleus of Sobral (NUBIS), Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil;

^b Faculty of Veterinary, Laboratory of Manipulation of Oocyte and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil; ^c Laboratory of Ultrastructure, CPqAM/Fiocruz, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

*Corresponding address (Passos, M. J): 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 36132603 [jrsvsilva@ufc.br]

E-mail address: julianepassos@yahoo.com (Maria Juliane Passos)

Abstract

This study aims to evaluate the effect of BMP-15 and FSH, alone or in different combinations on the *in vitro* development of bovine secondary follicles. Furthermore, this study aimed to assess the levels of mRNA for BMP-15 receptors (BMPR-IB and BMPR-II) and FSH-R in follicles grown *in vitro*, by real time PCR. For *in vitro* culture, secondary follicles were microdissected and cultured for 12 days in α -MEM⁺ (T1) alone, or supplemented with BMP-15 (T2) and/or FSH (T3) alone or in two associations (BMP-15+FSH from D0 to D12 (T4) and BMP-15 from D0 to D6 and FSH from D7 to D12 (T5). During the culture, follicular diameter, viability and rate of antrum formation and ultrastructural were evaluated. At the end of the culture period, the use of BMP+FSH (0-12) stimulated a significant increase in follicular diameter in relation to other treatments ($p < 0.05$). Follicles cultured for 12 days in this same treatment had a antrum formation percentage significantly superior to control (α -MEM⁺) and BMP-15 alone ($p < 0.05$), however, significantly reduced follicular viability when compared to other treatments ($p < 0.05$) and cause ultrastructural damage to the follicles. The results also showed that the levels of mRNA for BMPR-IB were significantly higher in follicles cultured with α -MEM⁺ when compared to other treatments. The highest levels of mRNA for FSH receptor were detected in follicles

cultured with BMP-15 alone. In conclusion, this study demonstrated that combination of BMP-15+FSH (D0-D12) accelerates the growth of bovine preantral follicles cultured for 12 days, but this effect reduces the follicular viability, affecting the ultrastructural integrity of the follicles. Furthermore, the addition of BMP alone increased expression levels of RNAm for FSHR after 12 days of culture.

Keywords: culture, preantral follicles, BMPR-IB, BMPR-II, FSHR

Introduction

Culture of preantral follicles has been developed nearly two decades ago with the aim of improving the use of reproductive potential of genetically superior females. However, birth of healthy offspring after culture of primordial follicles was obtained only in mice (O'BRIEN *et al.*, 2003). In farm animals, such as ruminants, the results are limited to production of a very low number of embryos in caprine (SARAIVA *et al.*, 2011), ovine (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010) and bubaline (GUPTA *et al.*, 2008) species. In cattle, only the antral cavity formation (ITOH *et al.*, 2002) has been observed after preantral follicle culture. It is essential therefore, to better understand how culture conditions impact on the maintenance of appropriate growth during follicle development. The preantral phase of follicle development is typified by mRNA synthesis and continued proliferation of granulosa and theca cells, increased vasculature and oocyte growth. In addition, important follicular preantral events include the action of FSH (SARAIVA *et al.*, 2010), BMP and its receptors (SILVA *et al.*, 2006; CELESTINO *et al.*, 2011).

BMP-15 is a protein that belongs to the superfamily of transforming growth factor beta (TGF- β), whose action is directly related to cell proliferation and differentiation granulosa cells (OTSUKA *et al.*, 2000). The BMP-15 gene is located on the X chromosome and in ewes, mutations in the BMP15 gene causes infertility (GALLOWAY *et al.*, 2000). In addition, BMP-15 promotes proliferation of granulosa cells and is regarded as an important regulator of mitosis of granulosa cells and follicular development stages (OTSUKA *et al.*, 2000, NILSSON & SKINNER, 2002; FORTUNE, 2003). *In vitro* studies have demonstrated that BMP-15 plays a key role in promoting follicular growth since the primary stage (KNIGHT & GLISTER, 2003). In goats, the addition of BMP-15 (100 ng/mL) to the culture medium maintained the integrity and promoted the growth of primordial follicles cultured for

seven days (CELESTINO *et al.*, 2011). In antral follicles, studies have demonstrated that BMP-15 is a potent inhibitor of premature luteinization, thus contributing to the normal growth of the oocyte (SHIMASAKI *et al.*, 2004). Furthermore, transgenic mice with high levels of BMP-15 expression showed a fast follicular growth with a decrease in the primary follicles and an increase in the secondary follicles (McMAHON *et al.*, 2008). Moreover, rats with this gene deleted showed dysfunctions in cumulus cells, showing that this protein plays an important role in the final stage of follicular development (YAN *et al.*, 2001).

The BMP-15 may also act together with the Follicle Stimulating Hormone (FSH) in the regulation of follicular development, since the correct concentration of FSH is crucial for appropriate modulation of KL and BMP-15 to promote oocyte growth (THOMAS *et al.*, 2005). FSH is a gonadotropin which acts directly or indirectly to promote the follicular development *in vivo* and *in vitro*. The presence of receptors for FSH is already evident in follicles from the primary stage (MÉDURI *et al.*, 2000), having an effect on follicular development in early folliculogenesis through the release of paracrine factors produced by larger follicles or ovarian stromal cells (VAN DEN HURK AND ZHAO, 2005). Different studies have shown that FSH and BMP-15 have an important role in the development of follicles cultured *in vitro*. However, there is no data on the action of the association of BMP-15 and FSH in bovine follicles cultured *in vitro*. Given the known role of these substances at different stages of folliculogenesis, the addition of BMP-15 or FSH at different times may help to elucidate at what stage of follicular development is more evident its action, thus contributing to greater efficiency in growth *in vitro* of bovine preantral follicles.

It is hypothesized that a short-term culture (12 days) of secondary follicles in the presence of FSH and BMP-15 in different concentrations and times of this addition would be important for growth and development of bovine follicles. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of BMP-15 and FSH, alone or in different associations on growth and viability in cultured bovine follicles, and to investigate the expression of BMP-15 receptors (BMPR-IB and BMPR-II) and FSH receptor (FSH-R) in bovine follicles cultured *in vitro* for 12 days.

Materials and methods

Chemicals

Unless indicated otherwise, culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Source of ovaries

Ovaries (n = 40) of adult cows (*Bos taurus*) were collected at a local abattoir immediately after slaughter. After collection, the ovaries were washed once in 70% alcohol for about 10 s, twice in 0.9% saline solution, and following transfer to Minimum Essential Medium Alpha (α -MEM⁺) supplemented with 100 μ g/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, and then transported to the laboratory at room temperature for up to 1h.

Follicle isolation

The ovaries were carefully dissected and placed immediately in α -MEM⁺. Briefly, ovarian cortical slices (1–2 mm thick) were cut from the ovarian surface and preantral follicles ≥ 0.20 mm in diameter were visualised under the stereomicroscope and manually isolated using 26-gauge needles attached to a syringe. After isolation, follicles were transferred to 100 μ L drops containing fresh medium at room temperature for evaluation. Follicles with a visible oocyte, surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane and no antral cavity were selected for culture.

***In vitro* culture of secondary follicles**

After selection, follicles were individually cultured in 100 μ L drops of culture medium in petri dishes (60 x 15 mm; Corning, Lowell, MA, USA) under mineral oil for 12 days at 39°C and 5% CO₂ in air. The basic culture medium consisted of α -MEM⁺ (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 μ g/mL ascorbic acid. Follicles were randomly distributed in five treatments following:

- T1:** α -MEM⁺ (cultured control)
- T2:** BMP-15 (D0 – D12: 50 ng/mL)
- T3:** rFSH sequential (D0 – D6: 50 ng/mL and D7 – D12: 100 ng/mL)
- T4:** BMP-15 + rFSH sequential (D0 – D12)
- T5:** BMP-15 (D0 – D6: 50 ng/mL) + rFSH (D7 – D12: 100 ng/mL)

Every other day, 60 μ L of the culture media were replaced with fresh medium, except at days 6 and 12, in which total medium replenishment was performed because of the different treatments tested. Follicles were classified according to morphological characteristics, and those showing morphological signs of degeneration such as darkness of oocytes and surrounding cumulus cells or those with deformed oocytes were classified as degenerated. Oocyte and follicular diameter were measured only in healthy follicles at x and y dimensions by using an ocular micrometer inserted into a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) using the software Motic Images Plus 2.0 ML every six days of culture (at days 0, 6 and 12 of culture). Antral cavity formation was defined as a visible translucent cavity within the granulosa cell layers. The culture was replicated 5 times, and at least 35 follicles were used in each treatment.

At the end of the 12-day culture period, in each treatment three groups of 7 healthy follicles (n = 21) were then collected and stored at -80 °C for analysis of mRNA expression by PCR, while the remaining follicles were to evaluated viability (n = 7) and ultrastructural integrity (n = 7).

Assessment of follicular viability by fluorescence microscopy

For a more precise evaluation of follicular quality after 12 days of culture, the follicles were further analyzed using fluorescent probes. At the end of culture, follicles were incubated in 100 μ L droplets of MEM containing 4 μ M calcein-AM and 2 μ M ethidium homodimer-1 (Molecular Probes; Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for 15 min. Afterwards, follicles were washed three times in MEM and examined under a DM LB fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium

homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered to be alive if the cytoplasm was labelled positively with calcein-AM (green) and if chromatin was not labelled with ethidium homodimer-1 (red).

Ultrastructural analysis of cultured bovine preantral follicles

In order to better examine follicular morphology, transmission electron microscopy (TEM) was performed to analyze ultrastructure of preantral follicles from *in vitro* treatments that provided the best results. Isolated follicles were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer - pH 7.2) for at least 3 h 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 0.1 M 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 µm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at a 400 × magnification. Ultra-thin sections (70 nm) were obtained from 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

Quantification of mRNA for BMP-15 receptors (BMPR-IB and BMPR-II) and FSH receptor (FSH-R) in cultured follicles

Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 260/280 ratio nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, England). For each sample, the RNA concentrations used to synthesis cDNA were adjusted to 44 ng/mL. 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 20 µL composed of 10 µL of sample RNA, 4 µL reverse transcriptase buffer (Invitrogen), 8

units RNAsin, 150 units of reverse transcriptase Superscript III, 0.036 U random primers, 10 mM DTT and 0.5 mM of each dNTP (Invitrogen). PCR amplification of the cDNA consisted of an initial denaturation and polymerase activation for 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C, all reactions were performed in a real time PCR Mastercycler (Eppendorf, Germany) and finally stored at -20°C.

The negative control was prepared under the same conditions but without addition of reverse transcriptase. Quantification of mRNA for BMP-15 receptors (BMPR-IB and BMPR-II) and FSH receptor (FSH-R) was performed in bovine cultured follicles, through the technique of real-time PCR, performed with the use of SYBR Green. Each reaction in real time (20 µL) contained 10 µL of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 7.3 µL of ultra-pure water, 1 µL of cDNA and 0.85 µM of each primer, and real-time PCR was performed in a thermocycler (Master Cycler, Eppendorf, Germany). The housekeeping gene used to normalize the levels of mRNA was ubiquitin (UBQ) as determined in previous studies (REBOUÇAS *et al.*, 2011). The levels of mRNA of this cultured follicles was compared in cultured follicles of α -MEM⁺ (cultured control). The primers chosen to carry out amplification of these genes are shown in Table 1.

Statistical analysis

In the analysis of discrete variables, *ie*, number of morphologically normal follicles (follicular survival) and the formation of the antrum along the cultivation period, the data were grouped into "pools" for each treatment and analyzed by frequency dispersion by Chi-square, and the results are expressed as a percentage. The results corresponding to the follicular diameters were subjected to Shapiro-Wilk and Bartlett for verification of normal distribution and homoscedasticity, respectively. Not having been confirmed to perform requirements analysis of variance, even after data transformation, the diameters were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test (SAS, 2002). Data of mRNA expression are given as the mean \pm standard deviation (SD). ANOVA using General Linear Model (GLM) procedure of SAS was used to test the effect of BMP-15 and FSH on the relative expression for BMPR-IB, BMPR-II and FSH-R on fresh control and follicles submitted to culture for 12 days in α -MEM⁺ alone or cultured with α -MEM⁺ (cultured control), BMP-15 (D0 – D12: 50 ng/mL), rFSH sequential (D0 – D6: 50 ng/mL and D7 –

D12: 100 ng/mL), BMP-15 + rFSH sequential (D0 – D12) or BMP-15 (D0 – D6: 50 ng/mL) + rFSH (D7 – D12: 100 ng/mL). If an effect of treatment were significant, data were further examined by Tukey test to locate differences among treatments. A probability of $p < 0.05$ indicated that a difference was significant.

Results

Growth and viability of bovine preantral follicles cultured in medium containing FSH, BMP-15 or association of both

The data of follicle diameters of bovine follicles cultured in medium containing FSH and BMP-15 are shown in Table 2. After 6 days *in vitro*, the follicles cultured in medium supplemented with FSH or BMP-15 alone or associated (BMP+FSH D0 - D12) presented a significant increase in their diameters when compared to control medium (α -MEM) ($p < 0.05$). Follicles cultured in medium supplemented with FSH and BMP-15 alone and BMP-15+FSH (D0 - D12) or BMP-15 (D0 - D6) + FSH (D7 - D12) had a significant increase in their diameter after 12 days of culture, when compared to control medium ($p < 0.05$). In addition, the presence of both BMP-15 and FSH from day 0 to 12 significantly increased follicular diameter when compared to other treatments. With the increase of culture period from 0 to 6 and 12 days, follicles cultured in medium supplemented in all treatments, except MEM, had a significant and progressive increase in their diameter ($p < 0.05$).

After 12 days, the follicles cultured in medium containing BMP-15+FSH (D0 - D12) had a percentage of antral cavity formation (54.29%, 19/35) significantly higher than those follicles cultured in α -MEM (18.18%, 6/33) or BMP-15 (27.03%, 10/37) ($p < 0.05$). However, the percentage of antrum formation in follicles cultured in medium containing FSH (48.65%, 18/37), BMP-15+FSH (D0-D12) [54.29%, 19/35] or BMP -15 (D0-D6) + FSH (D7-D12) [40.54%, 15/37] showed no significant differences ($p > 0.05$).

Regarding follicle viability, all treatments were able to maintain the follicular survival during 12 days of culture similar to day 0, except for the treatment containing BMP-15+FSH (D0-D12) ($p < 0.05$). Furthermore, the follicles cultured in this treatment presented a reduction of viability with the increase of culture period of 6 for 12 days ($p < 0.05$) (Table 3). The viability of morphologically normal follicles was confirmed by staining with calcein-AM and ethidium homodimer after 12 days of culture, because the follicles presented oocyte and granulosa cells positive for calcein and did not react with ethidium homodimer (Figure 1).

όμóŸ_,î'fæÇlmøMY'έ □ Ó>ÅÆx_¶'W É«^{a3}4úÔZZÝp)α

ÂÊÂûgëË»ËËK¥%Ö[> •¼¼¼½Z^ZZ}½"e -

E . □ Úg>X^_}³Ìj?!'o □ ”•×°è|èòÒ«μË,Dn;ôyX,W,,/“(ü7Ôÿ □ Ë □ E □ Z □ □ Aícèør̄gã¥ □ HY¥j

ý ×í7jG7{4

»ök» □ ←†"i □ §_òÎAPûC\$¾i3Úpß?»n·[□ ^EÔ^Ó+êeÀ©Àg†h‘?Ã«WvÚ □ ðWE`Ü_á¾6¹w°

□ i•ÃÔãa•™é □ O8ip □ ½kj(;Ô •Đ¿Ç 8EÚ □ □ ’ù □ ãÕ □ ýo

⟨W □ ¾ZóæfÏ ™K3 □ v±XpÁ’»ËWÌ □ y ³6ýsÛ •î0

>]{îE□ Oyö*⁻äÏCœÓL`⁻×⁻eîäµ□ n□ □ ó

\$yIYÐÝ^Â□ ™Ã62Æk□ CEµk×òò'ßÛ÷₋¥>Ð>t⁻+·CE8xœóO‡ [1/2'ÿ| 6äBàðÒa 0

^ÿŠ²⁺»cèÒà†ñÏ[aÔpóH^Ê

□ >'eñÛ

÷æ 'gæ«ñWäif ãÕ±Ô>Î§÷ÏP^{3/4}^~?H} Òð%Ð9uÿñpÛ□ :S:Ú§'©-

7/ðÇTHÖÍknPorÿxœö%□ éÍí□ 'LyäDÑÈë • Dyð x*e]û;Z • Ž Gµ¶¼Ê

>Ÿž ìè1zm#ú² ñ

êyØ÷FotÓ—□ x»²,ÆŠNî<°ã }Đ(rý§,TR“—Øêâà□ ~6ý-Õ□ è4R®¼ÆØ)òï:÷cûÔÓ6o>Ã|B

☉ ☐ ☐ 6Æ;qfb\$Ä

w/ó-Û,n... ☐ 7Ç` ☐ èH7qÝÁ ☐ hFDÛ ☐ iò(âzîœK-D*× • FÃiÁ¼H ☐ A,^òªç°L

i □ àÀyTM7o □ Q -[□ è-ââ □ .àù‘ ðÑ̃ •X•—
 óÀ Èž)qÔ9#Dñ>©Ptöë □ Š ŸJê... □ œÝ•ÝÁ×Ë^{1/2}}
 †8 □ TM Ovv• OzécS “ÿ°‘b%µ&”NÂŠú‘qÇÑ9 □ *⁻ÁS^{1/2}µ,^{1/2}α □ OH±gÕ □ è ©Î|ý-S} §ûŸsé\$
 @2m3ÝgjÛ • ©U,Ôä \Ë/W••A+ ÂzN
 _(□ 3‘dOzqÒ©“»oa<[,ú€ 3*ë[¼Å»SýdÎÕDtkß □ Ÿx □ @‘ { fÄ □ þé?3†OjLbi
 ô æP?áAK&fm □ AnqŠ9 □
 XŽ Cðà!ýóOÿK’^%_k □ †êï -i31\1û±úaÂRjW^ð<†Û,ý □ t □ □ Æ3Î □ ACð ‘ □ ÕTØ
 □ Qñ!ÀcpÕŸ □ □ "sm □ o\$Ô; Ěµ,ñýiá@sÆÛ_”} ŠŸ% □ CR □ Ū_ "yŸLâ“(~Nð {æN6é”þ □ .
 1?†ú;PI¶ J-Ž ^{3/4}[;â± R

ZÇæ7- Īd ?V¶O-ünéq̄•ú-üÖÍûJ 1 Çú &μÑÍG□ ~*IÙJÃ□ ©□ À¶e-ïó,,|•-
 1;Ä\$[ªD"º»î]SÀJ”È],vÛypC^•uò•Pn•\$;fËr(¾öO-Â∞DÎëð“¶ ¶Í\$É')S5μOÛ>H”ÒiÑbf/ÌòÎ
 æø«HáoÊë—
 „CSÛ□ CE2a]ñÅð†6∞Y\$3¾¾¾¾Ø6MÍÚ□ è,lÁpZ®Vvöú^Úú□ › jc∞™ºδ²èPÖPpÕPìk\$;ð

#Lì

çì-[ĩ • !ôIa

ÛÒÛ7 □ Šö-a²êr □-i-n/

içÛÛy'¼kô?Æà

|oi'...ò □ □ eç+"@Z

ÄsG □ 'Â<SÚ- d • `ŋ^-d • Ë9x-e • ×B çèž

1 □ í □ 'çœ—P®-½sN

+§û½S~HABŠ

-H\$-ÀôC—ýŸÒâ-ò¼† □ vac™ □ {çfàl«·ÿyr □ ' □ ¹]á-ã

m Đιμ\ÚρQ • »"@)-D;È \tLY‘‘0Fe □ □ □ Ç?™!çñŸ¼%öËÛ+fpβ©M€ ç:Oc • j° • ¥ô<
 §zÊâ^y3ℓÇamÿ*

×D_iž ç°äw £œĐCà:f·™Óí-,|æ)ÉĂ^□ 3éö⁻□ +c□ Y□ •~|@Œ;□ [□ rš Í uóöi

Ä-û²g_õé·qNnEXZ[uæë □ pJâ^6 □ □ ûŷ

□ ;ÇÕÒQµtzTÚƆ/UØÿ§Õã³#Õ@\$ð □ ¿{Pó □ wê □ }>N9«çR_!Á<í

FT

X±²»Û □ ...ëP|ò{J2P¾}pö_X&ÚçÃü à@Êb3õ× > å"!ÿ □ `«Ã?a

ÅÝÂ □ Iç Äz>Ö

r □ Í7ÿ

_ _Ô|‘B[I □ ^

d!3h .-< —íÁÊç00PL‡³/4ž o Ç

/Ä • ÐBr>ðnpQ çÛ·U-J>Ç3>rÍŴ,,pa·²wV®TË;Çc+Ëx □ ú!½Ë»÷" □ ¹÷cÇ%oĩšv

F°ß`ÉP4ä □ áÒ^×Í□-;‰ □ - □ añÕ □ “¶ □ ÂE

:ôÅÅibÓ:-

1Ō □ „D¹/₂à1Yb5_ VêÖX-r^âŦ°§aÓé~#]K-

Qu □ çÒ/A□Yk □ %gÜöÙÑQâho;ŦCXe □ TMM6ĐZý±± • Ê´



^δ̄ □ ŷ òÁ'xδ □ XÖýda"óÁš@÷» Â=XØÊBâ« AÍ □ ‡G/Õ³øx
 »Â □ ÝĐÖ/ □ <+Ô²|hi*Tíe □ \$¶:‡ □ éM̄ □ mo|qÕ N(□ é†³°δ □ M_°¶ u FXc
 ¥³Cú'÷:ùH#kâ)ßñ —, □ □ □ «"/@&3 □ &Õê½Ó... • ê\‡°wØ° ¾ /ȫ̄mox □ W¼Cf_>
 -šÅÄ3 Êm Óæê5· □ %o '†̄̄ 9 DIp<P ĩ—
 ŠD □ uÉ> ?êéÛ •*3→yuÒ aĭöOÅ ûĭT+Û©R_
 Íbδ½"Ç)'Ò "—y\™ĭ†S÷D}, ~OÚC □ M -_p̄δI□ "E>5ó'N~P—æÉbGÅÕ ðÑ»µN
 δ □ Æ,,ªÑ(…Ûf°(LÕsöH3ð~@ □ q-}"-só"…-Rµz/ðÛÛ/W • Op#KÛo»t,ubQðãĭÛ,, U,ÅÔûØ

ý·¶,~ >Õ2°·EP8<B\$ □ □ K¼l6µi@
 □ ;fÿÿãpb½Niê@IS'2 □ [(V°z~KĪ ' □ @rÔÔ"£=èÈ†(HÖ;§ □ I&ý2t̄DÈ~46;µ°ÇđõS
 ' &!V □ «àNw}øc;Ši\ÙÉž Ñ#lÒXÚî©r oZcy=¿÷ÃEm{m □ / -
 +1½ðz 9¬=zá □ □ ÆlfmÐ'pç □ jQK,TÓÖσV:e6ÿ» □ }· □ A □ £MØ ÔσpÂicep7YÈfÛ □ 'Y □
 •0»4C k ã-%
 ôÆø;rúü® #|x gXÆç°ýÉ; □ \$ □ ™·l)Úf\$âBØø □ vyRç +ÁP' □
 u%t(.r □ 2F>çh □ >êp □ □ □ åÔÈ± □ ... □ §§t(£(e² □ ~5)-<¶'...á,5÷Û □ 8F □ d

Ä”ðI□ puwLsáØ Ì;4by _ Â

»OüVf...-Wµrðýø”³⁴ñ¹□ ç”7G\$ú,« SÛCj0s÷ç□ Ù[r□ Þ«‡Ø”M!qsô•tâJ²iÏ□ [7nQ-

¶Ð9

{Çg{e“

[Zi .İ°6Š#•ç ¥ç□ Qi9ÄLB?mð8q/lµÞ*Hg÷dÿ□ ä†çÃ)£pQç;ú • C-

’âDs(□ %ÙÑ£ ú□ <r6£½%ú×• Dwfyäªâûgê°±§T ã□ É□ ÊI□ «v<s[m±~Ä¥âSJ’Â□ □ ëÙ’‡’

L□ ãû°w□ îô<Eù||‘q•j □ ê>□ -ø1\$Ú~ãÙ□ Zbf}ÖE|ÏËáÏr5,□ Æ□ □ ç!Èá□ KsfÙÁÇ2□ ò

Ëî ¾Ô]TIÍ§Ó Ñ% ÷□ ,,...¬M,)Ñ

úáÖà;wÄ□ À,^<Îý□ 0i, *fK□ ¾q—(• 8¶PÇH—|€

-iÿœ±Søoy_—

Wg|L“<ã"Îkiää<aŽ ðY□ };ùë>~TWË<099Ó4&ji(©□—wb,K"□ ,o‘□ <H□ e1fm`™}-E

□ ·'□ āR×A fjð¶ÄÜfi1N□)|EhP!{’Îr□ z—âA Yók,Ï (+Z-

E¯iÚQ`Ah□ ™□ v>®Aß®ev□ Ê>ÑÂTg2ÍC_‰§.d

ÚR □ □ ... □ μnäBéd,,ÄèN©OWöÍÈ‡E*~ûiÃ×"è-N½k²F<@†B'Ç:

Ù □ ...vŸZ÷áÑm aKkÛZÁeA>óèvûÁVUA=)Q □ ¼,,Gê|Êé □ -Œ(Š,ò8ôÂ

'çaÖÃÍœxxü='œK«h6DŠ □ □ C,«h²ÍÄÆ?k •®[Júb,/ØW> □ ‡Đ¶ □ Î1 □ ~êŠí™Š/öê»|ÖÿÀTÀ•

Lóf rīg î ¥ÿâÃ • • Ž5 :Ì FÌ³&

□ $\sim \hat{V}O < f, 4^{TM} \neq 0$ □ □

Ž9 |ñÓ2¼□ δ×|ÁĐ_i”Óc! ÜX}ç

î»½¼''ö:Àh□ ŪiQ6...@ÎÑ • +

)|øÄ'ž zü}

aß9;Ö³ÃÃãf □ ēy¾ □ p^ýu □ ±Ÿ?vph°Bq²ŵ / 'â □ •¬T¶ □ ¬j

Åü'ì×

-ÿ«Òù À½

æ§1*÷ËyÊ~}>OëË«ÝØè,6D Ši^âð!¶çXi,%,% I|?°ëQ>°*âV= D/28 %Ý¯4³/4ú±ä|ó_¾4v¶-
 ©y7a7®ÒœèøûfÔ“ZQAIøMi X¿ □ t'éÃe,fË9,2C}4Íú
 kGEÑçx,ÛR?¼ð □ s<†@...ý □ ÇE# □ Ýª □ E®'>NúNd¶ðã• ökPÉ©Â-ëÎNâRJ2 —
 LÃœ% □ I □ ¥%ø'pà □ Ð%ô>R>DÂâÒÃ™Ød°ddçÍ9)¿?
 : □ ·øÛ© □ %öÂ □ ýq¼ä □ □ Rfķ¿÷L ,—ðXRB&¾ÊâÚú,7B
 ÅûÖ8zXoÕApÖ • ÄÍ€ 0 X¹™ûÔ bÿ,/⁂?•ò6× □ S#«9æ» □ Ú □ □ orr □ □ c0Õ|”R&I'Cc•y
 ÿ □ ø)ÿ □ Å\$å
 s-6±â®'zCR5O4âG° nîðÊfÃ xé qJk M«Ò)êq.Î-
 N&@†mMi\$âu¶j □ □ ž ÍÔ± Êèæ D 7hÑ×ð·ÊJ ¥§ □ > □ °
 4ª!§ • 9\·.i.Á×iZ-~ □ □ Â3dbq- □ y □ JFø`jüñœÛj£³ éi& °Íéfs □ 6Ýó~e>Óh/~òÔçN □
 wÌ›n0Pdu □ %œE1P □ « □ \$†\$Â*ÝB5ÛEÒ•,Z°IÐ6F^ □ ÆÛp|#m □ □ KæX~\$α
 ÍXÂ&'Æμ □ J □ Ø(”“V«5%%ødâL-^—Ó¼°)çÛÕ □ w†-fC9ç ýÈÂ)@
 ÄÅ§ O 6€ g-qŠÀsR □ , □ «“0œÀ'f □ U

zJ<œEÁ-Ã>O• □ □ wp□@-“fšÅ×□ éE {Üö {HÜ □ ~È E9 □ ±)7 □ ©Ú§C±‘ □ 9t □ d| □ p”_ □ □ /9>
 E =¼—YÄ □ ”œÚ^Ú*âPâ □ •t™‡÷ðã] □ ÐœYRð □ 9GP'§ □ □œÕu©
 ø\$7k9ÁhÄ` Ð

ø á` □ Z}æβxa\$| □ åQ □ >%&RÆÜ/▷O)é □ ÑÝ± □ !.àÚ@ □ z/)ãÉÄ, ”œD°tpÚ*2-3[

Ãä8‡DB^□, □ TJÛR_ç—b‡□ G‘K̄A□ d□ ûÉWÓ“øô—K,P-
 R×â6Aß%½gÄrÍA□ □ ±==>™[’Ó c ,Õ ÀX§ûqBä Üm "—RμT¹G
 Ě,,-ébÝØñœe!" ,:xuáÀY^⊞P\$]_bšCIPš&AªwÑ□ Ø-ô å...q>□ n

* □ ŠĂs¼ÚDQ

¶μÛ

sÚ4ð°^W:Ø¿ý • ò,ë... '2-

ÊFo 1?±P×ÖS jRÉÑðÁ7† □ kÌ • ^ûW×up¿ • a£ }

ô • ½ÐýÉ<óÝ´"1Îeê-ÚQØ5-zh □ n □ Æ³ÿJ³eð ôµ <ÀkÀ □ ¼rN“ □

Šß □ ,°ääL □ °Æ|+Jò Ô o

× □ ... ¯ÖEIP`3%ëDCE.hşNÜV“ á´ +7•3 «O|O|<£ gëAäÕ D ÆèÖuñ³ çøq wk

ÏÑE □ ÒüJ □ #/•”r’>¾Ê·Ñ<+’ã □ » □ i,,ÒHc)ß] □ ý\$#É9 lªT™YlšŠÛA □ j&6

ñ1\Y“;...¶<Ð,,« □ 0}ÁÉ•,0ðU □ □ ñuÚâ=öÍ* □ 85xº ;§".i¶ÓØ’tÝ`FÐ’ð □ □™ ~Õ

□ ’æqeP’ÆRfñöWj×mP†0£0W □ Ód»Ô¼

”^ □ □ »y?vX¶f,NGö □ èõX u , ‘Ø~Òh ò%+Ã’/gá’|°k@ □ o×Fè»•Í£T3`ÿ □ ĩG-Ë<íR,Úðý

³Vo•l@‡0 □ ²öQSA0 a^ □ ‘n □ ` QĒĂăÊîñÇ’&Æ»D(|B

x(l uÖðät` WÊT™öyâÌHÙ □ j □ À’Ç □ î’UÖØÇ¿ □ □ μ... □ ¥ă\$ÑØ@Gİ±I5 □ æè!”59

+`R` P. □ +|X^@8J¹D-i\$% □ d“«Å»O£Ø2ë<wD³YÙ§

vL™* □ V%/’h~“ û □ œ®’yÍ □ LY=+ÚÈ □ s û`à

...G □ Ê]e<6¶ □ 2%o

^ÆšzY%-¶|ë°°% □ CE □ "Yâα-~i4Å&ě§@Õ}éY‡Á'CEB'Áò □ İYfÜîgà<¼ æÃk, □ μ □ □ ~ □ ~

$$D \cdot \hat{U}_\mu - \beta \hat{A}^{\text{TMET}} \propto$$

$\tilde{O}^{\sim} \acute{E}y$

a...1 $\square^k, \square p$

LŒ—•´(

6/ -!Eçµ¥¹6ĩzÍ/Òì“□ QV!□ ¾WÇËWÍ□ Y7;6K□ “>.:“ù□ ÉØ.ÉŒ ÚáÂ-

myD□ 0@...Eêæ

ÓfD□ êñÂ@...ñT□□ à)}ÖfG†m{ñùr£!,°müW“□ R>P-ß(Ô%omo□ &□ ÇgN§¾#xò□ ÌOQE÷Ø|

Ö“Ø□ döfšD•£þþ,□ ý<:□ ’æ3@ê;ÛÏçÛ_erp KW• :4.Ž @z±P•

Ñ÷C(o9\$2ÇŠê>,□ •÷ r (©>îáZ)Ë7sh^üB/Kwe6□ ÷©¹

þ

šW\haû,zú}µr'súTkV-Gÿí D''

À•—FXmYØ•ÒQŸÛ× k6Â4ßÎçšŠ□ VðÊ-êiÊ?i••Ži;cW bIU

§ŸÃÊ } *3¼•³ÖbßÛ9e

FN&IÁ|BMOG □ ÛÈ {g§•rμZp÷ùÂÎ JSa| □ ı,,l-μ=) □ Íá· □ ‡?™DÕ“ □ -,
 ŷL\ u²YÖYÇÝ~3š □ Ü

“ □ V:ôÔiØÒVΨ:WÄÓç^jæÇN’v§ÔFIš6%og □ ëÄ □ ;w}~Ak □ çdš5 □ ĪJBèAâlyI’ ADD´
 é...jt@”³¼ëüSS =o÷fââ¹ □ ê4...˙ • Ü[°4ùÒ • • Ô 9°É^© &¼&±ýîõD

¥0İ% □ xîF. □ Üœa □ ©s □ ' □ ”pñ`4ðàT □ qâ&”, xááī5°ÑáoJ! < □ ‡ □ ¥ÆD < š... "U □ □ Ú □ ^ □ μ □ %oo
{5÷...œēμεÈ
[Mú a □ Ūβ^ò¥ □ Đ... □ gŌi+œp"?Xζwgfn, {S
=¼wpr

Fp'Q Hùé²\$“□ >—□ CE¼iœô3)dÂ•E ø\$Z □ ¾>1,`àì¯í-½Y_“bí0ð/iDudg®L¯ö-
 □ Ĩ[□ Ĩ•f,-XLl • [ýP*xôz • •T c_P+{ Ôoº½.;ÝJpÏÖ • ¼9(6 üMAÄÄÜ5=çú ùóó
 —€ ž ° _LPHë • 1Yfa, KI-6□ i_Ù'¾ØšÈÈPb|Â ! tB • c[Ÿc;#c μ·ç Âraë*ðR 5V¬a'À

□ ūl`□ › H°_`□ Á î Ì Vp "Mā~5Y`™½B!

ÔBS3®Á □ Xqfò'Zx<5ØKÈfáç □ ð I □ áÚ™\$ □ ½αα“ „&Â”ÎË,~\$Ô%Ò □ ±-} %“««§ÔÍ<õR
 Ä÷@δ\$C§™»ÕÁEç-
 ÿ-Ñ'K □ ' □ s%§%~ËÖ>,û,Îê.êα+ ÝÔiÝ9 □ n|VÛ°× □ 4/ □ „^ □ À □ §Ñ^ñ'³) □ šr>±·ÝiÛØÛMlt+
 9?N1·ÿ •¾43c÷ãñ,Ä,ªð Ýb;]® Kq¥q¹, □ "...Jê..."ÑC
 H, _Öä0ið—4...Wo □ 1]ð'ØT)

Å

ÐþJh[Ã • é* ñ(Dí'üË

NL ?'Ý1?î&uÛÑZüøäæ|zz<?''!% • 1X±(-

"ÎN ÇO`•bÎZPH¼" êB² 3□ f n□ à±ñàÛà

'£,ý □ NU''Q5Yà‡B''...F°-íâGøZøR4nKá □ ãûí†^üvç%oÆö''ç•ä,³ € Â

□ □ ?'f&δ%z(□ RÝ□ l“6Ôãmñûa"□ "]i-G.)ÒÎz...‘4Ý³□ /Í^äÚ

O ÿ ½>è5Ä¯“«»f`R[r{R•ô-□ U;ÏJDP~§qy7IE□ R¯ç□)S(9δ!™®e(Q□ Í&»
 šç□ Ò»xa\$|X.KWÚòS%ox±Vã,°Äù-Æâð;çcéh¯4Ë¯p3□ à□ ²š+æ-ÒÉÉÜ ~r...l 6īœ
 ÊÞY¹R-iïWt VôÍw/M•l,nCU

àU 7

– –fÔó[V–80 Ö~0M{pí_ CD □ T(ñíxp~jŠÙh,Q ðãççÝN;8i'5o§ □
q<&Vßyã"÷"÷<βwçvÖj°nWš □ =
NŠÔt}ñ □ y □ □ 9MÇ>fr9~&îÉLDéJyEpmKL*r/auÄ]c; £z é£Û"â? □ ' □ ow¥ □ □ ‡]ÒíuÁwc,
ËÛyí Gf'"q-2~ □ ô,Ô □ ZÚ|+“

È □ sñ □ ë~G@iό<òÃNd½•ç^amœHqÃ □ KWδ □ □ □ ” □ @p!'1

âU%±š □ - • .>d÷

ðf!QMdÆp □ Äø □ %ölöLÊ`Ãä □ ÑOcÎÚæ9^{ra} □ d

'=Äf-i4Sff±%oÁ<v□ J³/₄I³,,Đ,,1cN□Ž' A²y) ôĐ □ †“j%Mu m
 työ□ LāHĀ□ =□ D-tā□ =“ûuÚwÓ¹/₄!EA§4mĪ|OÝVLGÄF□ Ě”mĀ...
 JG;č;ëk3×·Nó Ó€ à 6å#Bóî`%oþ:m;éØÓŮ;|x>ê|l“9—Pø±#□ O'□ Pv Šîb□ Š@ˆ
 9cW • iÿ£gμ-°Ö

Ç^KÊđ='Ugřá-¼ □ jã}öèí-%oogμÎšî< □ @'ÀÛ=Ûw"oiÊia=Ps²Óz¼FÓe=Õ...• Êd p^ñ

r^â{ÔrÑGz¼@Æn/†5j=byîÄ÷|<,ç†•EP

Œ □ l- /- /?C:j

“Tα û%ov+y;©^1E»iENliî □ œî•-ÁíŷÁd:

ç!Ÿë:ûõù □ 3§šB%oç,üšÚ

OkNI fQÉ

:—çH-‡"T`E □ Íqykiwe]©%æ½>ª □—

eç‡oß%ow™-Wlâ”~0%ÇZI □ y\$Ø! !í)é □ †æfí@(□ ‡]• Ū_ë

J □ ^fû| □ ”Đ¯@j^Yy³Ôfþ;|Aç Ū°vfPè "b}Àúâ

%ÍÁ~!i% -°Ô

ç •

3.ûâ “ “ „,V e iç jI7,:@¥N ? ¯Ý Ó”ð É p f /|8^aiiÝ:zæ½fŠð-j-š ¾Ā ×”
|ç-D.Ìerx7âo\Ōý IfíQ

fëÛ_Bç~di4ä(È0ce' <

ÿÁaÝijH9'•âm¿éÝsd>'

H½ÀÖs □ Íû¬^“Yªkñ|† □ ^ □ \$'ÅNØ n×'º

.hGÁ?à □ KD³ □ Í• □ ©vxû×H:ÍZ~qæÕ.Ò†C·ÙÒ □ ³*Sk~ □ δ?¿ç·EzPÚ-

JÖ^~d,‡i%@i1Íý □ μÑ{Vè □ Ì>”**òt†ū KØ □ ”KiFÔ½,fN“ □ □ <löcM([RNÈ Y\² □ Ò½f‡

B1g (r! □ ^öyPÐ □ RBãüã¿Bô æL»â

‘ □ Â%Ò'æ6öen>Kç'L'ä,üã¿pñ·Òw"añ8¶Ì>[B9

ªåÓ“r•Ù«-o•«§'ÇGÒ1ùÍ[êuí □ ÄS™H²Ù □ daLfâº ë...^ÝÕÉ □ §ð'ÖÄ>ÜWq_e}R™

° ë)DôÀPG>,□ Å • :

ih Ó+iè□ MœUÓ'yÁ□ ;n'¥<ÿPÂ 2'^ÛfðZ<SB-

d"ä}RßWö 2áÛ□ Éñ□ Û~+p*□ gá°t°_pá,,yú¾4tPÖ|ÒÂ

w&Oü"písvü<<úO@□ Ÿ□ aix□ ä□ y, '3ªÛPæ'¾4ÀÇª;wÄ<&~ðÆ[jØpÄ(¥ª...

mÛ#ùÓÆf□ ^Ñízé•sPp;2'Çž wV,§ -!Â • {» • ¥ÇáLàcj†•cRfl·13Û

}ä}rRµTEŠ>LøÇPe(Ž RN¥]— .¥fápê□ ›•yo•

«; ¯n • ÃMi ¯°\n • Ö—b‡â†êÁv0n<□ ..''if□ 8ÇqeMs5□

□ ÀiMá' □ v+G; ¥öÄ†iFĩñêüÀ • öÆW&Eè"jê3 •ª

ÊË= 1 ÛØ%"+ yQb´
 Óøo6O\$ Éš×

b2S±Åg^aO n2 § Ěí@-Zp^o#□ 0_cekùíÁIáàû») ³sæ&\ýý LÂ 1Sĥn ãý°-
 9 S ěDÁ¶——Öp□ □ □ +òÌ‘ÁæâîÃY<,,¼E-pž-Æ¹□ °R~-ÈÅÈ±Å - —□ %oP,=°&‘i'

~ÜJ □ â 9QÀ À«J•B•±°X<±μ (òö—:G aŽ |²€ ?)ÖÔ(P -
 ©¹ äÊ¹ ™òàK □ @éQ8Cx —¾ !FSpeç2IA&Q^{ap}-•ÆμÅuj □ XMCEã.2ÇÂ-®X •
 WYØà-U. _Š= □ :š □ □ ç'4þ □ BÆ[^% □ H@nyJQ4ATD/‘ AäT 9t Ž \ ¾

J³/₄EY<□ □ □ †V5}‡:ò-çy8dqq, Ì<·P.E³/₄ûpY«ýbë%orëE□ Ø;½å ÑwOa E;§`Ž ó-
 □ □ ±Ë³...ø(ÁÚ® g p G \["B¶•¶ J'|'f□

Ö-IFh<Š|^PÆgb»ðvù_¾““Đ|S • söb Ê □ TM8 □ 4İ ó □ Ä”‡è50!→İ%ý+aËÈÀ □ \$μM«Jœ4-
œþvÊDç □) □ %o`UÃ« □ -&4Eä4© □ ´èèlø4WœfQ%o □ ^ □ .LC?ª) □ BøpZ>´^ □ ^K □ œ,%u □ Î%o{î
Á • óä Γ □ KEâ □ À □ -¾

ÇK@” □ i6ybíÇÊ- □ □ 2¥3LU” □ ðç □ Ÿ _}WËö-ª,Îé/ □ • □ 8=>šû

Ó □ ’7 □ Ôâ?a □ Qœg □ {“„FÄT(„,μc □ Z”1×o □ » □ Rßf ^P

Ba

#~usû< • Ũ Đ\ @GÿêfsÊ P« !ð;

\ŠÈ □ eAüÙt_μC □ i □ L □ ið_Q,“:ÿª©_4hÂc ö

!Dþ: Þ,Ũ O%8¬ NF □ „W\I““TMœ’-,±z4 □ □ ŒJªμ«/*%ªœ+ °Ì_δW%ù □ Oy,,J÷óŠ μž è

D-.

Ý6^7eÑ-

Ž • w^ag»» K÷Ø#PD~ip ; ;8hfÃH,Āpâ£ × J Ý %âÍlcù°š Ø ¼S ~±V ö³/4vScTG
 „Ç}ÅA÷ @ 'âô(BT Ū _/:FÇ "úÁj‘GÿÀXœÇ È UñàI C ú•<° tñFÝ% Ü _
 %%' ilFilÈÆ P P¼j B œÖÛ• p7iÛ×“ÃÒNp(§3H<XB"g™]±Bä# ×•gÛ ÂÑi2Wàd
 e:œU› ’ ““• [uäiv `-Õ

$\delta \square \frac{3}{4} \acute{U}'' \square$

$\acute{Y} \ \ddot{U} \llcorner \bullet \ \tilde{O} = | \ \ddot{U} Y O w \cdot \wedge - x \hat{E} \hat{I}'' \square \ \text{\%} \circ A \ " \tilde{A} \square \ \hat{h} \ \frac{1}{2}$

è"u • }äÇ □ † \$†!\$ □ •G ù BLnCÛ† □ Ñ □ ,>è° r ÉMlrX ÀvÛ" \} ÓgÔá1 £è P¾~è
 ñ JKä&ÊG &±úy. • (~ÑËl)Æjðβ,qÆbI □ '™Jy

;μ □ □ ~)I⊗@À. Óv^ δV

a^{1 a} bÉ Ê§û ¶' 0 Ò=, □ œ"ôË Îö~ùÈØ&tA+-

iTæ^èÔ,,DL¶j □ Ëx×ç;"m€ è ¾A&_u»] \Ög~yRf • £{ÝÖ-⟨q?© □ ù □ âÚóÄÖì'® □

äÇY>N n-÷Ö²R1 #Êj"r~ 6e0TrH'ä<nýμ • vp² • ¼ûT'Zj'2Óç-

³KSEÂÉ'ú6_*6 m>ê □ ö}P □ gÇ~w>,,‡šyãôµ ¼ñ • ý³è V÷ûÔ' □ _êÇÒ÷ ^am\$enå9ÌZ

£,¼î‘š:N< ó\$; •(Á^çî)Ñ̃ k¥ðμÝ^ú™i□ÿf%o,, □ž pƆ@gIyHƆMk-
 Ò1o•°ÒÆ<pb⁻\$-1 2ðQ ù,μƆ\$¹Sõ J víÓdê,ø½A¨>Ñ\$□k□ □%öüvϕooÆV•.Ë9] æÆB(ª
 mÚ`Xîr

3 2ò<°•: VfÚ°|ÚèóÍ2J□_&|†ëLãTD□□•Çs´ ? n|,zž hp•z6(\ÒD 0 È 5hQ(□ H^æ•
°dÊ

HÆ×5Ÿ,,M'gn È•Ò □□,,îANò ã\$]: JÍ <-
 •ê1nĐ~âà€ è±z!zð-9âHša*βORù"„'inéN2 ÓM (^¶X¹÷é'n
 XBÚëÔ6□ X~ýàÈ□•ÚÙ8\$mÄä¥óß

-³MúTĐ\$½F±Oi □ \$1"“^|" □ ^KÍT3'
0°%\$s%-9Ü6+ □ ‘Û¹ýùÆãÆó æâ×[»Ê □ h{ÿ...» □

;±̄£¶ßÀšý!;9c“S □ îiyu¹ÆÛÑ-

□ œÉeZÇgñ.Ø·6□ ¼^>¶Ñm»Áæ¹□ åUÓ^gnkÕ7α»‘G©

šÄ

o¼g>β □ ýl3@fÄ{‘7ÄY ÐxβÂJîç-æ ēÎÊêÒRiÚñD □ ð □ yfæ%qmU
yC □ □ â34*6 □ "ææ|İff □ s,dÄÄw6Öv8 □ ôL@8sÖöâi/.-Ña;o~3uÚä
rvî†§ª-)(□ ,)HÎÛ_μ □ «A!j‘cyCÐÚRqJÈu0wCE¶el{” □ JZ □ mËä
jq,(qçW,,μ“^Ú%o-ñ#.i □ ±p □ 7¥Š°D€ -ÐHBcy7T'wÍRû”Ök
e@Ú!«\4áŠ-P°0 °T1H@ 7μjJðm .

÷`—çR îŠd•É. Æ :-;Î<RRĐĪ-^ØÙ □ yn¼T4Ôã%°;TM0“

'âp • æ

:4° □ &I3,Z7nŠ □ °?šç ö“IDNj,}:‘ê²Û²|Àõ)!4u □ lîh □ ÷ □ yjW™pK0%nYæ’Û □ □ fø,
u¾4Ð& ‘æ • € ßiÄ=‡ {Ëæ □ ‡ □ DzM‘Má7

ø-i □ ,af×Û- □ æf,hÔ

ßp"\$çy,NÁ □ KWdé □ ÐÐ(‘É†< □ □ Óý2k©EμpªÇf’>, □ Ð¼đl!%ocÚ’?Šá □ ~x@gå

ÏeÛÉÒSšÍ(Å

úAÚ<Ð ÁiTg;|¥ □ fçð □ 4i □ ~iüPùøñ±Uâ|oÙØ¶¥ÄÈÈæèù“9VâÍCv □ UU<î □ ¥PÛ □ %i □ k,J{4“
Ó □ □ giÎ°ð|« □ Ð □ °ÛæØ □ qa
Ío □ □ □ O12 □ šN~ □ □ ôμ □ Îÿ...“ÒNéôâiC_ □ æÇâuÛZÿ“ „ÐX»Šdöiã• ~Æ=[F □ Óà □ “)¹X
□ □ "fææ □ jNWš~ð°ZL □ Ö

□ □ Ä-ÿóæN □ úbÈ²y □ á†^ö-’@-zwZ • I,B

Æ\$Ît ð Ó~O... *V§D ;|<V-è <Yç
 'E g m1N^ÜÖ Ø¥âM¼'α:*wük{cË[8~)Êhù¶+4Ñx¯ð~
 †iË,,H" i/Ŵ1Ø~é~v U¼ R HzüÛÿ«-ÎM ÔýX@Î{"MSY5ÁÕ^ à ™Æ+⟨⟩q^

o.-@IO ÷l ·6;

^agBX®

•P &€ Ì@ÅIOPN kH,VMÔ@z•q †>□-
 Ü =÷□ z;«Ðyã7□ FkÃoÖý!,,çö) Êgúj+yu •¼ªê«O-ÏÕ
 ·Yf^{o2}rñpÛRiyôÛÏU •IÈ Pf'áíâ-×+o_ .«Ð'6¼ÏçI□ Úç÷ÏVWV×^_ ÿ~æÔ~zyláÍÚ×«o□ U

øÖâ¥Wk—Íw

.Ñ □ Çiem¥,ã™s.ÿ• □ '6.,ÚGúr/.Ö,,lãý³JCñ“ü □ fñ«ãÝÊv¥tðò÷-â«ÚÑÍ^è¶@ýÚ.±mO—
ÓÝ@ÿ&i μ?Drt4£

□ ‘ÚíÖÆ«WQis*±èeÐòš||;ÍÿáÕ+;□ ú+6äÚ+jÉš<O°}í6⁻¹/4RÔbH

EnyŠš-vy†p55'' □ â,N' □ □ 9ö
;Ú Ê ÉĪE\y:³^ýóÝ],0

°Å • Wöo¼ÚäyícñêÁWkP|ôY5si!Â.

>|{fE □ /Cö*⁻ ällf• xýÖ@_ -Ë|Êk'Üð ç-'†Ä/-ÉR° □ QX«²'æ5<SÍÚμ¼

ñû⁻øRü □ Þα{]!e,,qÍ? □ BÈùþ □ y^ □ □ w7>_†
 ù7,¼tØ-Ì

$\hat{U}DEP \cdot]4t$
 $q\tilde{A}\phi\zeta - 0j\dot{y}t\phi \cdot <70^a - wo$

"yf¾ •EiÖ

d¼:-zÓùòpÙÛ×Ë-õ ©O□ >Ä7dX□ iŸ½Y”y3□ !S[n^è Û®_7⁻¹A½É}â‘Ú—
 ü©7;NÄ4ý7⁻ □ ...\$⁻7□ =ÅkÄfôóíîÊâ □ OX□ tvyU⁻+J³Ú©Ç<Çø?;J/,ãŸ□
 ð1ªim] ÌF÷ä; Ú×æ½ □ {ÃÛMŒ°IV)Û÷l'MMÃxÑ<òÉ□ úqÑ⁻Ë⁻y ãrÂÛ9—
 %øøJ†6d□ □ £^ i^:IÛ,Ç~7~§□ □ :1ë_Š ¶U□ □ \Ê-T,¼²¶[ZbóLÉ,

v“r#P2ÄðÖÖíµ·Éæ2)Ž -oðÇ ì\,Ÿ...Ò...Ůϕ(D<FgÃù±T... ùd¿ôý<Ó|2÷ÇŸ·j□ ½Éë• \$Ê7t;Ì®
 -~êŽŸ,úcô j-äÄiŮðÖâš*□ ë,H□ <ªŮ½ä\FŮd?Êj,,Y½-üÑ{B x

é øàŠšq7-L,X” □ M<.Him²@iÄ
 €

ü □ ³2 □ ãÔIWPZû¼đ±^ÖZ~¹iîÓ³^B` □ ³ □ \$Hö”Tí)ä Đ □ GÚÚβ □ „]ûW×
 ³@Ûh(ÝBú ~øOÆ ¾»¥{, □ □ iò9 □ ÞØÆþÄ □ ! □ >9†ËX `Â%Ûi8 ´¬F 3xCÃ<êÂMKk
 ,cýÉ, □ □ “AyÁ<iéz □ <Y¬Fø•µ¼PzđI áC □ Ë □ “ {θ
 GÄè þ QO □ áÖ`â □ ½ □ ·””Ç □ lsäÖ=>IV □ [.a({x: □ iªµ,,=€€ ",¹êMP

2 □ ÉμiW)-'™^~ ,‡'NH~«~K™A·-|¼Êp

%Ë\N:yë...`Àô^dÁ™Öfl □ s° □ ...>71é

Õ<×iÿeè° (□ ø0İiyÍÚ>ðΨ·bÚäl“ÕgÑÛnËÍ □ kAøÊ'Ù@

B%CE@μ-,Äðzeã`P×ãêéÙÑÿgikzÛf²tÿ ` ÆÎ+Éß B€ –
 åÄÝ%oi+;i zGI´Íw(QMJJ:<Á ³šÅ]Íêî`iÅ
 d1Èíí,£ýü^ù%÷9UESÿ'1“ I×`Ð¯cÉ «êÔù|ÍsÚ©

Û±0*zT_ñò (ç¥âQä Eù|,ç • ÁC Ž Æð
 |ÄBÖDT%WÖ”sj1<”.W ÐP.ØçQdW|Æg 7 kù_1ò |fñ“Í ,J§K œ9μ ò ^: Ú
 jñUÌ ¹™«,x‘¥Sα© k·0fOØ%Æí z
 NãŽ ôkØ4Eä´ | Y<²³#ØÄi6Oé ;ã^`Å99 g/ øKp • ã-iÀ%o+L è= 9Nó™ Ð

>4 bMâM† û;# AØ`Ò†
 [I+ÑŠ§>=6Ö?¾Ö.~ÒÜ ä è S

%f
ÄK □ êHiš©

ô □ ÉJóÃ } / □ î2Í£,ù,, @ÿh^ • @vÖ • û ã>¨ÚŠ×õÈ
 ½ m °í □ □ mS÷•ç □ “ □ □ O □ ›ð6õ □ =çæ_jÑBael □ ÑEWPl±^;zÿ95û&^‡æ □ {ÿ7^a

ë
 Ú>'«□ Ó«fv□ æ8SS□ Þ□ Ý□ Xhñ_□ þeÖ†Q¼3ÜÁ]7áI
 □ èfå}ö£<é#.ûB• 56^!ù³Â/Æ "ukÁß c
 }‡÷□ H

äë, _!Ôp|8iwPkçç%Ô‡aa'ç□□ „Ø,}f' □ 0...□ D□ □ I™/tø™ä!ÖÚFÜG,@Ös□ DÁ •ü|@
 □ □ □ O˘?0ø™→□ □ BâG˘Ô˘˘y8†Iü§ Š©R;Ÿ?Â– çØÆ□ Ã÷/¶F™(±ùÉ:cÝBŸù□
 zÄ □ ,Â~çÑ P□ Ê%Àÿ!‘aÇê£□ ØJý, ep...PX • à:âî^ • ½ß Üi69²\#1→í • L£²
 þ î• þk uRTL?*

Å|€ • /i44qÇ_aü—™ßÿ □ Þ7& □ ŒÈ □ #1ûz<~g^ □ □ ç
e! m □ ~f

d→AšÓ69& • 6ã-Ñœq‡> □ %o?Û • SD w!mAPÒ
7,,H ^ □ š“

ëÿ ? %PìGÌS¥ãMÙéÙ Ò,ô 4V.ÉkÒví *ocN+ }x*s8éY 5DQ{<†û âùàa%0 <{De
‡ î ÍÓpb ^Y9<

Ä—□ ?°ÖÒPÁyY·□ xzŠ.Úú²^}‡â°E Æ?Bâ\$fH14fé,,

□ □ Š^{1,3} -lÊ/h' Èéb □ \$ó □ ãã □ ²⁷ □ l íÄ]ósg®^ˆ eÅuMÊ·Xđ*q_ õuŸÅÃ×toN
 Ó£Ã\$Ukû©P □ ~□ □ □ |æ^0 □ ĩéODqF

·†â

□ <P1q□ ,2©□ nœéô&(w□ oîMP^{-1/2}9{×zÛ9»Z{“Çãe^{1/2}B%oÆÝWÊÛYGëœ¬[ÊÿP)ÀK□ ¼p`
œÝTMÑñÇœäÃ=6*êãæ ÆdBØ°zeUŽAà”è«S□ □ÖE3O□¬...•?Ùék^{3/4}8T®□)¥□ •,è@ μÂ
œø□ í□ !ãêÕr□

9oÑÃ íŠã‡W¬¬æ^{1/4}Äû°O+..Y "áb<V5Ãž pÑÕMLÍ-

Ô□ 9’¶Û^{1/4}<9í{□ □ (sPO□ å§)6&°ÏÇ\$□ □ öid!N□ □ □ b(□ Óx...p1X¬Ä□ û°□ 7ÀÖ`□ □ J#Hm;¬ì
•rÅÈ1

-õc0"! • `9'

'b(>é ÅPA Å1Ñ œ +Pí

ü½-ü,ÜB^YZ' -Û* °r5íQŽ,,c©^®È,,o*a □ ý □ ^Yİ □ | □ E',ø

ÜÏ- □ %oöû □ r¥ø",×4 □ I □ □ C' □ 9¥È)'-[çZJ]i

$$+k\hat{a}\times b^2\ddot{E}\square\cdot\dot{e}{}^{\prime}{}_2f$$

□ ©eNíç~ □ 4Ÿ □ ÂÓ~ÔMEY1 □ □ fÔw □
Ú×ž HÉKJRð á ^-Ô

¥G©□ C|pÃ¾48s' ¯r+Ä<Š#~à]E□ ^qDÛ4h□ □ □ "ø□)e□-E
 0(î#"□ Qi□ Âϕ<ÒÒû□ >M□ æzL÷EÕ
 UûÚe« □ □ □ '□ ä□ FUGyè½Ûsl□ Ø□ z;PëÖÄ&¹□ □ N#ôz□ □ □ ‡□ -øØ{□ □ □ ó...□ □ §ûĐÇ
 ø□ □â%oÀš• Û0Í·C ðÒÃ½ñ°é í·FÛ·ø:{JÍõx ¾4w + "DÚ ÁÁ

9nOT· úÆÚñD

Xœ;

ôi€ ðàú

Mr -

BL CF ÷Ú÷üç

\$ír(Ex±' □ †<¾h`°óý]ÈÀæ âæ—A^GjamÂ~Óîç\$ Ö • ÚÍsbEÁ'€ N)l-

□ ,ó }æy.© • ©iÀS

j,,çë □ ®•² &<-

O ô □ lø> □ È“ □ □ \$YøB9£f□ Úæ □ □ ±•ÉØ\$@4 Ò □ Ñ© □ ;fôá9'CÆ □ 1pÇp4™

zd~oH^~—aqhZ ÆÐ8Èà”,

Ê CA4- «ÀÛ □ ‡J³'ÛW• î2isÖPž ½ùĐz+9iJ- 1Ï3a| ©Ç' □ šÇŠ^N □ μ
 ÖÎ©£\Û©kiv%|ÓĐ] y □ □ Å □ X □ 2 □ y' □ IDWñíc Y\$CαÅtoÚ%øç'¼ò"\$€ 3GÓmäXYêŽ

<ÚÁ □ ©'çš2q □ r

™ □ à] fj □ gβû □ Ą!Ÿ\$Ù'3^y □ ©²Ow³⁄₄JSÜhb!&°nHà×^ □ □ < □ y4w(□ P

□ œ— z«àp`² àà • «BS—1`ž

δ{!÷uË □ È4Ú □ @HÏY£™‘ÄiÀ<%Pœæç7

~□ s¶ tCE'□ ^V@>h □ □ □ □ cō“[û¶:wil@~=-Ãž ^ > I.jpãn
úÉ,7G@□ =ëð3' _Êµφ§m...□ z4

²p-H3òd:†Qô`□)9M¥.>□ È§~ ¼ifÎW³]βa • \$ á1 >¼vàmÎ*

X9Àü!f"×¥NG^□ ...□ ühΓ· ¾ e‡□ K□ □ □ %*%ÈU□ šŠ\$ìØ□ OÈ[Ö□ □ 8

» □ ËIö" •MT ù ØVyé^ □ "¥-?Uy

£ □ ½gYiÖYIy—

í Uç" c,m □ 2 □ ÇiFlýØ1ol □ L □ -iYÖ×@/;Ä Ûy¶|Øy³/₄¹³/₄Äg@[fÚIPÅ, /0 ðÙ--Ô □ □ ;^ □
 Ú/Èkkðv†^mÖ □ tY □ c □ □ íáj3 □ ši×;pě]m=D(Aú □ V p»#Lb†»ßÖ—=

DÖ9ÇYku;5Ô+g_ -çû"Ãýi □ □ “56Qě-ê-” „çÍíO □ ÓŽ • Đ -

&¬×

là `é;ÃÅ{ • ^éz!½;H □ 2¾2rg.. □ Ú3 □ ªââ/FzB™ □ Î □ J,ðåø □ qÉ

§Ô´çĐ˙2Âa TC¼ Í) äOøHèà .
 □ Ì~°ùf†b:³¯(□ ;(ÿÂ×αG eμ

d©-mōñ<@:Ó • \$ ñ-æ<°p|hOéÁEÿ
ú

½... 'mhö'Ø ÖN]Òœú# 2r ‡6"Đ~(ÊÓ6
cÂ™aipđí@cLÍ) ×Nù~ yíf'0ªNÌ ò' 2ùe}P'³è :ú .

ß> †%%SÅOÈ>gâÿP -

... □ ± □ |è"uí%^aqcaē)p‡,°7j □ çÃ86`Èüî:‡&xâ€ p³n+Ší,q»@± □ À`É □ ³/₄Àb □ Ds8...
 Ì %TMR7»;>† □ □ |öGíyEG;—Ó
 2÷usRÌkmÉÏ-Vœ#Ø|m6½tÍ' □ ‡,,½¿%Û ké9bà • f -Fj=T[

□ (9I]f7{#P0yçmPÄ □ ÚýÊç@ªQËÑç7?,d ÖÝEÂ □ Í(□ *üØËP||î»
 ¾G'èul □ wα' □ òdE¼Çý°©%çäi%ç/
 , j%h<e±âiÛ6"N†ç;ùpUDÍ ŠCa«†`F°i,ó;Ö¾~ÈrV4 ó,³-□ ½Ã»_μMÉ{¾TMü □ ðpä»

!ç÷(h9üÈÇ ½ • T=r_¼ • ïù^t¥'i;ü □ e□□ f3>□ r^¥ÿ ,æ€ £È

ü
 ÔNÍO° Ô □ è5t@!0†z½æÚÍ □ i9š.Đ •

H^aQ>Ñ@±0j :&á⁻đ@ĈEâÿ÷Îÿ×‡6øE[^]--s Ÿ. □
 &w(³ □ cE9∞Èđ(œ □ Ò_ □ ^au7æi+2j)[ãT2ø[^]ü4çê5Kø □ □ FFĐ“lâj-îlõ □ ³ó“kâwÈ%â
 *¼?>»p#{ □ Æ+âÝÅâúI@=á‘÷ÂzýluF%oTp);I#Ô-“ □ Mσ“fÍlh
 BÂ-Ã«L~ !()

Vb
 DÜXr2Òj{K+R7TÃ»&(□ □ □ ,_ □ ‡“«£©□Î[∞]Y=ác_Eý-n)¥Û£5÷ □ OËf:N □ `¼ÃÜÜT i°-
 Ú∞îêÎ ð0ÝY@é -“löd
 «Ðœ’®²ùk-¹|púÙh¼}Üi

&6zñ

12 $\mathbb{R}^{2n} \ni (z, \bar{z}) \in \mathbb{C}^n \times \mathbb{C}^n$

Ö†H¥€ AÃ 1""¶ f*xH[*i³ 7çDB‡ ou € @-
 ÍRèbßn ^X·z M%øÖPó°RðMP ±Ëôx

” k,,Açö‡ ’

□ p²□ ?ŸÀ!ĐëÁia''%• À#^eö hf<;áÚg88%<0Çb0 jç(ÉOY

i" F à

XÆÃ#*Àÿ
®

ô 0 Ñ¾%J

` é "òôæ ÔdÌX §çN1£1dX

5 ž •

0'18÷ □ à □ CEmÂ}Î □ ðyCEÍ- □ CEÉ<ò)''s □ ànü,;p □ óa,,<.,±×ø!p'0Á©ðöâZöŷ[Ô±y,,cfù' -''
ÓðÈäÜi • ïï □ '~%o»äT} □ %>L[g•0<ÊÛ □ • ?È49u;_ðf

0Î □ ?ÖÃFDxúe- □ /ÖUt □ ÕNio □ I{ □ cä É%âmDèr : □ ²@³⁄₄§Àce □
t> p^x¶œµ>x □ βÁ-°R;i+-wíNKÊKÉðp»ð(5,°TÙ Ø1D □ □ ²Èð □ □ yàbf_•; □ %oã[5üþ3y (°x
£Rí—mô†ŠP □ ...| □ □ [2+ □ □ □ āYÓ²>•Û'°%VÉç~ □ Lx<
*îÒÑ+a¶†™“eŽ ^5nσtôÖâšËïj)ë³⁄₄ È~H† □) *Û • p ±;5ðúx □ Û·Á □ ¥@Ý%+uë%§ 7 •
ääÂ

ê<¹⁄₂" □ Gm_''3ä¹⁄₄Á4y%oá@nA"êü" (à÷Ãd"â □ Á □ ý)"(iÑñ □ {< " □ TÆ □ ¥ÿØ,,1c.Mrα·UªÐ)
kCEHÿý z ò¹⁄₄³ÿ Ð □ £7 □ ÆfwMð □ □ ze8(øÑš □ ài'æk □ <,ë† □—
“âHÑ □ µ+-£ □ I-cy¶ ^%o8\U
Ô^ùâ«çð^¥t|bÛèHG'!Ú9®· □ u/i;□_•»5'Gò □ ÚZJa&o±Öl'çù“à¶^'ü □ ³J-
Öáâ ³11³<iÛ}σ8σ&½Š“ □ í ø ï{H
w,| □ z...i• ü`<²c·p »
Ø&X/iN'£ ïÁÛ □ CEØaÀgœ l©} Í-çe □

•
]÷ÎÒÝ ½ □ i¶ □ ñP • y+_f5Bn üúkpßÖ äP □ ³⁄₄•§@ð

Fu • ìËŒÆè`c

6~uí@27;xšž ž ;H^{3/4}•px,Wç^o× !rĐ Vâ's\ÅT ç^o©d[-~zjkš □ □ □ H,h.XÍú,'é*^é□ }□

g2Fn>U‡μwí·çg²O·4□ 'ä\$\$ëGl>ÿOØóGQe□ ”¶SÛšš

[□ <□ „□ ”×§⁻; □ ù& □ } □ ÚÈ]³ □ ;hiÄ(GT/ø\$GÖ»× ò¤+w&0|!"
 Ñ_Qè)^@£2N±”□ É
 p,[J □ -êHg=¾s";”e□ G □ □ °ÚœÛT™L©g6Q’dŠ èÁ-
 □ ÈÓÔ □ Ì÷”fáí ûl# ø“ý,...Äù □ Þ(Ê □ <·p □ f?F(Óà ©H# ¹ šGB □ q

°4-RA □ DCjÙ0Kš³Á»É □ ý,W □ »€ çŽ □ ...”...jÁ
 À÷°ñ”ôœà,ýOéEy n ã%□ N
 Cü,â< • |ÁÍâ®
 □ ²iÁê □ ¡°CE& □ *½;t □ ã □ à □ □ o∞Í°(Ø{ □ ‡õ □ ðD”©ñ™Úî

†7`Z!

äÄ_âûlk"Ê~†RßÚÝS†ICE"-^•Q*:

çâ\—èæ÷à^Tž B{;N-R□ dZæL'á,zrĐ

C- ¶ä 4JJ"ã£ÒAu{Hip;

-ðëg×° @rî;²□ ^%Û²µ J ž 6flêc°O qKiB-pÚ

ÁÓNZÂÓ @0F\%ĐŸ0Ç'è÷ÈÖz³/nanæp-Nĩ□ 9 Ž 9d²Ãİ½g

Q«

Ãm - Đ-tâĐ □ u{âíò,^ □ Ą □ ~

(~%oÔôÖ □ æAα‡iö □ 4~9DCÚá □ SĪađ'¶1}7
 ü7&ŠĪĪ1¼ p □ %o1Típ □ ^{ 1
 Z;òì\\Ó¹[ôBù= □ ÂxJ{2fS`Â·'Yδ □ □ ö|ç ǎæ..... □ L5>Â □ k' □ í □ \$øv
 □ ?;N □ _X □ pšûè □ "Â □ F □ "Ô □ Ò-Ô
 □ ?T{ □]_È.±*Ä‡@ □ ç×:×gçò8«pœ‡~"ÍÃÕUúúZòcWá< □ À
 vö^ÛpμŸ9iWÓHW'8/ □ L-
 S □ œ □ ø*GÆó5Ôèâiæ □]Ñ@| □ Ø Â)fiæ □ ç, Ĩ-/ŷùÈí □ XËT' =ÚÝÙÝ9ñÀ«AÔTø•11—
 9jÖÍJgxÓäv.i'ZxÙâv¾¼g>Dn'S îgäéC[çf □ 8•Ô □ ÞbyÙ½" □ 7B>5EífænË

ščđ+Ô²Cg2^ □ ...º¾¼iryÙâvfª;âvÊĭ,,JØ¬) wH> ÚrTBÓö[

Fü8D~ "İj i uâi(ıÿpu}vzÖÖ@Ñ5-j‘
+MŸE‘‡¼Ž ÷àJ {TMC,s/□ #Pİ

Šs□ fÖB³

,Ú*ácÔkŒÝÊìQC÷yªTèû...riè@i□ □ □ □\$AŒÍ&âeŽ ä4n

đrÚ '¾Ãln
ãñ* ? P • 'Ü QyT :Ó°ó&yëC“ □ =□

-âîĈÿÑGUötlôæÿª □ □ 9 □ þ, °?Ñ ÷pÈ¾4i;

.÷øİ#ãõ³[/@Æ èİ§%Ò
 y'¶Ps□ U1ÜÜP□ [‡!5□ □ •°_È...\$
 ÿ•Ïÿòì 4ÊÀ|aÖ
 à □ §"□ ÌØø4†X□ <,,±óÐ,Û wdXV•O #Ð="}' (vªl-
 :VÂqÓ□ 'û□ ðiNœ[:TĦ7 @5 &
 ÔL0\$úmÑ! Æ- U•Qc7fġäÓé1

PG çÀi B • Đ},ěiàCcýbÉ;*ŷĂLÀ □ CûBßS{%_úèíE
 I\$HđŸÇ □ □ gò|p@UÍě Ô(ztÀ:f%A □ ô □ NøÔ^ □ ŠØ □ ĀæPîéa†-%™-nő...ĐŮ □ Öôx
 =°é a- \ä 'o|š

Ýô*RnÓ%ocÓ!e:š \$2`Æ4Ó }(. “Áç □ □ Jið □ } ž Ā>Đ!÷Gâ=“@=Xi|p1'.Ó • μ —
 5z` ‡>>Ø=ÝinNÃ̃̃μ•N\$ zy/€ ãÛM •°§ÂTíéž 2Vèðκ(-
 j □ ÛÈiýÓJ+J»ù™_çGÉà“8³É̃̃ú“¶]tÝ}qu!L5 □ K0mÚð§Û □ □ \$Đei □ `CàLĀ{ñfD¼"Z:óuâp
 ã=öÖ%R”ùRîi2“ □ □ ‡a

°Ž Ié»-Ø 6 î©È
`è ZØÇ³¿qF

J&»;<□ }úÍl4<•-□ Ëf#yBjHd,Œ ~œb¼□ }ôð□ ^Á□ G'ñÅZJ'g°EÇ-'İ • p47ë
□ À¿é}œ#ε uçÚxÓ□ i□ Œ•š2ØHo□ æÈ'on>rhçè HlmN 'UÝØC'fb|□ YŒvC
4b) {„,ß/wlû • £"
{cÉð • -□ #âÀ«aF•Eò□ Ĩýõ • =oàáÄ-Z,ft¼·³§□ m.*O~jç□)Œ

{¶f□ Ý□ ³,ŒhÄ□ 1□ ÅÜMŒ□ `÷²0;š|è±òg)6·QG]0-ñæyO{ªfùg"□ ...Đ~□ <o@JBãúú“İ°¿
š°AS4□ □ □ ðÅ'
"

V t□ 'Ø~'QÙ8:8αàÜ□ ŠS□ □
 Ûÿ³/4a~□ S□ >áÒCrš Y •-.*1^É
 Đ0M0±™œ\$VX YÆ'ü400@Ät ø'T"□ €ED2Qe•I\$□ □□ 7¬...U!²ö
 j~`G□ 6y9s>W□ “§©‡(□ ~~ø~~îBÁ~Rúf>“yXY>65L
 † İÆ¹²} KJ"òî jÀò□ >ěģ O 8à

Z`Đ'İ·p4æMÕ# jØ7* \$V h0□ ¯Gvu™u,š□ ëGÍ{ÄİP'Ø|hß÷ð¼BY...□ !ÝçÚô2Õ<Ù□
 Fýèèâ□ v¶|6½Š”Ä:□ ö-‰
 7□ @ÛÒùœÄ
 - á÷e?¼KçPÓ-”!J<@ñË□ □ cG12«±ÛØk□
 + =¼ðFž . ÖjÍýÄÙéÅ¥ «,f§±s^BÊİ>âÖÁGA:a>¹”3:İ‡—
 F.Éİ2e#@> gŽ~PÎ ¬:Oâœ&□ □ °>äWAây_□ Äa©2□ /%oh]□ □ âd
 Ô□ æ’/

(©Û. mÛ±-
 +ÍuV□ %ì“8qNç□ jÿNjöuÛŠ¹nÕTçÑCJô_²?9Ép□ çIYN† ÚåÆÇ Pð N 2Ù€ Óc&ÁD

+ g1²?Ë<ÈçÈf3"3š6\$ª/Å©iA 7†fV@Ö3 èQb0 F N³
 ÈT pPKêo)cBI0·PÇ®§Ÿá\$P ÅLnßÄ ãS • q]w<û
 Õç\Ÿv<~·¾
 Špê- LŠÊX·%oÂ

„ Qæ²Ýç Z" ?ú!ç ©7²Ò / Íç®Ø> >"Ù9FQ2 □ □ £«Gç~Ð □ Ç§,,^éApê~;
 □ TMP □ □ iÕMÍÙW6çÅwī □ μ □ ¼;_ □ •

Ò•ó □ AnđQØ ßÀ×ö □ èdCŠ
ú^†+Ô®

WÜKV +b/3İ å ø\$/¶vzöes,ú=

*kKi □ □ í?§q6PHfwb'föÖ □ ,QCÇûû‡;Z†™. • ì
¿ □ «fŠs[uq/@nK^«ñ □ ,•)• üÂ-° • Ýž n dçyh[y s?“ö □ &}
FvÍ®iÁpO`ùaË {s5Ý □ V □ †_Yô...fÆ □ 8¶ÁçæÔç_piqç¬}¾© □ •«l©«0 WC†Øè¿ □ çJ □ ÇË
@Á>ü • \$Êž ²Ñ75-óá\ûÄ Ì □ 8“ ž Yİ÷F¬ x

ÉVádiJË íYÛÙ¿¶—
jÉMfIâCEÁ]s—ÓÛ<"WÃijf|Üñ¿n`Ö □ |¿ùpy¬ji²RÉj
³º‡PÁ □ □)i,§”Á¼ □ 0R □ ¬ □ È ÀùšýÔæÁ8Û?ý†DÔfy? u&ØJñúâ-ÔæÑàliK½ .6ç iÉ

2 ā □ Æf □ S>h>

□ i™C0%oi36dúGgbá □ údlsí...Ø

)p ÓqÇiØ{ ê‡ü•ŠðE-F““ □ □ é‘

G± ¶W,,!’

}ÿàð □ Y6£n~43QÍ^a □ □ *g^

úÑ“

;O‡³— 6HYGh □ 4: □ 2‘K·7”\ç

^,xi,†èšKsá’ □ □ ©nê □ □ ‘| □ 6

Œ

~1

»pÑMè`r

iHw ÈE

ø0ð‡ðRCEèèðÚ □

‡x,±à ’

ýÃÓ □ □ ”ùz¿= • É~Éâ€ çK

ÂiéâK‡´q™ □ netq%?1âä

V

T6

□ Š

]øðÊV'QQ¾4...

íç¥BÓHTp3Lè#

X2 ØÒ

□ "³Deá©#;2□ Ý''Ý¹§_£Ë

÷I[|M%ó□ -G,2*÷ æÛá¶

ì

ü)

1]éNP'<Ý'

hI Ó1»^î

”ç] ``RÌ¾

þáÇ ´
 (é>SÃq©ð□ „<á□ '1N ÕQ'□ f_
 ð

äüè H%

ÔÉ#ë×'ü□ α

_X:ÒÀDHââzmâôê-‘ □ àWøX€ i¶µ-Àt □ V’Ûj^Op ç~cEy-Bà! □ 7+SÛsŠ □ UŠgituŠbℑ mè óI#-šw“ç”½ŠIt-
Ê~µ • ©o5 fp] FoY¶,4EŽ K{x*ô¬ Lâ2 • Ū

ÃD+Qné’w,“

玳瑁鏡台 □ 禹 □ 乐 □ 瘵漫 □ 竿 □ □ 𪔐𪔑𪔒 □ 𪔓

□ 琐兩

𪔔𪔕𪔖 □ □ 𪔗𪔘𪔙 □ □ 𪔚𪔛 □ □ 𪔜𪔝

𪔞環 □ □ 𪔟𪔠 □ 𪔡𪔢 琮𪔣 □ 𪔤𪔥 □ 𪔦𪔧

泮霏玳𪔨𪔩 □ 𪔪𪔫𪔬 □ 𪔭𪔮𪔯 𪔰𪔱𪔲 𪔳𪔴

繳 □ 婢 □ . .

諸𪔵 □ □ □ 𪔶 □ □ □ 𪔷 □ 𪔸 □ 𪔹 □ 𪔺 □ *

□ □ □ 𪔻 𪔼 □ 𪔽𪔾 □ 𪔿 □ □ □ □ □ 𪔿

□ □ □ 𪔿 □ 𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿 𪔿

貽 ǒ .

· 頰,, 𪔿 · □ · 𪔿 □ · ①𪔿 𪔿① · · □

𪔿 · 𪔿 □ 編 完 □ 𪔿 □ 𪔿𪔿 □ □ □ 𪔿

𪔿 □ 𪔿 □ 𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿 𪔿𪔿𪔿 𪔿𪔿

𪔿 □ 𪔿𪔿𪔿𪔿𪔿 𪔿𪔿𪔿𪔿 𪔿𪔿

𪔿𪔿𪔿 □ Y □ 𪔿𪔿𪔿𪔿 □ 𪔿𪔿ip <

ǒ,,+X □ ... [˘e □ ,, 5Do ˘Y

ÆÛÇ □ Ìyâ&mœœn>W.

^ □ æÓu; <#Q □ • —.

Ó!5MP □ :âÖ6² □ äÄ×X

€ v

ï □ Î > œzšä <6G6â □

F □ ...B! □ uÝœù; ùÿ• ùwú

Á □ .Äw'qu □ i)èÿ □ δ, □ A □ ¾ □ a©Ei □ "ÿf □ +^ □ □ ÿfQ!; μœœ" → &\$ <² 1 □ ü2 — >sd(öd Ü@`Iœ*m o.ÉÓ
 ÍÙ*ÉPÿÉ; Zär *•5 ˘²
 Đ □ -9^~)p □ DsPŠñ □ Ä\$

v%o<prb5=}æ!ùZ°" □ 'ÁÇñ(̄óí“• X%o`Wf

f™Ħ □ x]é©ÓŠ3 □ 8%Èóú Jlík ũ§,ñä``Lž÷[ˆ_f—]Šë

&E–YÖ}ñS àœÓAUtÒ™·U.ØFÖ¯1□mZà%¼<;?í □ icÚ3 □ á □
 Ñ □ →òó)Ī F-¼Đ&Ž 6ç • ³ÉO\`ÖŠh(□ 0•iyfùà• □ »À§À3ê»HcóŪÃ"ME

%.>Ýo-×÷Yw-,2

□ šĪ

Jž Ñ

Ç—©•Ú'œ†Ī½ì%U

PúÊ}-<Kβ{ÊĀñiŪ

¿^

=o)],-™<Êvž tÉ=Ī • •

qfÇêP<Æü!*oÚa8” □ V

×sWj9_ØÖÁž vx =μ—~

*§è:_Om~n+ □ fþÓ,, □ □

ê4f e4Td9ø2Øê(«”

\$æ

Æ' □ ù>Bi' □ æ^£μÃD

|XÉ9'ø\iCkÔvê

»]ö5ÆÚ J} □ ~ç □ Ì2QÂ

• -i'ZÎè),«p‡+ □ ÆÛ

P B"ÂSs q • 0Äzð

â^{3”}

N □ ÜÝ*c □ ¶f•â □ a=>

kÖ[Ï< • çJ-èl8¥RÚ-

ó!ÒD×Òkv

€ - □ , ©†Q!

ª9Ø # âv ? ø\$GO®

S □ ” □ ’ } □ >;GB □ †8

N...b Á0æëg×` □ q•sâ£Ó±ÑTA*âN □ °-°üÁ½7?Đç·f9ñüç<r—é“ □ ℔ +úhö Ó?^[Lª!ÏY-oÖq@N

¼ C\+!£†ae'Î
Ç fÖËtW§IÒ

”ΜÚW—íÖiÿœ □ μdμÓ»^{o2}x"ffÉ^êÅ

δF/4Ê' ì«^Íh-ÔS/wšfDpálcidi°ãl

u/4h%•Èãˆ^Īãç•Vâ0“ó□ !nWtŠB(OO •ĐÉpn

┘

5Ä”ã□ å
 âZ caÑêê
 ,óK6© •çúoβæcÑ*
 (ÆF(æ rÑ -[EZ□ 6Ĉ...Rä•8ĪU"iE
 õ 'Æ •

□ ídM!È!J"£

2''ø½fD=2'Sët'Ã@×□ kçÈÛA□ 4''è/Ž æ Qq C@o

Œa yg€ ĤtË3ÿ £ß ~ÝÉ□ Đ]ü • “\-RÆ<nuv]Š□ %ov,”N[i □ sĭ{½Ej´E2} |p°×: . {”“□ œPÑ

»R©

—

i

Æ212

qĚ ĩnÒ ŨG_6Z0·&ŸÍ°ãâ □ ðUH %ê' □ □ ěeîsÚÝEÝ,, □ §©LpQ-yx|šlœ □ bĐŨYI!wôâÈÛ)2÷á- ì B • {i
 Dká·Ě □ }9"ç7'f<ā,, □
 ĵ]ihÂ □ †|—Ěèq½Ōđ Uä □ &ièpÁp^Kóðhà, <W~TsjE—:j†ĂĂ □ 'IníúĚĚ □ %œ¼~|OÆç°WüF □ Īv# □ P
 6×¶đ0 »7 {»{, □ Z □ ›1 □ ØŸŸĂ □ ! □

éo 7c % (i~vt#9½w'IA†CE“†÷ u

[TM, r-}¥ÿÛÄ wÌÛ»ñÛ°yq³ ù,Ä Û0c,ýáŠvl ¥i@8ñÆ ‘BæÌPÝ5-hqGü³/4çu@ÏB\

Z A

B

,

C

11:23??

ä:Û½ Yî‡ zy°ð`¥%zÖÛâ ÖýÛ"i}RCP½-‘½±<ã’¿I+U±ô uäü ◀◀ ..._òÆÊ ◻ ◻ ð‘aXab>’É<
◻ ◻ æp¶L†ñŹC î Aæ◻ •6öD&bç³,,Ê¶Rá[ÚXic¥◻ }Lip° ◻ ÊòÆ†-Ê◻ ...ôŠ
Æ¶!o-ôŠe@Ø◻ ^qlÁ|’±òÆÊzI◻ EVÓÆJ◻ +m-’±ñ)Ö÷±»ú ôÝý\$ gâpÿèøÄ{¥r
◻ 9kL◻ ◻ ◻ †ÄÑ

ANY • € w Íé wšü, ^ ïw -ÏÆZPÅy
 ^FÍ}-©Ì,,í £7

- ì)(«Cò,,!ô±-ãÜ □ U □ ÍiCEP&yñifÝÊ'ôdV'mCE<□ "□ < –
 %□ ÷ 8u h?&hù hñí;Ô@7ò\±ž
 âAS. Ý÷ □ ©aÛ# □ È2Qb"±!>É>Z9%□ 9F □ # □ «\$S³/4...™7défié& □ □ š-éL<â°Ó³4
 ï
- ÅGš7 □ ð=ÝÙOíxÉsOç»¹6hgx {än@Û²!e3è\$ {òP'Yî:Ûñøã?³/4"»)wÓih}â6=€
 [{é

Ešúw □ ÷šG

/ŸŕÔ □ ĺ]îfd7ÃÂŕt7Ão—»)w³Đ m; • æ □ ŕ÷, 'Ba©Á1Y»;µÔfÿ§ □

- X! ÓqÇi!ø

ê‡™æ°s∩(\$Ç • 3H8--+"- { Ç

zîSsÛšf □ `éägÄ£ □ álpÄ^{as} |'Đs]¼(•ø—u LDH»N° Óug • μĩÝgđ □ vww÷÷|p □ 'μv½Õ:

J^{1/2} × € ÿB XÍ³HT

29Ûœ ¯ô{”-Y i

- μ: <P=<h² (òó/! □ è’⁻>^{1/4} XA4μff □ % □ □ ;ài> □ ^{1/4}, ¶*ðv) ¯
zçò’×Ä<NX □ ,u □ ÑogÇ(~•hlã|E
îü<{ÛμÇwTM □ YV,,iÛ □ XÍ...⁻³ÿó*Êp^o^{1/2}TYRŠâ

\8 □ ñáxop³aYöGú □ i,»ð©š;¥î □ ñI÷Ùhç

- Å{ÜTk{;ØÝß

TO©üç,‡ □ y3Á|, □ ÛÄ □ :00 □ ¶ÄL~ÇeÚYÍá □ - □ ê □ □ ¯g □ °aPø fl‡ô Ü Ç¶oÚ

□ Êøĭ#xWî□ ›š^7,i>ª

”ŒÇÉÑy™8_Y ,š:P

Â%Ûq□ 3...OÍéioÃ□ ©o)=ÇÀO*ĭcŽ Nhž Èð*ý-Œ ÊxÙ0'e°iz ÑÚªríØ<Ûe
.-êÔzâĭJ«Èqb-òVTsVÇ□ V÷4Ōm

\Š□j□P' %³xJ`

Ü[rñKó—

□ ĐD+İİ0z‘a□ öÖ11LÃ□ k□ =+x™□ □ Çİ÷\V3s\üj\@□ Æ[ó,²ZJŠó8YĀâ³⁄4PNmkö□ KÆñE

VY Ö8rfß¶ € Đ

ÃâÒ ÿŠ <¥öİð-æ`ð \$!42ÅtmKiÓ~ L<ŸýpÆÆ*iiäpzC/Ø{‘-

G,ÖŸè ù°†2Ä(%E½`¥ ‘TM¼óY^Š& ...ÖypİÅ

ä\É'ä½ í÷í÷¥YÒÔpÆ R=C/ÓãN0²Ñi9æhİ3F Jμ\$éý ¥Yñjÿy¹x=TM Ô|íOİ ßn € »O•

TM ¶Ū¥ÁD:©çÈB«c, fšŠ§%u² 8ujXrDV g

kÔëÃÛ_*{äfw+-

-t³4†úü Å Hñæ3K8İ ÷ī E ~sÛÇŸV, {^ 2{1Ãí`CxgBéGüÊ>-μ-iIQ°-Ò%BJ€ Q£Ó5u¥

NçO?i?BRpÛ««P‡·½ëR= ûç"šs #_§Kñîã w' M\JCiJ#CEÊgÕ4ocÇ?æCægÃH‡ àÊp î]•

Ó•Ø "æÈêôgG

□ • □ Uīβ □ p

İ£"Sj#÷"ê`úéHÂ©î-î Í)C8

Aü²€ Gs • %o'íÚ -TÀ§-©ÀF□ öÀDœ Đ□ ï~8□ %oðĬ□ %u

™çÜ □ Â>ŷ↔°á°~□ ő □ Sâ&â^î □ □ [Àã5VxirÿQOGÑ©LJ2pAK² *jd+ 1 âÑÑ-È
f'§ □ ã □ ^â"Š. de outros hormônios e fatores de crescimento, em diferentes momentos do cultivo ou do desenvolvimento folicular são necessários para a completa elucidação da biologia molecular e fisiologia ovariana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; NITKE, S.; BEM-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 26, p. 887-898, 2006.

ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 438–464, 2009.

ANDERSON, E. L.; BALTUS, A. E.; ROEPERS-GAJADIEN, H. L.; HASSOLD, T. J.; DE ROOIJ, D. G.; VAN PELT, M. M.; PAGE, D. C. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 14976–14980, 2008.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-94, jul. 2010.

BAKER, T. G.; FRANCHI, L. L. The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 14, p. 511–513, dec. 1967.

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. 537-55, 2006.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPIANIER R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1106-1114, 2000.

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. 87–97, 1989.

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.

BRAW, R. H.; TSAFRIRI, A. Follicles explanted from pentobarbitone treated rats provide a model for atresia. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 59, p. 259-265, 1980.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BROWN, P.; McNEILLY, A. S. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 117–124, 1999.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of

vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 679-687, 2009.

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

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

BURATINI, J. J.; GLAPINSK, V. F.; GIOMETTI, I. C.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptor, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. **Molecular Reproduction Development**, v. 70, p. 255-261, 2005.

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

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

CLARK, A.R.; STOKES, Y. M.; LANE, M. THOMPSON, J. G. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine *cumulus*-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 131, p. 999-1006, 2006

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

COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; LEITÃO, C. C. F.; VASCONCELOS, G. L.; SARAIVA, M. V. A.; FIGUEIREDO, J. R.; Van den HURK, R.; SILVA, J. R. V. Levels of mRNA for bone morphogenetic proteins, their receptors and SMADs in goat ovarian follicles grown *in vivo* and *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, doi: 10.1071/RD11195.

CURCIO, B. R.; DESCHAMPS, J. C.; NOGUEIRA, C. E. W.; PEREIRA, G. R.; MACEDO JÚNIOR, M. C.; BOFF, A. L. N.; RAMBO, G.; LUCIA JÚNIOR, T. Maturação e vitrificação de oócitos equinos cultivados na presença de hormônio do crescimento equino e fator de crescimento semelhante à insulina-I. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 171, 2005.

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**. XII REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Foz do Iguaçu-PR. Anais da XII Reunião Anual da SBTE, v. 25, p. 178-178, 1997.

DE MIGUEL, M. P.; CHENG, L.; HOLLAND, E. C.; FEDERSPIEL, M. J.; DONAVAN, P. J. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 10458–10463, 2002.

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

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrinology Reviews**, v. 30, p. 624-712, 2009.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 197- 207, 1996.

FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogenes**, v. 18, p.7719-7730, 1999.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; HUISHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; ECTORS, F. J.; BECKERS, J. F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, p. 1334-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. **In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª Edição, cap 16, p. 303–327, 2008.

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

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

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

GALLETI, S. R. *Biológico.*, São Paulo, v. 65, n. 1-2, p. 33-35, jan/dez., 2003.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, p. 279-283, jul. 2000.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 61-79, 2000.

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

GOMES, J. E.; CORREIA, S. C.; GOUVEIA-OLIVEIRA, A.; CIDADAO, A. J.; PLANCHA, C. E. Three-dimensional environments preserve extracellular matrix compartments of ovarian follicles and increase FSH-dependent growth. **Molecular Reproduction Development**, v. 54, p. 163-172, 1999.

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

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

GUIGON, C. J.; MAGRE, S. Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. **Biology of Reproduction**, v. 74, n 3, p. 450-458, 2006.

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

GUTIERREZ, L. 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.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 900-909, 2004.

HERRMANN, G.; SPANEL-BOROWSKI, K. A sparsely vascularised zone in the cortex of the bovine ovary. **Anatomy, Histology & Embryology**, v. 27, p. 143–146, 1998.

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

IRVING-RODGERS, H. F.; HARLAND, M. L.; RODGERS, R. J. A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle. **Matrix Biology**, v. 23, p. 207–217, 2004.

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. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles. **Theriogenology**, v. 49, p. 1567-1577, 1998.

JUENGEL, J. L.; BONDENSTEINER, D. A.; HEATH, N. L.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; SAWYER, H. R.; McNATTY, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 447-460, 2004.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D.; A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; 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 of Reproduction**, v. 67, p. 1777-1789, 2002.

JUENGEL, J. L.; McNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 143-160, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 332, 2005.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v. 123, p. 613-620, 2002.

KIM, D-H.; SEONG, H-H.; LEE., H-L. *In vitro* Culture Conditions for the Mouse Preantral Follicles Isolated by Enzyme Treatment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 4, p. 532-537, 2008.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 165-183, 2003.

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

KUNWAR, P. S.; SIEKHAUS, D. E.; LEHMANN, R. *In vivo* migration: a germ cell perspective. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 237–265, 2006.

LAWSON, K. A.; DUNN, N. R.; ROELEN, B. A. J.; ZEINSTRA, L. M.; DAVIS, A. M.; WRIGHT, C. V. E.; KORVING, J. P. W. F. M.; HOGAN, B. L. M. BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes Development**, v. 13, p. 424–436, 1999.

LEE, V. H. Expression of rabbit zona pellucida. 1. Messenger ribonucleic acid during early follicular development. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 401-408, 2000.

LI, H.; DAI, K.; TANG, T.; ZHANG, X.; YAN, M.; LOU, J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356(4), p. 836-42, 2007.

LIMA, I. M. T.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; MAGALHAES-PADILHA, D. M.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; DONATO, M. A. M.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Dynamic Medium Containing Kit Ligand and Follicle-Stimulating Hormone Promotes Follicular Survival, Activation, and Growth during Long-Term *in vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. **Cells Tissues Organs**. DOI: 10.1159/000325150, 2011.

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; TENÓRIO, S. B.; MARTINS, F. S.; CUNHA, L. D.; NAME, K.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles E2 and FSH in the culture of goat preantral follicles. **Cells. Tissues Organs**, v. 191, p. 240-247, 2010.

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. 201–14, 2009.

LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, S. 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. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. 109. 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. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2011.

MAGOFFIN, D. A.; WEITSMAN, S. R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal

transduction in rat ovarian theca interstitial cells. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 766-775, 1994.

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

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C.; 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. **Papel do GDF-9, IGF-I e GH sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos**. 2009. 215 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

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.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and Differentiation Factor-9 Stimulates Goat Primordial Follicles Activation *In vitro* and the Progression to Secondary Follicles. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 916-924, 2008.

MASSAGUÉ, J. TGF – signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 753–791, 1998.

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

McARTHUR, M. E.; IRVING-RODGERS.; H. F.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. **Biology. Reproduction**, v. 63, p 913–924. 2000.

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

McLAUGHING, M.; BRONFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, 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.

McMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. Phosphorylation of bone morphogenetic Protein-15 and growth and differentiation factor-9 plays a critical role in determining agonistic or antagonistic functions. **Endocrinology**, v. 149, p. 812-817, 2008.

McNATTY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 11-20, 2000.

McNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. E. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, p. 481-487, 2005.

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

MEDEIROS, P. B. **Expressão de hormônio folículo estimulante bovino (bFSH) com as duas subunidades fusionadas em *Pichia pastoris***. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MÉDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M. A.; COMBETTES, L.; GRANET, P.; VANNIER, B.; LOOSFELT, H.; MIGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 2266-2276, 2002.

MOLYNEAUX, K.; WYLIE, C. Primordial germ cell migration. **International Journal Development Biology**, v.48, p.537-544, 2004.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 139-54, 2002.

MURUVI, W.; PICTON, H. M.; RODWAY, R. G.; JOYCE, I. M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. **Theriogenology**, v. 64(6), p.1357-70, 2005.

NASSER, L. F. T. **Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2006. 80 p. Tese (Doutorado) – USP . FMVZ. Departamento de Reprodução animal, São Paulo, 2006.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1018-1024, 2002.

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

OHINATA, Y.; OHTA, H.; SHIGETA, M.; YAMANAKA, K.; WAKAYAMA, T.; SAITOU, M. A Signaling Principle for the Specification of the Germ Cell Lineage in Mice. **Cellular**, v. 137, p. 571-584, 2009.

OHINATA, Y.; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; ANCELIN, K.; ONOY, S.; BARTON, S. C.; OBUKHANYCH, T.; NUSSENZWEIG, M.; TARAKHOVSKY, A.; SAITOU, M.; SURANI, M. A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, v. 436, p. 207–213, 2005.

OTSUKA F, SHIMASAKI S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p.8060-8065, 2002a.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. **Endocrinology**, v. 143, p. 4938–4941, 2002b.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **Journal Biology Chemistry**, v. 276, p. 11387-11392, 2001.

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

PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, p. 55-64, 2000.

PENG, X.; YANG, M.; WANG, L.; TONG, C.; GUO, Z. *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.27, p.247-257, 2010.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. **Development**, v. 125, p. 3323- 3328, 1998.

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

QIAO, J.; FENG, H. L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. **Human Reproduction Update**, v.17, p. 17–33, 2010.

RANKIN, T. L.; O'BRIEN, M.; LEE, E.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.; DEAN, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, v. 128, p. 1119–1126, 2001.

REBOUÇAS, E. L. **Estabilidade de genes de referência e quantificação de RNAs mensageiros para os Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF), seus receptores e proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) em folículos ovarianos bovinos.**

(2011). 123 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2011.

REDDY, P. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, p. 611–613, 2008.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 21, n. 2, 2010.

REIS, E. L. **Reprodução Animal: Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica equina no protocolo de sincronização da ovulação para T. E. T. F.** 2004. 101 p. Dissertação (Mestrado) – FMVZ Departamento de Reprodução animal, São Paulo, 2004.

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

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 1021–1029, jun. 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, p. 15-23, 2011.

RUNYAN, C.; SCHAIBLE, K.; MOLYNEAUX, K.; WANG, Z.; LEVIN, L.; WYLIE, C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. **Development**, v. 133, p. 4861–4869, 2006.

SAGA, Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 18, p. 337–341, 2008.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 644-645, 2002.

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, 2011.

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

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reproduction Science**, v. 17, p. 1135-1146, 2010.

SAWYER, H. T.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. 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**, v. 69, p. 269–277, 2003.

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

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, p 71–101, 2004.

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

SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; Van den 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 Endocrinology**, v. 189, p. 113-125, 2006.

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

SILVA, J. R. V.; Van den HURK, R.; Van TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. **Molecular Reproduction Development**, v. 70, p. 11-19, 2004a.

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

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

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, v. 127, p. 4645–4654, 2000.

STALLOCK, J.; MOLYNEAUX, K.; SCHAIBLE, K.; KNUDSON, C. M.; WYLIE, C. The pro-apoptotic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. **Development**, v. 130, p. 6589-97, dec. 2003.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1151–1158, 2008.

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

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 457-74, 2000.

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, apr. 2005.

VAN WEZEL, I. L. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2602-2612, 1999.

VITT, U. A.; HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. W. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. **Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 681-694, 2001.

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.

WANDJI, S. A.; SRSEN, 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.

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.

WANG, C.; ROY, S. K. Expression of E-Cadherin and N-Cadherin in perinatal hamster ovary: Possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 151, p. 2319–2330, 2010.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction**, v. 61, p. 71-90, 2003.

WOTTON, D.; MASSAGUE, J. Smad transcriptional corepressors in TGF family signaling. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 254, p.145–164, 2001.

WU, Y. T.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X. E.; XU, J.; ZHU, X. M.; LUO, Q.; HUANG, H. F. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1526–1531, mar. 2007.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 854-866, jun. 2001.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Testosterone Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 924–932, 2006.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 1153-1161, 2008.

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