



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

REGISLANE PINTO RIBEIRO

**EFEITO DA LECTINA JACALINA (*Artocarpus integrifolia*) SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS
CAPRINOS**

SOBRAL

2013

REGISLANE PINTO RIBEIRO

EFEITO DA LECTINA JACALINA (*Artocarpus integrifolia*) SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS
PRIMORDIAIS CAPRINOS

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

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana
Silva.

SOBRAL

2013

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

R372e Ribeiro, Regislane Pinto.

Efeito da lectina jacalina (*artocarpus integrifolia*) sobre a sobrevivência e ativação *in vitro* de folículos primordiais caprinos. / Regislane Pinto Ribeiro. – 2013.

109 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.

Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

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

CDD 660.6

REGISLANE PINTO RIBEIRO

**EFEITO DA LECTINA JACALINA (*Artocarpus integrifolia*) SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRIMORIDIAIS
CAPRINOS**

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

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho – Examinador
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

Dedico essa inestimável conquista à minha mãe Maria de Fátima Pinto Ribeiro por ser meu porto seguro e tão essencial em minha vida.

Com amor, dedico

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço a Deus por ser tão generoso comigo, dando-me coragem, força, paciência e sabedoria para enfrentar os desafios na vida pessoal e profissional. Obrigada pela Tua presença em minha vida Senhor Jesus, iluminando a minha caminhada.

Aos meus amados pais Maria de Fátima Pinto Ribeiro e Raimundo Alves Ribeiro, obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo de pais e por serem tão dedicados à família. O carinho e amor que vocês têm por mim é que me dá força para seguir em frente. A minha vida não seria a mesma sem as orações de vocês.

A minha grande família, meus irmãos Rogério Ribeiro, Régio Ribeiro, Romero Ribeiro, Roberto Ribeiro, Romildo Ribeiro, Rejane Ribeiro, Rosana Ribeiro e Rosiane Ribeiro por compartilharem nossas experiências. Em especial quero agradecer aos meus irmãos (Rosana Ribeiro, Rosiane Ribeiro e Romildo Ribeiro) que acompanharam de perto toda a minha caminhada, desde o início dos estudos para a seleção do mestrado, vocês são fundamentais em minha vida.

Aos meus sobrinhos amados Raiane Vitória Ribeiro e Ruan Victor Ribeiro, obrigada pelo amor, pelos momentos felizes que enchem o meu coração de alegria.

A minha tia Célia Rodrigues que amo tanto, que dedicou todo o seu amor de mãe a mim e aos meus irmãos, só tenho a agradecer pelo carinho e atenção.

Aos meus cunhados Sandra Lúcia Ribeiro e Laerte Feliciano pelo carinho, atenção e apoio. Obrigada!

A minha vovó querida, Maria Nelcina Rodrigues (*in memoriam*) pelo amor e pelos seus ensinamentos que levarei por toda a minha vida.

Ao meu tio José Clever Braz, obrigada pelas orações e carinho dedicados a mim. A minha querida prima Cleidiane Braz com quem sempre pude compartilhar os bons momentos de minha infância e sempre está ao meu lado.

Ao meu orientador Dr. José Roberto Viana Silva, pelo exemplo de profissionalismo e humildade. Obrigada pelos grandes ensinamentos que me fizeram crescer. Agradeço pelo incentivo, dedicação e paciência.

A amiga Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva, obrigada pelos ensinamentos, a sua presença foi de grande importância para o nosso crescimento profissional. As suas sugestões foram cruciais para o bom desenvolvimento dos experimentos. Obrigada a sua família por nos receber com carinho, em especial a pequena Sofia Saraiva Santiago por encher de alegrias os dias de estudos.

Aos amigos de pesquisa do laboratório de Cultivo de Células e Tecidos: Moêmia Portela, com quem pude conviver durante o mestrado. Quero lhe dizer que a sua presença e auxílio nesta caminhada foram de grande importância. Obrigada por ser tão paciente, mesmo nos momentos de desânimo, por ser companheira e carinhosa. Com sua perseverança, força e coragem você vai longe. Ao querido amigo do coração Anderson Weiny, obrigada por cada palavra de incentivo e gestos carinhosos. Além de ser um excelente profissional é um grande amigo. Palavras são poucas para expressar os meus sinceros agradecimentos. Ao amigo Jackson Costa pela amizade, exemplo de profissional, competente e humilde. A sua contribuição para o desenvolvimento das atividades laboratoriais foram fundamentais. Agradeço pela compreensão e pelos ensinamentos. Aos amigos Rodrigo Rossi e Ellen Vasconcelos que participaram da realização dos experimentos, vivenciando momentos de grandes desafios e aprendizagem. O meu muito obrigado! Ao amigo Renato Passos, obrigada pelos bons momentos de convivência, pela amizade e pelo estímulo positivo, por todos os nossos dias de estudo juntos. Obrigada pelos conselhos e pelas nossas conversas. As amigas e companheiras da época de iniciação científica Glaucinete Borges e Katianne Freitas, obrigada por compartilharmos muitos momentos na vida científica. Aos amigos e demais colaboradores do grupo de pesquisa, João Garcia, Taiã Gomes, Tânia Lopes e Rafael Pereira, obrigada pela colaboração e amizade, por proporcionar o prazer que é trabalhar em equipe. *“Amigos são anjos que te fazem sorrir...”*.

As amigas Juliane Passos e Gisvani Lopes pelos momentos de aprendizado e alegria que passamos juntas no laboratório. Obrigada pela disponibilidade de sempre ajudar, pelo incentivo, apoio e carinho.

A amiga-irmã Karla Leylanne Góes, obrigada pela amizade, companheirismo, paciência e compreensão desde o início da graduação. Obrigada por sempre me apoiar e acreditar na minha capacidade. Este é só um dos muitos sonhos que conquistaremos juntas, pois apesar da distância, você estava presente em todos os momentos desta caminhada.

A amiga querida Shirleyne Silva, o seu apoio e carinho me deram força para caminhar, no momento que mais necessitava. Obrigada pelas as palavras de conforto, e por sempre torcer e ficar feliz com as minhas conquistas. O meu muito obrigado!

A amiga Helen Avelino com quem sempre puder contar nos momentos de alegrias e tristezas. Obrigada por me apoiar e ter uma palavra amiga na hora certa. A sua amizade e carinho foram fundamentais nesta fase de minha vida.

A minha pequena Ariela Viana, a quem tenho um amor incondicional, fico feliz por cada gesto e palavra carinhosa.

Aos amigos Auryo Viana e Carlos Eduardo Avelino por me proporcionar momentos de alegria e descontração, fazendo esquecer as preocupações do dia-a-dia. Obrigada pelos carinhos sinceros.

As amigas queridas Maria Jane Albuquerque, Janielle Duarte e Ana Amélia Duarte uma família especial que sempre me receberam com muito carinho e sempre estarão em meu coração. Obrigada!

Aos amigos que fazem parte da minha vida e vibram com as minhas conquistas Jeane Ribeiro, Patrícia Martins, Joyci Barbalho, Kézia Gomes, Shirley Silva, Edna Araújo. Obrigada!

Aos amigos Diego Dantas, Roseane Marques, Wellington Carvalho, Marccel Paiva, Anderson Ximenes, Rondinelly Lima e Vânia de Sousa. Obrigada por fazerem parte da minha vida escolar, pois não importa a distância e nem o tempo, nossa amizade permanece a mesma.

Aos amigos Aline Alves, Clehilton Soares, Elienay Sampaio, Yrla Santos, Diego Santos, Ana Quitéria Ferreira e Ilário Sousa que conheci há pouco tempo, mas que se tornaram muito especial nesta caminhada, com quem pude compartilhar momentos de alegrias.

Aos amigos Gleison Ribeiro, Diego César Tavares, Daniele Val, Nicolay Frota, João Paulo Matos, por compartilharmos bons momentos de convivências. Obrigada pelo carinho.

A amiga Amélia Soares Costa, obrigada pelos dias de estudos em sua casa, por compartilharmos momentos durante a finalização desta dissertação.

Ao técnico do laboratório de Histologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, Adalberto Lima Júnior, por se dispor a ajudar no desenvolvimento das atividades de histologia.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), pela disponibilidade de equipamentos e apoio técnico. Ao professor Dr. Rodrigo Maranguape e seu grupo de pesquisa, em especial ao Jedson Aragão e Aurilene Gomes.

A minha turma de mestrado Amélia Soares, Mariana Silva, Cleane Moreira, Francisco Sousa, Jordânia Oliveira, Denyse Cruz, Christiane Nobre, Alexandre Silva, Verônica Brito, Aline Carvalho, Bruno Rocha, Érica Rabelo, Rafaela Bastos e Ângela Magalhães.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da UFC, pelos ensinamentos.

Agradecimento sincero a Funcap pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo.

Obrigada aos professores do curso de Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA por contribuírem para a minha formação, a Silvana Bastos, Eliane Minervina, Aline Landim, Cláudia Goulart, Fátima Révia Granja e Marlene Feliciano.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, em especial ao Almino Conrado, Sandro Sampaio, Gade Sousa e Diná Sousa pelo carinho. Obrigada!

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram a seguir minha carreira acadêmica e pessoal, concretizando mais esta etapa da minha vida. A todos, muito obrigada!

“Tenho impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram investigar o efeito de diferentes concentrações de jacalina e da interação de jacalina e FSH sobre a sobrevivência, ativação e expressão gênica em folículos primordiais caprinos cultivados *in vitro*. Para isto, os fragmentos do córtex ovariano foram cultivados em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com diferentes concentrações de jacalina (0, 10, 25, 50 e 100 µg/mL - experimento I), por um e seis dias. Após o término do período de cultivo, os fragmentos de córtex ovariano foram fixados para histologia clássica. Em seguida, avaliou-se a percentagem de folículos primordiais ou em desenvolvimento no controle não cultivado e no tecido ovariano cultivado nos diferentes tratamentos. Após a determinação da concentração de jacalina mais eficiente (50 µg/mL), realizou-se o cultivo de fragmentos de córtex ovariano em MEM suplementado com a jacalina (50 µg/mL), FSH (50 ng/mL) ou ambos (experimento II). Após 6 dias de cultivo, os fragmentos ovarianos foram fixados para histologia clássica. Além disso, para cada tratamento, foram coletadas amostras de tecido para avaliar o perfil de expressão de RNAs mensageiros para BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 e PCNA em folículos ovarianos caprinos cultivado *in vitro* por 6 dias. Os resultados demonstraram que após seis dias de cultivo, a presença de 50 µg/mL de jacalina no meio de cultivo promoveu um aumento de folículos morfolologicamente normais, bem como uma redução da percentagem de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento, quando comparado ao meio controle. No experimento II, demonstrou-se que jacalina ou FSH estimulam a ativação dos folículos e contribuem para a manutenção da viabilidade, mas não foi observada uma interação positiva entre essas duas substâncias. A expressão de RNAm para a BMP-15 e KL após o cultivo *in vitro* de fragmentos de ovário nos diferentes tratamentos por 6 dias não foi alterada. No entanto, a presença de FSH aumentou os níveis de RNAm para o c-kit e para o PCNA, enquanto que o GDF-9 teve sua expressão reduzida em meio suplementado com jacalina. Em conclusão, jacalina e FSH foram capazes de promover a sobrevivência e ativação de folículos primordiais caprinos após 6 dias de cultivo. A presença de FSH aumentou a expressão do RNAm para PCNA e c-kit, enquanto que a presença da jacalina reduziu a expressão do GDF-9.

Palavras-chave: folículos primordiais, caprinos, cultivo, RNAm, FSH, jacalina

ABSTRACT

The aims of this study were to investigate the effect of different concentrations of jacalin and the interaction of jacalin and FSH on survival, activation and gene expression of goat primordial follicles cultured *in vitro*. For this, fragments of ovarian cortex were cultured in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 mg/mL - experiment I) for one and six days. After the end of cultured period, the fragments of ovarian cortex were fixed for histology. Then, the percentage of primordial follicles in uncultured or cultured ovarian tissue in different treatments were evaluated. After determining the most effective concentration of jacalin (50 µg/mL), ovarian cortex fragments were cultured in MEM supplemented with jacalin (50 µg/ml), FSH (50 ng/ml) or both (experiment II). After 6 days of culture, the ovarian fragments were fixed for histology. Furthermore, for each treatment, tissue samples were collected to evaluate the expression profile of mRNA for c-kit, KL, GDF-9, BMP-15 and PCNA in goats ovarian follicles cultured *in vitro* for 6 days. The results showed that after six days of culture, the presence of 50 µg/ml jacalin in culture medium increased the percentage of normal follicles, and promoted a reduction in the percentage of primordial follicles and increase of developing follicles, when compared to control medium. In experiment II, jacalin or FSH stimulated primordial follicle activation and contributed to maintain follicle viability, but there was no positive interaction between these two substances. The levels of mRNA for BMP-15 and KL after *in vitro* culture of ovarian fragments in different treatments was not altered. However, the presence of FSH increased levels of mRNA for c-kit and PCNA, while the GDF-9 expression was reduced in medium supplemented with jacalin. In conclusion, jacalin and FSH were able to promote the survival and activation of goat primordial follicles after 6 days of culture. The presence of FSH increased expression mRNA of PCNA and c-kit, while the presence of jacalin reduced the expression of GDF-9.

Keywords: primordial follicles, goats, culture, mRNA, FSH, jacalin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1. Representação esquemática do ovário mamífero..... 22
- FIGURA 2. Via de sinalização PI3K, mostrando as moléculas que mantêm a dormência de folículos primordiais incluindo PTEN, FOXO3, p27 e o complexo TSC1/TSC2, e as que mantêm a sobrevivência de folículos primordiais, incluindo PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6..... 29

ARTIGO I

- FIGURE 1. Histological section of non-cultured tissue after staining with hematoxylin and eosin (H&E), showing degenerated primary follicles (a) and normal primary follicles (b)..... 63
- FIGURE 2. Percentage of morphologically normal follicles in ovarian in uncultured control tissue and after culture for 1 or 6 days of ovarian tissue in α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL) 63
- FIGURE 3. Percentage of primordial follicles in ovarian tissue in uncultured control and after culture for 1 or 6 days of in α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL) 64
- FIGURE 4. Percentage of development follicles in ovarian in uncultured control tissue and after culture for 1 or 6 days in α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL)..... 64
- FIGURE 5. Percentage of morphologically normal follicles in uncultured control tissue (day 0), and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both..... 65
- FIGURE 6. Percentage of primordial follicles in uncultured control tissue (day 0), and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both. 65

FIGURE 7. Percentage of developing follicles in uncultured control tissue (day 0), and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both..... 66

FIGURE 8. Levels of mRNA expression for in BMP-15 (A), KL (B), c-kit (C), PCNA (D) and GDF-9 (E) in uncultured control tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both. 67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1.	Primer pairs used in real-time PCR.....	68
Table 2.	Efficiency of primers used in real-time PCR	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína kinase
AMH	Hormônio Anti-mulleriano
As	Anti-senso
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMP-4, 6, 7	Proteína Morfogenética Óssea-4, -6, -7
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CE	Ceará
CGPs	Células Germinativas Primordiais
CG	Células da granulosa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	Cycle threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
DTT	Dithiothreitol
E2	Estrógeno
FGE	Fator de Crescimento Epidermal
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico-2
FGFb	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FIGLA	Fator de Linhagem Germinativa Alfa
FOXO3	Forkhead transcription factor
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação – 9
H	Hora
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina– 1
ITS	Insulina, transferrina e selênio
KL	Kit-ligante
LH	Hormônio luteinizante

MEM	Meio Essencial Mínimo
MEM ⁺	Meio essencial mínimo suplementado
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais
Min	Minuto
mTORC1	Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em mamíferos
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
P4	Progesterona
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol,4,5-trisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10
p27	Inibidor de kinase dependente de ciclina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Ribonuclease
RNaseout	Recombinant Ribonuclease Inhibitor
rp26	Proteína Ribossomal S6
S	Senso
S6K1	Proteína ribossomal p70 ligada a quinase S6 1
Sec	Segundo
SEM	Erro padrão
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 e 3	Zona pelúcida 1, 2 e 3
α-MEM	Meio Essencial Mínimo – α

LISTA DE SÍMBOLOS

MG	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
± SD	Mais ou menos o desvio padrão
%	Porcentagem
~	Aproximadamente
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
<	menor que
°C	Grau Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Ovário mamífero.....	22
2.2	Oogênese e Foliculogênese.....	23
2.2.1	<i>Oogênese</i>	23
2.2.2	<i>Foliculogênese</i>	23
2.2.3	<i>Formação e ativação dos folículos primordiais</i>	24
2.2.4	<i>Desenvolvimento de folículos primários, secundários e formação de antro</i>	28
2.3	Crescimento folicular na fase antral.....	32
2.4	Controle da foliculogênese por hormônios	34
2.5	População folicular e Atresia.....	35
2.6	A lectina jacalina e a sua importância para a multiplicação celular.....	37
3	JUSTIFICATIVA.....	39
4	HIPÓTESES	41
5	OBJETIVOS.....	42
5.1	Objetivos Gerais.....	42
5.2	Objetivos Específicos.....	42
6	ARTIGO I: Efeito da jacalina e FSH na sobrevivência, ativação e expressão gênica <i>in vitro</i> de folículos primordiais caprinos.....	43
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	70
8	PERSPECTIVAS.....	71
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a caprinocultura vem sendo desenvolvida por pequenos e médios produtores, com rebanho estimado em 9.450.312 de animais, sendo 93% (8.788.790) desta população está localizada na região Nordeste do país (IBGE, 2010). Visto que os caprinos são importante na região Nordeste como fonte de alimento e renda, o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução para esta espécie, bem como o estudo de fatores envolvidos na foliculogênese é de fundamental importância. Dentre as biotécnicas que podem contribuir para o incremento da reprodução em caprinos, destacam-se a inseminação artificial (IA), a fertilização *in vitro* (FIV), a transferência de embriões (TE), a clonagem e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

A biotécnica de MOIFOPA compreende as etapas de isolamento, preservação (resfriamento e congelamento) e/ou cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e tem o objetivo de recuperar oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até a maturação (FIGUEIREDO *et al.*, 1997). Além disso, em associação com outras tecnologias reprodutivas como a FIV e a TE, a MOIFOPA poderá não somente otimizar, como também conservar o material genético de animais valiosos e espécies em vias de extinção (CELESTINO *et al.*, 2009).

Já é conhecido que os folículos primordiais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários de espécies mamíferas. No entanto, 99,9% destes folículos não evoluem até a fase ovulatória, sendo eliminada através do processo de atresia folicular, ainda durante o desenvolvimento folicular inicial, diminuindo expressivamente o número de oócitos, reduzindo a vida reprodutiva na fêmea. Desta forma, a implementação de estudos que elucidem os mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais se faz necessário. Sabe-se que vários fatores de crescimento, peptídeos e hormônios estão envolvidos na foliculogênese, regulando diversos processos como a formação, ativação e crescimento dos folículos primordiais, bem como controlando o crescimento oocitário e na multiplicação das células da granulosa. Além disso, a jacalina é uma lectina tetramérica, específica para D-galactose, pode atuar na promoção de interações célula-célula e célula-matriz, podendo facilitar a proliferação, diferenciação e migração celular (STULNIG *et al.*, 1993). Desta forma, a sua adição ao cultivo *in vitro*, poderá contribuir para o estabelecimento de um meio de cultivo ideal que promova o desenvolvimento dos folículos primordiais.

Assim, a análise do perfil de expressão de genes, como PCNA, BMP-15, GDF-9, Kit-Ligante e seu receptor c-kit, através da técnica de PCR em tempo real, torna-se relevante para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese inicial e no processo de atresia.

Na revisão de literatura a seguir, serão abordados aspectos relacionados ao ovário mamífero, oogênese e foliculogênese, atresia folicular, controle da foliculogênese por FSH, a lectina jacalina e sua ação na multiplicação celular.

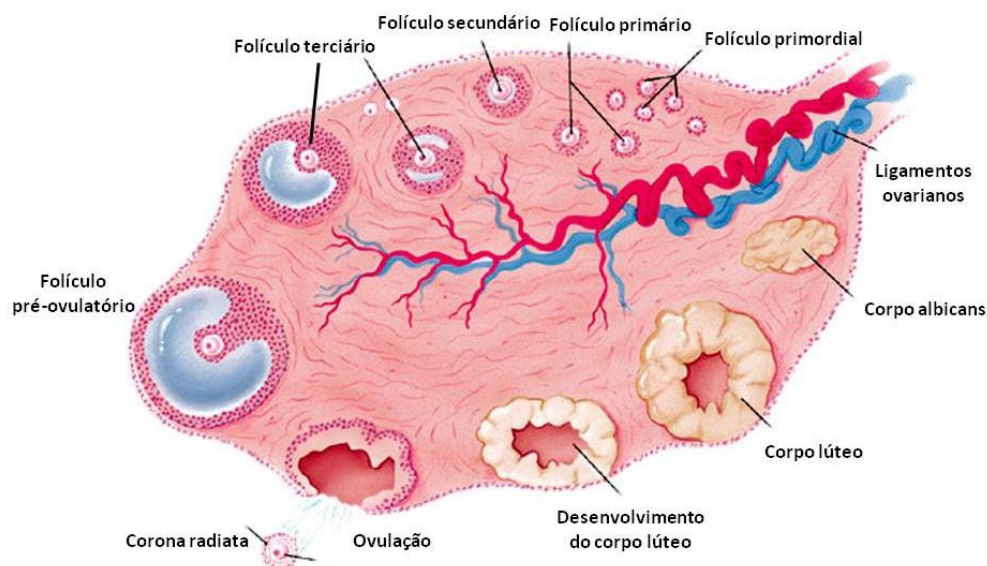
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário mamífero

O ovário dos mamíferos destaca-se por ser um órgão complexo, desempenhando funções endócrinas e gametogênicas (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). A função endócrina envolve a produção de hormônios, fatores de crescimento e peptídeos, enquanto a gametogênica promove a produção e liberação de oócitos maduros (SAUMANDE *et al.*, 1991). Sob o ponto de vista histológico, este órgão é constituído por duas regiões distintas, a cortical e a medular. A região medular é caracterizada pela presença de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e fibras de colágeno, sendo responsável pela sustentação e nutrição do ovário. O córtex ovariano é composto de tecido conjuntivo, folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos (SILVA, 2005) (Figura 1).

As substâncias de origem ovariana, associadas a hormônios e peptídeos carregados pela corrente sanguínea, estão envolvidas na formação de um sistema complexo que regula o desenvolvimento folicular e a ciclicidade, contribuindo para a manutenção das funções reprodutivas das fêmeas mamíferas (HIRSHFIELD, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Figura 1. Esquema ilustrando o ovário mamífero com suas principais estruturas.



Fonte: Adaptado de <<http://www.servier.co.uk/medical-art-gallery/SlideKit.asp?kit=43>>.

2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

2.2.1 Oogênese

A oogênese é precedida pela evolução de dois eventos celulares, ou seja, a formação das células germinativas primordiais (CGPs) e das oogônias. As CGPs são formadas durante o período embrionário e possuem origem extragonadal, pois são derivadas do endoderma do saco vitelínico do embrião. Essas células migram para o mesênquima da crista genital, onde colonizam as gônadas indiferenciadas (PEPLING *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2008). Alguns fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas óssea (BMP) tipo 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) e 8b (BMP-8b), estão envolvidos na formação das CGPs a partir do ectoderma e endoderma extra-embriônico (Van den HURK e ZHAO, 2005). Essa migração das células germinativas para as gônadas indiferenciadas é estimulada por vários fatores, como o kit ligante (KL), que também participa da proliferação e sobrevivência celular (GU *et al.*, 2009). Posteriormente, estas células sofrem sucessivas mitoses e se diferenciam em oogônias, que são circundadas por células somáticas derivadas do mesonéfron. Após a formação das oogônias, originam-se os oócitos, que se encontram na primeira divisão meiótica na fase de prófase I (diplóteno) ou oócito primário. Porém, o processo de divisão meiótica é interrompido permanecendo assim até a liberação de LH, após o animal atinge a puberdade (Van den HURK e ZHAO, 2005).

2.2.2 Foliculogênese

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a gênese do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (Van den HURK e ZHAO, 2005). Em espécies mamíferas, o desenvolvimento de oócitos e folículos caracterizam-se por uma sequência de eventos que inicia com a formação do ovário durante o desenvolvimento fetal e termina com a ovulação do oócito fertilizável com núcleo em metáfase II após a puberdade, em um processo denominado foliculogênese (Van den HURK e ZHAO, 2005; GOUGEON, 2010; ZHANG *et al.*, 2010). Por outro lado, em algumas espécies, como por exemplo, em roedores, este processo tem início durante os primeiros dias após o nascimento (FORTUNE, 2003).

O folículo ovariano é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células da granulosa, membrana basal e células da teca. A sincronia entre produção e resposta a hormônios e fatores de crescimento pelas células dos folículos ovarianos, promovem um ambiente adequado para crescimento e desenvolvimento oocitário, deixando-os aptos à fecundação (SMITZ; CORTVDRINDT, 2002). Os folículos ovarianos podem ser classificados em folículos pré-antrais e antrais, de acordo com a ausência ou presença da cavidade repleta de fluido folicular, denominado antro. Os folículos pré-antrais apresentam variados graus de desenvolvimento: primordiais, de transição, primários e secundários. Já os folículos antrais são também chamados de terciários e pré-ovulatório (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A compreensão dos mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular consiste em uma das principais linhas de pesquisa na área de reprodução, pois é um evento complexo que envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Esses fatores atuam de maneira estágio-específico e controlam os vários processos fisiológicos, entre eles a proliferação e diferenciação de células foliculares, esteroidogênese, vascularização e atresia folicular (WEBB *et al.*, 2003; ACOSTA e MIYAMOTO, 2004; FORTUNE *et al.*, 2004).

2.2.3 Formação e ativação dos folículos primordiais

A formação dos folículos primordiais ocorre após a colonização das células germinativas primordiais e diferenciação de oogônias em oócitos. Quando é iniciada a meiose, o oócito é circundado pelas células da pré-granulosa achatadas, originadas do mesonéfron ou do epitélio germinativo da superfície ovariana, formando os folículos primordiais (McNATTY *et al.*, 2000). Após a sua organização, o início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (Van den HURK, 2005).

Os folículos primordiais são constituídos de um oócito imaturo, circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso e encontra-se em estágio de quiescência ou repouso (HUTT *et al.*, 2006). O processo de ativação desses folículos resulta na transformação dessas células da pré-granulosa de formato pavimentoso para formato cuboidal. Após a ocorrência deste evento, os folículos quiescentes deixam o *pool* de reserva e iniciam a fase de crescimento, passando pelos estágios de folículos em transição, primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios. Além disso, uma das características

marcantes na ativação folicular é a intensa proliferação das células da granulosa, como também crescimento oocitário e aumento da síntese de RNA (WASSARMAN *et al.*, 1994). O início do crescimento do folículo primordial é essencial para a reprodução da fêmea, e os mecanismos reguladores deste processo tem sido investigados nos últimos anos (HIRSHFIELD *et al.*, 1991; PARK *et al.*, 2005). Além disso, os folículos em crescimento se encontram na porção córtico-medular que é ricamente vascularizada (van WEZEL *et al.*, 1996) sugerindo que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais depende de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento.

Durante a formação dos folículos primordiais, o hormônio folículo estimulante (FSH) pode atuar regulando a ação de E-caderina e N-caderina, glicoproteínas do tipo transmembranárias que possuem relevante papel na formação dos folículos primordiais (WANG e ROY, 2010). Outros estudos têm revelado que o fator de transcrição em linhagem germinativa alfa (*Fga*) é expresso no oócito e participa na formação de folículos primordiais (SOYAL *et al.*, 2000). Além disso, este fator coordena a expressão dos genes estruturais para os componentes da zona pelúcida (EPPIG *et al.*, 2001). Após a sua formação, os folículos primordiais podem ter três destinos: (1) serem ativados e crescer, (2) sofrer atresia, ou (3) permanecer em quiescência. A quiescência é importante para promover a manutenção da reserva folicular ovariana, impedindo que todos os folículos sejam ativados simultaneamente, o que ocasionaria o esgotamento da reserva folicular (REDDY *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado que várias substâncias, como por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), a BMP-4 e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) são extremamente importantes para a manutenção da viabilidade destes folículos (REYNAUD e DRIANCOURT, 2000; MARKSTRÖM *et al.*, 2002; NILSSON e SKINNER, 2003).

Estudos recentes com folículos primordiais caprinos têm demonstrado que o controle do início do crescimento folicular é regulado por diversos fatores, como o KL (CELESTINO *et al.*, 2010), FSH (MATOS *et al.*, 2007a), BMP-7 (ARAÚJO *et al.*, 2010), FGF-2 (MATOS *et al.*, 2007d), GDF-9 (MARTINS *et al.*, 2008), IGF-1 (MARTINS *et al.*, 2009), EGF (SILVA *et al.*, 2004b), ativina-A (SILVA *et al.*, 2006b), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (BRUNO *et al.*, 2009), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (BRUNO *et al.*, 2010), estradiol e progesterona (LIMA-VERDE *et al.*, 2010), promovem a ativação de folículos primordiais e o crescimento oocitário.

Recentemente, ovários de ratas foram cultivados *in vitro* na presença de FSH e ativina-A e foi observado que essas substâncias, individualmente, promovem a transição de folículos primordiais a folículos primários, mas a associação de FSH e ativina-A reduz a taxa de crescimento e viabilidade folicular (COSSIGNY *et al.*, 2012). Outros fatores de crescimento envolvidos na transição e no desenvolvimento dos folículos primordiais de camundongas são o fator inibidor de leucemia (LIF) (NILSSON *et al.*, 2002), KL (PARROTT e SKINNER, 1999a) e BMP-15 (OTSUKA *et al.*, 2000). Estes fatores de crescimento desempenham papéis cruciais na manutenção da viabilidade e crescimento folicular.

No tocante aos mecanismos envolvidos nesses, alguns estudos demonstraram que o LIF aumenta a expressão de RNAm para o KL em células da granulosa de ratas durante a ativação folicular, indicando que estes fatores podem interagir durante o desenvolvimento de folículos primordiais (NILSSON *et al.*, 2002). Em ovelhas, o c-kit está localizado em oócitos de folículos em crescimento, enquanto que o KL é produzido por células da granulosa de folículos primordiais e primários (McNATTY *et al.*, 1999). Em caprinos, folículos primordiais apresentam aumento nos níveis de RNAm para a BMP-6 durante a transição para o estágio primário (SILVA *et al.*, 2006a). Além disso, foi demonstrado que o FGF-2 é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais em culturas de córtex ovariano e de promover proliferação de células da granulosa (murinos: NILSSON *et al.*, 2001; caprinos: MATOS *et al.*, 2007c). Além disso, foi demonstrado que a adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de ovinos (ANDRADE *et al.*, 2005) e caprinos (MATOS *et al.*, 2007a, MAGALHÃES *et al.*, 2009a) é importante para a manutenção da viabilidade e a ativação folicular. Em hamsters, WANG *et al.*, (2004) verificaram que o FSH regula a expressão do E2 no tecido ovariano durante a formação de folículos primordiais.

Além dos estímulos parácrinos, diversos mensageiros intracelulares estão envolvidos nos mecanismo de controle da dormência, sobrevivência e início do desenvolvimento dos folículos primordiais. O controle de ativação folicular pode ocorrer pela ativação da via do fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) em oócitos. Recentemente, a via PI3K em oócitos ganhou mais atenção e suas funções na ativação e desenvolvimento folicular têm sido investigadas extensivamente (REDDY *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 2009). A caracterização funcional da via PI3K em oócitos em crescimento foi iniciado a partir de estudos *in vitro*, onde Akt (proteína quinase), FOXO3a, FKHL1, que são componentes importantes para o funcionamento da via PI3K tiveram a sua expressão demonstrada em oócitos de ratas e camundongas (REDDY *et al.*, 2005).

O KL é um dos fatores responsáveis pela ativação da via PI3K em oócitos primários cultivados *in vitro*, levando à fosforilação da Akt e FOXO3a (REDDY *et al.*, 2005). A via de sinalização PI3K consiste de moléculas como quinases, fosfatases, e fatores de transcrição que regulam a proliferação celular, sobrevivência, migração e metabolismo. As PI3Ks são quinases lipídicas que fosforilam o grupo 3'-OH do anel inositol de fosfolipídios inositol. Como um regulador da via PI3K, tem-se a fosfatase PTEN, e a exclusão do PTEN em oócitos de folículos primordiais resultou na ativação precoce do *pool* de folículos primordiais, comprovando que a via PI3K/PETEN regula a ativação folicular (REDDY *et al.*, 2008).

Dentre os fatores de transcrição presentes e atuantes na via PI3K podemos citar os fatores da família FOXO, que incluem o FOXO1, FOXO3a e Foxo4, que atuam como substratos da via Akt (ARDEN *et al.*, 2002; ACCILI *et al.*, 2004). Nos mamíferos, a Akt pode fosforilar três serinas conservadas ou resíduos de treonina em Foxo1, FOXO3a, e Foxo4, que levam ao deslocamento das moléculas de FOXO para o citoplasma. Tais deslocamentos suprimem suas atividades como fatores de transcrição para promover apoptose e parada do ciclo celular (ARDEN *et al.*, 2002; BRUNET *et al.*, 1999).

Em ovários de camundongas, o FOXO3a inibe a ativação folicular, preservando a reserva do *pool* de folículos primordiais (DIEGO *et al.*, 2003). A cascata PI3K-PDK1 no oócito regula o envelhecimento ovariano através da regulação da sobrevivência dos folículos primordiais (REDDY *et al.*, 2010). Além disso, a via PI3K e FOXO3 controla a ativação dos folículos primordiais (JOHN *et al.*, 2008). O mTORC1 é uma serina treonina quinase que regula crescimento e a proliferação celular na presença de fatores de crescimento e nutrientes. O mTORC1 atua mediante a modulação dos processos tais como síntese de proteínas, biogênese ribossomal e autofagia (GUERTIN *et al.*, 2007; SARBASSOV *et al.*, 2005; WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). Estudos indicam que o mTOR apresenta função similar a PI3K durante a ativação de folículos primordiais (REDDY *et al.*, 2010). Desta forma, o *pool* de folículos primordiais é mantido por várias moléculas inibidoras de crescimento, incluindo PTEN, p27, FOXO3a, FOXL2, e AMH (DEEPAK e KUI LIU, 2009). Além disso, em mulheres, a proteína 1 de esclerose tuberosa (TSC1) possui a capacidade de suprimir a ativação folicular, regulando negativamente o complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1), que atua na manutenção da quiescência dos folículos primordiais (ADHIKARI *et al.*, 2010). O mTORC1 é uma serina treonina quinase que pode atuar promovendo a ativação dos folículos primordiais, regulando assim o crescimento e a proliferação celular em vários tipos de células em resposta a fatores de crescimento e

nutrientes. Ao mesmo tempo, a sobrevivência de folículos primordiais é mantida através da PI3K presente no citoplasma que vai atuar iniciando a produção de fosfatidilinositol 3, 4, 5 – o – trifosfato–PIP3 a partir do PIP2, no entanto, o PTEN converte o PIP3 em PIP2. Em estudos recentes verificou-se que TSC e PTEN manipulam a ativação folicular através da regulação negativa da proteína ribossomal S6 – rpS6 (ADHIKARI *et al.*, 2009). Na ausência das moléculas que promovem a sobrevivência dos folículos primordiais, incluindo PDK1 e rpS6, todos os folículos primordiais são perdidos prematuramente a partir do seu estado quiescente (REDDY *et al.*, 2009).

Além dos sinais inibitórios que bloqueiam a ativação prematura dos folículos primordiais, existem outros sinais que estimulam a transição de folículos primordiais para primários. Com ações coordenadas e sinérgicas, os sinais decorrentes de diferentes compartimentos, como oócitos, células somáticas (granulosa e teca) e estroma, iniciam o crescimento dos folículos primordiais. Isto pode explicar o motivo pelo qual os folículos primordiais não sobrevivem quando cultivados isoladamente, mas crescem quando cultivados inclusos no tecido ovariano (O'BRIEN *et al.*, 2003).

Acredita-se então que a ativação dos folículos primordiais seja regulada por um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios originários do ovário (Van den HURK e ZHAO, 2005), de modo que a diminuição dos níveis de fatores inibitórios ou o aumento dos níveis de fatores estimulatórios, inicia o processo de ativação (WANDJI *et al.*, 1996; FORTUNE *et al.*, 2003) (Figura 2).

2.2.4 Desenvolvimento de folículos primários, secundários e formação de antro.

As características predominantes dos folículos primários a presença de uma camada de células da granulosa de formato cubóide e o início do surgimento das junções *gap* entre estas células, que são canais intercelulares que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundos mensageiros e pequenos metabólitos de uma célula para outra. Estes canais são compostos de conexinas (Cx), sendo a conexina 43 (Cx43) a mais abundante no ovário, uma vez que esta é expressa nas células da granulosa desde o início da foliculogênese (ACKERT *et al.*, 2001).

Fig. 2: Via de sinalização PI3K, que se inicia com a ligação dos fatores de crescimento aos seus receptores tirosina quinase específicos, induzindo a ativação da via PI3K, que atua iniciando a formação de PIP3 a partir do

PIP2, no entanto, o PTEN irá desfosforilar e converter o PIP3 em PIP2, desta forma, regula negativamente a atividade da PI3K, além de promover a manutenção da quiescência dos folículos primordiais. Em seguida, o PDK1 e o Akt, são recrutados, após a ligação com o PIP3, ocorrendo assim a conversão de PI3K em PDK1. A via Akt pode atuar fosforilando e ativando o FOXO3, o complexo TSC1/TSC2 e a proteína p27. Enquanto isso, o Akt vai fosforilar e ativar o mTORC1, o qual irá fosforilar a proteína quinase S6K1 que tanto essa proteína como o PDK1 atuam fosforilando e ativando a proteína ribossomal – rpS6. Com isso, as principais moléculas que atuam na manutenção dos folículos primordiais são o PTEN, FOXO3, complexo TSC1/TSC2 e p27, enquanto que os que promovem a ativação são o PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6.

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

Estudos tem relatado que as conexinas desempenham papéis importantes no desenvolvimento de folículos primários (Cx43) e secundários (Cx37) (SIMON *et al.*, 1997; JUNEJA *et al.*, 1999). As junções *gap* também auxiliam na comunicação direta entre as células da granulosa e o oócito, projetando-se através da zona pelúcida, chegando à membrana plasmática do oócito (JUNEJA *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 1997). Além disso, essa comunicação entre oócito e células da granulosa pode ser denominada como uma comunicação bidirecional, formando assim um complexo que regula o desenvolvimento celular (EPPIG *et al.*, 2001). A membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária (LUCCI *et al.*, 2001). Nesses folículos, as glicoproteínas que irão formar a zona pelúcida (Zona pelúcida 1 - ZP1, Zona pelúcida 2 – ZP2 e Zona pelúcida 3 – ZP3)

(RANKIN *et al.*, 2001) começam a ser sintetizadas, tornando-se claramente visíveis apenas em folículos secundários (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Para avaliar o crescimento folicular são necessários estudos utilizando marcadores sensíveis para detectar o crescimento folicular (WANDJI *et al.*, 1996). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um marcador expresso por células em crescimento e proliferação, está envolvida na fase S do ciclo celular, fase esta que é responsável pela replicação do DNA (WANDJI *et al.*, 1996). Portanto, pode ser considerado um marcador operacional de proliferação celular marcando células tanto em proliferação como células em reparo (BACCHI e GOWN, 1993). Recentemente, o PCNA foi utilizado como um método de imuno-coloração para aperfeiçoar a contagem de folículos ovarianos inclusos em fragmentos ovarianos suínos (PHOOPHITPHONG *et al.*, 2012).

À medida que o folículo cresce, ocorre intensa multiplicação das células da granulosa, formando uma nova camada de células, dando origem aos folículos secundários. Estes folículos são constituídos por um oócito imaturo circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia. Com o desenvolvimento dos folículos, o espessamento da zona pelúcida torna-a visível (LUCCI *et al.*, 2001), ocorre a formação das células da teca a partir do estroma intersticial (HONDA *et al.*, 2007) e também o aumento do número de microvilos. Estes microvilos passam a facilitar a captação de nutrientes e a excreção de metabólitos, demonstrando-se essenciais para a sobrevivência oocitária. Além disso, durante a progressão de folículo primário para secundário ocorre o crescimento do oócito e a proliferação das células da granulosa. Desta forma, durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e as células circundantes se diferenciam (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Concomitante com a formação dos folículos secundários, aparecem as células da teca que passam a formar uma camada circundante. Estas células especializadas surgem a partir de células precursoras presentes no estroma ovariano (HONDA *et al.*, 2007). As células indiferenciadas, não expressam receptores para LH (LHRs) ou enzimas esteroidogênicas e portanto, não são responsivas ao LH, mostrando que o início da diferenciação das células da teca independe de gonadotrofinas (MAGOFFIN e WEITSMAN, 1994). À medida que o folículo cresce, a camada de células da teca se estratifica e se diferencia em duas partes: a parte externa, denominada teca externa, que é composta de células não diferenciadas, enquanto que as células localizadas mais internamente formam a teca interna, na qual algumas

células diferenciam-se e passam a secretar esteróides (GOUGEON, 2010). As células da teca interna são definidas quando os folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa (LUCCI *et al.*, 2001). O crescimento de folículos secundários é dependente da regulação de fatores autócrinos e parácrinos.

Progressivamente, com o crescimento, os folículos tornam-se vascularizados, e os folículos secundários são sustentados por uma ou duas arteríolas. A importância fisiológica deste evento é enfatizada pelo fato de que, a partir desse momento, os folículos tornam-se diretamente expostos a fatores circulantes no sangue (GOUGEON, 2010), o FSH (JAYAPRAKASAN *et al.*, 2007b). Nesse estágio, os oócitos entram em extensiva fase de crescimento, resultando em uma complexa organização citoplasmática dependente da síntese de novos produtos gênicos e organelas, bem como da modificação e redistribuição das organelas já existentes (PICTON *et al.*, 1998). Além do expressivo aumento no número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas, os oócitos em crescimento acumulam grânulos glicogênicos, proteínas e lipídios, e sofrem ainda um incremento na síntese de RNA e proteínas, considerados importantes para garantir a futura competência meiótica (Van den HURK e ZHAO, 2005).

Embora folículos primários e secundários já apresentem receptores para FSH nas células da granulosa (OKTAY *et al.*, 1997), o FSH desempenha apenas um papel permissivo, ao invés de essencial, ao desenvolvimento desses folículos. Aliado a isso, experimentos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que o crescimento e a atresia de um grande número de folículos já no estágio secundário são influenciados por gonadotrofinas (Van den HURK *et al.*, 1997; Van den HURK *et al.*, 2000; McGEE e HSUEH, 2000).

Com o crescimento dos folículos secundários ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antra. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT *et al.*, 2006). Alguns estudos mostram que os componentes do fluido folicular é originalmente derivado da vascularização das camadas tecais adjacentes (CLARKE *et al.*, 2006). Já foi evidenciado a presença de grandes moléculas osmoticamente ativas no fluido folicular ovariano, tais como ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatan, que são fortemente hidrofílicas e carregadas negativamente, e assim contribuem diretamente para uma intensa atividade osmótica (CLARKE *et al.*, 2006).

Os proteoglicanos (PGs) são moléculas de matrizes extracelulares que têm sido implicados no processo de desenvolvimento folicular ovariano. Estas moléculas foram identificadas no fluido folicular ovariano de bovinos (LENZ *et al.*, 1982) e humanos (ERIKSEN *et al.*, 1999). Além do versican (IRVING-RODGERS *et al.*, 2004), que é um sulfato de condroitina proteoglicano, uma série de outras PGs, tais como decorina, perlecan e nidogen foram identificados e localizados no ovário (MAGGIE *et al.*, 2000). No ovário, o versican foi identificado em extrato de folículos ovarianos bovinos (McARTHUR *et al.*, 2000), em fluido folicular de folículos não ovulados (CLARKE *et al.*, 2006), de folículos ovulados (ERIKSEN *et al.*, 1999) e ainda na membranas foliculares de células da granulosa (IRVING-RODGERS *et al.*, 2004). Esta proteína também é expressa em células da granulosa (RUSSELL *et al.*, 2003a). Os padrões de expressão diferenciadas de alguns destes, sugerem que eles podem ter papel fundamental no desenvolvimento folicular, incluindo na formação da cavidade antral e fluido folicular.

2.3 Crescimento folicular na fase antral

O crescimento dos folículos durante a fase antral é caracterizado pela proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca, aumento da vascularização folicular, crescimento do oócito e aumento do antro (WU *et al.*, 2007). As células da granulosa que ficam próximas ao oócito sofrem diferenciação para formar as células do *cumulus*, enquanto que as demais formam as células da granulosa murais. Os folículos antrais podem ser classificados como pequenos ou grandes folículos antrais. Os pequenos folículos antrais apresentam crescimento rápido em diâmetro e decorrente acúmulo de fluido folicular (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Os grandes folículos antrais, com diâmetro acima de 3 mm, acumulam grande quantidade de fluido folicular (Van den HURK e ZHAO, 2005). Quando atingem o estágio de pré-ovulatórios apresentam o oócito circundando por várias camadas de células do *cumulus*. Neste estágio as células da granulosa param de se multiplicar, sofrendo um processo final de diferenciação devido à ação do LH (DRIANCOURT *et al.*, 2001).

A foliculogênese ocorre em dois estágios, dependente e não dependente de gonadotrofinas, enquanto o desenvolvimento folicular na fase antral, possui três fases: recrutamento, seleção e dominância. As gonadotrofinas secretadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário desempenham funções fundamentais na regulação do desenvolvimento

folicular. O FSH e o LH são reguladores primários durante a fase dependente de gonadotrofinas (DRIANCOURT *et al.*, 2001). Em algumas espécies a dependência de gonadotrofinas e o recrutamento ocorrem quando os folículos atingem 0,2 mm em camundongos, 2 mm em ovinos e primatas e 3 mm em caprinos e bovinos (DRIANCOURT *et al.*, 2001; RUBIANES e MENCHACA, 2003).

O recrutamento folicular ocorre em resposta ao FSH e tem início com folículos que estão aptos para prosseguir o desenvolvimento em direção à ovulação ou atresia. Além disso, o recrutamento folicular ocorre normalmente com baixas frequências de pulsos de LH (DRIANCOURT *et al.*, 2001), no entanto, em caprinos esse recrutamento pode ser em virtude do aumento da concentração de estrógenos (CASTRO *et al.*, 1999). A fase de seleção é o processo pelo qual o folículo irá divergir dos demais, apresentando potencial para ovular. Segundo FORTUNE *et al.*, (2004), o recrutamento de cada onda é iniciado através do pequeno aumento dos níveis FSH circulante. A síntese de receptores para o FSH e de estrogênio nas células da granulosa e para o LH nas células da teca, é necessária para os folículos entrarem na fase dependente de hormônio (STABENFELDT e EDQVIST, 1996).

A dominância folicular ocorre com o folículo selecionado que se destaca entre os demais folículos da mesma onda, impedindo o recrutamento de uma nova onda folicular, bem como o crescimento de outros folículos (GINTHER, 1996a). Portanto, esta fase é determinada pela dependência de LH, que é o hormônio chave envolvida no crescimento final do folículo dominante (DRIANCOURT, 2001). Nesta fase do desenvolvimento folicular final, os folículos dominantes possuem maior quantidade de RNAm para receptor de LH nas células da granulosa e da células da teca quando comparados com os folículos recrutados. No entanto, os níveis de RNAm para os receptores de FSH nas células da granulosa diferem (FORTUNE *et al.*, 2004).

A dinâmica folicular em caprinos é caracterizada pelo padrão de ondas de crescimento folicular, que darão origem a um ou mais folículos com diâmetros iguais ou superiores a 5 mm (CASTRO *et al.*, 1999). GINTHER e KOT (1994) encontraram padrão predominante de quatro ondas foliculares. A primeira onda folicular e a onda ovulatória são ativas produtoras de estradiol e os grandes folículos exercem dominância sobre outros folículos da mesma onda (CASTRO *et al.*, 1999). Contudo, a última onda folicular do ciclo estral fornece um folículo ovulatório, com isso o folículo dominante da primeira onda sofre atresia. Essa atresia ocorre em virtude da presença do corpo lúteo, que produz progesterona, que exerce uma retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário, diminuindo a

produção de LH. No momento da luteólise, o efeito da progesterona é removido e o folículo maior produzirá maior quantidade de estrógeno e exercerá dominância sobre todos os folículos subordinados da mesma onda. Conseqüentemente os níveis basais de FSH diminuem em decorrência da produção de inibina pelo folículo dominante, e os outros folículos subordinados sofrem atresia. Após a ovulação, não ocorrendo à fecundação, o corpo lúteo regride e diminui a secreção de progesterona, iniciando-se um novo ciclo (CASTRO *et al.*, 1999).

2.4 Controle da foliculogênese por hormônios

Além dos hormônios, fatores de crescimento também influenciam a foliculogênese, embora a identificação e a ação de muitos destes ainda não sejam conhecidas (BRITT e FINDLAY *et al.*, 2003). O crescimento folicular ovariano pode ser regulado por gonadotrofinas, somatotrofinas e fatores intra-ovarianos. Fatores estes que são responsáveis pelo o crescimento e diferenciação celular, que irão atuar modulando a ação das gonadotrofinas, como o FSH e LH no desenvolvimento folicular ovariano (SILVA *et al.*, 2006a).

O papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento folicular pré-antral é controverso, uma vez que os folículos pré-antrais e antrais iniciais possuem RNAm para receptores de FSH nas células da granulosa, mas são relativamente independentes de gonadotrofinas durante seu período de crescimento inicial, aumentando em tamanho na ausência ou presença de baixas concentrações de FSH e LH (Van den HURK e ZHAO, 2005). Por outro lado, a expressão de RNAm para os receptores de FSH foram detectados em várias categorias foliculares (primários, secundários e folículos antrais) de ovários caprinos (SARAIVA, *et al.*, 2010b) e em folículos primários e secundários de bovinos (WANDJI *et al.*, 1992).

A adição de FSH ao meio de cultivo de fragmentos ovarianos caprinos tem sido importante para o desenvolvimento folicular *in vitro*, pois mantém a sobrevivência folicular e permite a ativação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano (MATOS *et al.*, 2007a, MAGALHÃES *et al.*, 2009b). Além disso, em outros estudos tem sido demonstrado que o FSH tem influenciado no desenvolvimento de folículos pré-antrais, pois promoveu o crescimento de folículos secundários bovinos e aumentou as taxas de formação de antro após 28 dias de cultivo (GUTIERREZ *et al.*, 2000). O FSH também promoveu o crescimento de

folículos primários e secundários (60-179 μm), isolados enzimaticamente de ovários de fetos bovinos, bem como a sobrevivência folicular e a secreção de progesterona e estradiol (WANDJI *et al.*, 1996).

A estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral pode ser alcançada pela adição de FSH ao meio de cultivo, demonstrando que esta fase é responsiva à este hormônio. O sucesso do cultivo *in vitro* pode estar relacionado à presença de FSH, mas diversos fatores como a origem desta gonadotrofina, podem influenciar a sua eficiência (MAGALHÃES *et al.*, 2009b). Já o LH tem ação intensificada nos estágios mais avançados do desenvolvimento folicular, durante a fase pré-ovulatória (WU *et al.*, 2000). O cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos utilizando FSH e LH promove a manutenção folicular e integridade ultraestrutural (SARAIVA *et al.*, 2008b).

2.5 População folicular e atresia

A quantidade total de folículos presentes no ovário mamífero difere entre espécies e indivíduos (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), observando-se, aproximadamente, 1.500 folículos em camundongas (SHAW *et al.*, 2000), 235.000 em vacas (BETTERIDGE *et al.*, 1989), 33.000 em ovelhas (AMORIM *et al.*, 2000), 35.000 em cabras (LUCCI *et al.*, 1999) e em torno de 2.000.000 em mulheres (ERICKSON *et al.*, 1986).

Ao longo da vida reprodutiva do animal é observada uma redução ordenada no número de folículos pré-antrais (SHAW *et al.*, 2000). Essa redução é devido a dois fenômenos que ocorrem naturalmente no ovário: 1) ovulação e 2) atresia/morte folicular. Somente uma pequena parte (0,1%) dos folículos primordiais chega à ovulação (NUTTINCK *et al.*, 1993), pois a maioria (99,9%) torna-se atrésica durante as fases de crescimento e maturação oocitária (OTALA *et al.*, 2002), fazendo com que o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório a partir de um folículo primordial seja um evento biológico extremamente raro (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A atresia pode ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE *et al.*, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A degeneração pode ser observada quando ocorrem alterações no fornecimento de oxigênio e nutrientes para o ovário. Nesta situação, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular. Essas alterações podem levar ao aumento de água intracelular e do volume celular, vacuolização citoplasmática,

extravasamento do conteúdo celular para o tecido circundante (ELMORE, 2007) e, conseqüentemente, degeneração (BARROS *et al.*, 2001).

Já a apoptose é o processo de morte celular individual e ativo, caracterizado pela fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (RACHID *et al.*, 2000), sem alteração de organelas e liberação dos constituintes celulares para o tecido circundante (ELMORE, 2007). É um evento determinado geneticamente, ou seja, depende do balanço da expressão de genes pró e anti-apoptóticos (BARNETT *et al.*, 2006), e é observado nos folículos ovarianos durante toda a vida fetal e adulta. De acordo com o estímulo apoptótico inicial, a apoptose pode ocorrer através de receptores de superfície celular (receptores de morte), constituindo a via extrínseca, ou ainda através de fenômenos ocorridos na mitocôndria, constituindo esta a via intrínseca. No entanto, há evidências de que os dois caminhos estejam ligados e que as moléculas de uma via pode influenciar a outra (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Independente da via efetora, apoptótica ou degenerativa (necrose), a atresia é observada em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, sendo, no entanto, predominante na fase antral (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Além de ser regulada por fatores endócrinos (FSH e LH), fatores parácrinos também influenciam na decisão da morte celular durante a foliculogênese. Diante disso, vários estudos (ANDRADE *et al.*, 2005, MATOS *et al.*, 2007a) têm sido realizados na tentativa de desenvolver um sistema de cultivo que possa promover a ativação e o crescimento folicular *in vitro*, para evitar assim as perdas foliculares que ocorrem naturalmente *in vivo*.

Diante da complexidade dos eventos que regem a foliculogênese e da nítida importância dos fatores de crescimento intra-ovarianos para a regulação do crescimento folicular e da atresia (FORTUNE, 2003; Van den HURK e ZHAO, 2005), vários pesquisadores têm focado suas investigações no teste de inúmeras concentrações e/ou associações de fatores de crescimento em sistemas de cultivo *in vitro*. Nesse contexto, torna-se também importante a avaliação de substâncias exógenas, como por exemplo, a lectina jacalina.

2.6 A lectina jacalina e a sua importância para multiplicação celular

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas com capacidade de aglutinar determinados tipos de células, devido à presença de sítios de ligação com afinidade específica

e reversível a carboidratos. As lectinas podem ser encontradas em animais, vegetais e microorganismos, possuindo especificidade de acordo com o carboidrato em que ela tenha afinidade (PEUMANS e DAMME, 1995b; GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Segundo SELL *et al.*, (2003) os carboidratos de superfície podem desempenhar importante papel na regulação da sinalização celular.

A jacalina e a artocarpina são lectinas que se originam da semente da jaca (*Artocarpus integrifolia*), que ao longo dos anos vem despertando o interesse de pesquisadores, devido ao seu potencial bioquímico e biotecnológico (SELL *et al.*, 2000). Além disso, a jacalina é uma lectina tetramérica, específica para D-galactose, com massa molecular de 39,5 kDa, constituída pelas cadeias α e β (YOUNG *et al.*, 1991). Esta lectina apresenta interações com manose (Man), glucose (Glc), metil- α -galactose (Me- α -Gal), metil- α -manose (Me- α -Man), metil- α -glicose (Me- α -Glc) e outro mono e oligossacarídeos com atividade biológica relevante (JEYAPRAKASH *et al.*, 2005).

As lectinas de origem vegetal são classificadas em sub-grupos de acordo com o sítio de ligação com os carboidratos-alvos, ou seja, merolectina, com apenas um sítio de ligação a carboidratos; hololectina, com dois ou mais sítio homólogos de união e a quimerolectina, com diferentes locais de união (PEUMANS e DAMME, 1995b). Assim, a jacalina é uma hololectina, pois podem se ligar a mais de um carboidrato do mesmo tipo, como manose e galactose. Em geral, as hololectinas são proteínas oligoméricas que se apresentam como dímeros ou tetrâmeros constituídos de dois ou mais domínios idênticos de reconhecimento a carboidratos, possuindo assim atividade aglutinadora de células (VAN DAMME *et al.*, 2008).

MISQUITH *et al.*, (1994) demonstraram que o extrato de semente de jaca apresenta ação mitogênica potente em linfócitos T e B. Devido a utilização do extrato bruto, o efeito mitogênico também pode ser devido à presença de uma segunda lectina também presente na mesma semente da jaca, ou seja a artocarpina. Outros estudos mostraram que a adição de jacalina durante o cultivo de células leucêmicas humanas (K562), promove alterações morfológicas nestas células, fazendo com que as células K562 não aderentes, adquirissem à capacidade de adesão à superfície da placa de cultivo (YAGI *et al.*, 1995). Devido à capacidade das lectinas promoverem interações célula-célula e célula-matriz, elas podem desempenhar uma função fundamental na proliferação, diferenciação e migração celular (STULNIG *et al.*, 1993). No entanto, durante o cultivo de fibroblastos, foi demonstrado que a jacalina não promove alterações morfológicas nestas células e não afeta as taxas de adesão ou proliferação (SELL *et al.*, 2003).

Em ovários caninos já foi visto a união dos sítios de ligação da lectina jacalina com a zona pelúcida e o oolema de folículos ovarianos de animais pré-púberes (BLACKMORE *et al.*, 2004). Em outro estudo, foi demonstrado que a jacalina possui afinidade pela zona pelúcida de oócitos humanos (MOVILLA *et al.*, 2004). Além disso, estudos demonstraram que a incubação de oócitos maturados com osteopontina, que é uma glicoproteína presente no fluido uterino bovino e lectina *Ricinus communis agglutinin-1* (RCA-1) podem melhorar a ligação espermatozóide/oócito e fertilização *in vitro*, devido ao sítio de ligação de galactose pode interagir com as células do oócito e osteopontina (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Em suínos, os receptores de lectina na zona pelúcida de oócitos e nas células da granulosa podem ser visualizados através de análise ultraestrutural e já foi demonstrado que a ZP possui resíduos de açúcar, incluindo N-acetilglicosamina, manose, fucose, galactoses e resíduos de ácido siálico (PARILLO *et al.*, 2003). Algumas análises têm sido realizadas para se avaliar a distribuição de glicoproteínas presentes na zona pelúcida de ovários de ratas, durante o desenvolvimento folicular. Contudo, embora a distribuição dessas glicoproteínas (ZP2 e ZP3) seja uniforme na zona pelúcida, houve aumento na espessura da ZP de acordo com o aumento da proliferação das células foliculares, permitindo uma interação espermatozóides e oócito (AVILÉS *et al.*, 2000). Durante a foliculogênese a zona pelúcida podem apresentar modificações de acordo com o estágio folicular, isso em algumas espécies incluindo os humanos (BAR-SHIRA MAYMON *et al.*, 1994). Além disso, já foi demonstrado que alguma lectina, como a jacalina, apresenta capacidade de interagir com os espermatozóides humanos (NIXON *et al.*, 2005).

Durante o cultivo de folículos pré-antrais ovinos por 28 dias, a presença da lectina *fitohemaglutinina* (PHA) promoveu um aumento de viabilidade e do diâmetro folicular, por meio da ligação das lectinas às células da granulosa, promovendo assim melhor agregação celular nos folículos ovarianos cultivados *in vitro* (MURUVI *et al.*, 2005). Além disso, a adição de 10 µg/mL de PHA durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos estimulou a formação de antro, o aumento da expressão de FSH-R e PCNA e manteve a integridade ultraestrutural de folículos cultivados (CUNHA *et al.*, 2013).

3 JUSTIFICATIVA

Os caprinos são uma espécie de elevada importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países (PAULA *et al.*, 2008). No Brasil, sobretudo na região Nordeste, a espécie caprina concentra 90,6% do rebanho nacional (IBGE, 2010). Diversas biotécnicas vem sendo empregadas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos, dentre elas destaca-se a Manipulação de Oócitos inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) que se apresenta como uma importante opção, uma vez que o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais permitirá a posterior utilização dos oócitos contidos nestas estruturas em programas de produção *in vitro* de embriões. No entanto, para que estes folículos possam ser utilizados, necessitam ser ativados e posteriormente crescidos e maturados *in vitro*.

Os folículos primordiais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários de espécies mamíferas. Entretanto, a grande maioria destes folículos (99,9%) não evolui até a fase ovulatória, sendo eliminada através do processo de atresia folicular. Tal fenômeno reduz de maneira expressiva o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, em consequência, a produção de oócitos maduros e viáveis durante a vida reprodutiva de uma fêmea. Estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais são escassos, especialmente em animais de produção, como caprinos. Alguns trabalhos têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo de folículos pré-antrais tanto de animais de laboratórios como animais domésticos como vaca, cabra, ovelha.

Considerando a grande relevância econômica que a espécie caprina representa especialmente para o Nordeste brasileiro, aliado ao aproveitamento ainda incipiente de sua capacidade reprodutiva, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de promover a manutenção da viabilidade, crescimento e maturação de folículos primordiais caprinos, otimizando a utilização do potencial oocitário destes animais e incrementando a sua eficiência reprodutiva. Assim, oócitos oriundos destes folículos poderão, futuramente, ser destinados à produção *in vitro* de embriões e clonagem, contribuindo para a multiplicação de caprinos de alto valor zootécnico e/ou em vias de extinção, bem como para a implantação de bancos de germoplasma animal. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral.

Já é bem conhecido que hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos no controle do crescimento oocitário e na multiplicação das células da granulosa. No entanto, outras substâncias, como as lectinas, podem controlar o crescimento e maturação oocitária. No ovário de mamíferos as lectinas, como a jacalina, já foram identificadas em diversas espécies de mamíferos, como cadelas, cabras, vacas, mulheres, em diversos compartimentos foliculares, como na zona pelúcida, fluido folicular e oócitos (BLACKMORE *et al.*, 2004; MOVILLA *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2009). No que se refere à jacalina, esta lectina apresenta atividade mitogênica em vários tipos de células (SELL e COSTA, 2000). No entanto, os efeitos de lectinas mitogênicas como a jacalina sobre a proliferação das células da granulosa e maturação oocitária em caprinos ainda não é conhecido. Os efeitos de diferentes concentrações da lectina jacalina, bem como as interações destas proteínas com o FSH ainda não foram testados no cultivo *in situ* de fragmentos ovarianos caprinos, podendo resultar em efeitos benéficos sobre o desenvolvimento folicular desta espécie. Os sistemas de cultivo disponíveis não possibilitam o eficiente crescimento de folículos pré-antrais caprinos até os estágios de maturação, provavelmente devido à ausência de substâncias importantes, como por exemplo, a jacalina na composição dos meios de cultivo utilizados.

O conhecimento acerca da expressão de receptores, fatores de crescimento e hormônios envolvidos no processo de desenvolvimento folicular, bem como as interações destes, após estimulação pela jacalina e pelo FSH, durante a foliculogênese é extremamente importante para que possam ser desenvolvidas estratégias de cultivo que busquem aperfeiçoar a produção *in vitro* de embriões a partir de folículos pré-antrais. Portanto, a determinação da expressão de genes associados aos fatores e hormônios que atuam em cada fase da foliculogênese é de fundamental importância para a obtenção de meios de cultivo eficientes que atendam às reais necessidades dos folículos em cada uma das fases do seu desenvolvimento. Assim, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral. Desta forma, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral, e de proteínas e fatores necessários para a sobrevivência, a ativação e o início do crescimento folicular, assim os oócitos oriundos destes folículos estimulados por lectinas, poderão futuramente, ser destinados à produção *in vitro* de embriões e clonagem, contribuindo para a multiplicação de caprinos de alto valor zootécnico e/ou em vias de extinção, bem como para a implantação de bancos de germoplasma animal.

4 HIPÓTESES

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) A jacalina e o FSH mantêm a viabilidade folicular e influenciam positivamente a ativação de folículos primordiais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano cultivados *in vitro*.
- 2) A jacalina, associada ou não ao FSH, afeta positivamente a expressão de RNAs mensageiros para (BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 e PCNA) em folículos primordiais caprinos cultivados *in vitro*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de jacalina (0, 10, 25, 50 e 100 µg/ml), bem como da sua associação com o FSH, sobre o desenvolvimento de folículos primordiais caprinos inclusos em fragmentos ovarianos cultivados *in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos

Analisar o efeito da jacalina e do FSH, isolados ou em combinação, sobre o perfil de expressão de RNAs mensageiros para (BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 e PCNA) em folículos ovarianos caprinos cultivados *in vitro* por 6 dias.

6 ARTIGO 1

Efeito da jacalina e FSH na sobrevivência, ativação e expressão gênica *in vitro* de folículos primordiais caprinos

Effects of jacalin and follicle stimulating hormone on in vitro goat primordial follicle activation, survival and gene expression

Effects of jacalin and follicle stimulating hormone on *in vitro* goat primordial follicle activation, survival and gene expression

R. P. Ribeiro¹; A. M. L. R. Portela¹, A. W. B. Silva¹, J. J. N. Costa¹, J. R. S. Passos¹; E. V. Cunha¹; G. B. Souza¹; M. V. A. Saraiva¹; M. A. M. Donato², C. A. Peixoto²; Van den Hurk,
R³, J. R. V. Silva¹

¹Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brazil. ²Laboratory of Ultrastructure, CPqAM/Fiocruz, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil ³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, PO Box 80.163, Utrecht, The Netherlands.

Corresponding address (J.R.V. SILVA): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélío Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36132603 [jrsvilva@ufc.br]

Abstract

This study aims to investigate the effects of jacalin and follicle stimulating hormone (FSH) on survival and activation of primordial follicles and gene expression in cultured ovarian tissue. Ovarian tissues were cultured for 1 or 6 days in medium supplemented with different media in Jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 µg/mL – experiment 1). Non-cultured (control) and cultured ovarian fragments were processed for histological evaluation. After choosing the best concentration of jacalin (50 µg/mL), ovarian tissues were cultured for 6 days in medium supplemented with jacalin (50 µg/mL), FSH (50 ng/mL) or both. Non-cultured (control) and cultured ovarian fragments were processed for histological studies, or stored to evaluate the expression of BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 and PCNA by PCR in real time. The results showed that after 6 days of culture, the presence of jacalin or FSH were effective in maintaining the

percentage of normal follicles and in promoting primordial follicle activation. These substances had no significant effect on the levels of mRNA for BMP-15 and KL, but FSH promoted a significant increase in the levels of mRNA for PCNA and c-kit. On the other hand, the levels of mRNA for GDF-9 were reduced in tissues cultured in medium supplemented with jacalin. In conclusion, jacalin and FSH are able to improve goat primordial follicle activation and survival after 6 days of culture. Furthermore, presence of FSH increases the expression of mRNA for PCNA and c-kit, but jacalin resulted in lower GDF-9 mRNA expression.

Keywords: caprine, culture, ovarian fragments, preantral follicles, mRNA.

Introduction

Folliculogenesis is coordinated by various hormones and growth factors that are responsible for ensuring the success of follicular development (Bristol-Gould S, *et al.*, 2006), but the mechanisms that control primordial follicle activation are not yet completely elucidated. Knowledge of this event is essential to fully understand female gamete development. In this respect, considerable research has been done on the processes occurring during and factors involved in early folliculogenesis by *in vitro* culturing ovarian cortical tissue from different species [bovine (Wandji, *et al.*, 1996; Cushman, *et al.*, 2002); baboon: (Fortune, 1998); murine: (Oktay, *et al.*, 2000; Parrot and Skinner, *et al.*, 1999a) and human (Hovatta, *et al.*, 1997; Hreinsson, *et al.*, 2002)]. Follicular activation is characterized by transformation of the pre-granulosa cells from a flattened to a cuboidal shape, followed by their proliferation. Cuboidal granulosa cells from growing follicles express proliferating nuclear antigen (PCNA), which is a nuclear protein essential for follicular growth (Oktay *et al.*, 2000; El-Hefnawy, *et al.*, 2001; Wandji, *et al.*, 1996), and thus is considered to be a useful marker of proliferating granulosa cells [(human Oktay, *et al.*, 1998; Oktay, *et al.*, 2000), non-

human primates (Gougeon, *et al.*, 2000), bovine (Wandji, *et al.*, 1996; Fricke, *et al.*, 1997), ovine (Lund, *et al.*, 1999), and murine (Oktay, *et al.*, 1995)].

Several growth factors are involved in follicular survival, activation and proliferation of granulosa cells (Fortune, *et al.*, 2003). Studies on the expression patterns and biological functions of growth differentiation factor 9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) have demonstrated that they play a critical role in early follicular development (Dong, *et al.*, 1996; Findlay, *et al.*, 2002; Juengel, *et al.*, 2002; Knight and Glister, 2003; Lin *et al.*, 2003; McNatty, *et al.*, 2005a). Moreover, various studies have shown that the interaction between Kit ligand and its receptor c-kit is important for primordial follicle activation (Parrot and Skinner, 1999b; Celestino, *et al.*, 2010), oocyte growth and survival (Jin, *et al.*, 2005), and granulosa cell proliferation (Oktay, *et al.*, 1995). However, the results achieved until now, especially on primordial follicle activation, are limited and inconclusive. To improve our knowledge about the factors that control ovarian follicle development in caprine species and to explore possible physiologic activities, it is important to conduct studies with chemical substances other than hormones and growth factors. Lectins, for example, could play an important role in folliculogenesis. For, these compound have specific antigen binding to carbohydrates and are capable of interacting with several molecules of biological fluids and cell surface receptors, acting as decoders of information exchanged between molecules and cells (Misquith, *et al.*, 1994).

Jacalin is one of the two lectins present in jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. This lectin has specific residues of D-galactose and is characterized as a tetrameric molecule with a molecular mass of 39.5 kDa, consisting of α and β chains (Young, *et al.*, 1991). Jacalin has received considerable attention because of its interesting biological properties. More importantly, it was shown to possess a potent and selective mitogenic effect on distinct T- and B-cell functions (Bunn-Moreno and Campos Neto, 1981). Due to its ability to stimulate

subpopulations of T-cells, jacalin has been used as a mitogen factor to increase proliferation of various cell types *in vitro* (Saxon, 1987). Because of the ability of lectins to promote cell-cell and cell-matrix interactions, they may play a key role in proliferation, differentiation and cell migration (Stulnig *et al.*, 1993; Lis e Sharon, 1998). This is strengthened by the demonstrated binding of jacalin to the zona pellucida and the oolemma of ovarian follicles (Blackmore *et al.*, 2004; Movilla, *et al.*, 2004).

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

Material and Methods

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

Experiment 1: Effect of different concentration of jacalin on activation and survival of goat primordial follicles

Ovarian cortical tissues (n=12) were obtained from six cross-breed goats *Capra hircus* collected at a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds following two times in saline (0.9% NaCl) containing antibiotics (100IU/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin). The pairs of ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in saline (0.9% NaCl) containing antibiotics (100IU/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin) at 4°C (Chaves *et al.*, 2008).

The culture system used was described in detail earlier by *Silva, 2004b*. Ovarian cortical tissue from the same ovarian pair was cut in 18 slices (3mm x 3mm x 1mm) using a

scissor and scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either directly fixed for histological (uncultured control) or placed in culture for 1 or 6 days. Cortical tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 700 μ l of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10 μ g/ml insulin⁻¹, 5.5 μ g/ml transferrin⁻¹, and 5 ng/ml selenium⁻¹), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, antibiotics 100IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, 50 μ g/ml⁻¹ ascorbic acid, 3.0 mg/ml of bovine serum albumin (α -MEM⁺). The ovarian cortical fragments were cultured in control medium (MEM⁺) alone or supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50, or 100 μ g/ml). Every 2 days, the culture medium was replaced with fresh medium. After one and six days of culture period the pieces of ovarian tissue were fixed overnight at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for histological studies. After fixation, the ovarian fragments were dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, and embedded in paraffin wax. For each piece of ovarian cortex, 7 mm sections were mounted on slides and stained with eosin and hematoxylin. Coded anonymized slides were examined under a microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at x100 and x400 magnification by a single observer. The developmental stages of follicles were classified as primordial (one layer of flattened or flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). These follicles were further classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that are well organized in one or more layers, and have no pyknotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, that has a pyknotic nucleus and/or is surrounded by disorganized granulosa cells, which are detached from the basement membrane. Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment. The

percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in a particular medium.

The percentages of primordial and developing follicles, as well as of those classified as morphologically normal after 1 or 6 days of culture in medium supplemented with different concentration of jacalin were compared by Fisher's exact test (Graphpad Instat). The differences were considered significant when $P < 0.05$.

Experiment 2: Effects of jacalin and FSH on follicle growth, gene expression in cultured goat cortical tissue

Ovaries (n=16) from adult mixed-breed goats eight were collected as described in experiment 1. After fragmentation, for uncultured controls, some pieces of goat ovarian cortex were directly fixed for histological or stored at -80°C for extraction of total RNA. The remaining fragments were cultured *in vitro* for 6 days in 24-well culture dishes containing 700 μl of culture media. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin⁻¹, 5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin⁻¹, and 5 ng/ml selenium⁻¹), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, antibiotics 100IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁻¹ ascorbic acid, 3.0 mg/ml of bovine serum albumin (α -MEM⁺). Ovarian fragments were cultured at 39°C in 5% CO_2 in a humidified incubator in MEM⁺ alone or α -MEM⁺ supplemented with jacalin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH (50 ng/ml) or both. Every 2 days, the culture medium was replaced with fresh medium. To evaluate caprine follicular morphology after 6 days of culture, the ovarian fragments were fixed overnight at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for histological studies and evaluated as described in experiment 1.

To evaluate the effects of jacalin, FSH and their combination on mRNA expression for BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 and PCNA after culture, 6-day cultured fragments from each treatment were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA.

Total RNA extraction was performed using Trizol[®] purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 800 μ L of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 μ L RNase-free water. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, England) and 2 μ g of total RNA was used for reverse transcription. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled in ice. Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μ L, which was comprised of 10 μ L of sample RNA, 4 μ L 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNaseout, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 μ L cDNA as a template in 7.5 μ L of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5.5 μ L of ultra-pure water, and 0.5 μ M of each primer. The primers were designed by using the PrimerQuestSM program (<http://www.idtdna.com>) to perform amplification of BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 and PCNA housekeeping gene (Ubiquitin-C) UBC and β -actin (Table 1). This housekeeping gene has shown highest stability in caprine preantral follicles (Frota, *et al.*, 2011) and, thus, was used to normalize expression of target genes. The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis

of PCR products. The efficiency amplification for all genes was verified according to Pfaffl (2001). The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real time PCR Realplex (Eppendorf, Germany).

The percentages of morphologically normal follicles, as well as those of primordial and developing follicles after 6 days of culture were initially subjected to Fisher's exact test ($P < 0.05$). Levels of mRNA for BMP-15, KL, c-kit, GDF-9 and PCNA in cultured fragments were analysed by using the non-parametric Kruskal–Wallis test ($P < 0.05$). The delta-delta-Ct method was used to transform the Ct values into normalized relative expression levels (Livak e Schmittgen, 2001). The data were calculated from three independent replicates. Data were expressed as mean \pm sem.

Results

Experiment 1: Effect of different concentrations of jacalin on activation and survival of goat primordial follicles

Histological analysis showed the presence of degenerated (Fig.1a) and normal (Fig.1b) follicles in cultured ovarian cortical fragments. A total of 2.351 preantral follicles were analyzed. After 6 days, the percentage of normal follicles after culture of ovarian tissue in different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50, or 100 $\mu\text{g/ml}$) had decreased significantly when compared with uncultured control or with tissues cultured for 1 day in the same condition. Compared to ovarian tissue that was for 6 days cultured in $\alpha\text{-MEM}^+$, the percentage of normal follicles was significantly increased in this period, when 50 $\mu\text{g/mL}$ of jacalin was added of to this medium (Figure 2).

After 1 or 6 days, culture of ovarian fragments in the different media significantly reduced the percentage of primordial follicles (Figure 3) compared to that in fresh control tissue ($P<0.05$), but increased the percentage of developing follicles (Figure 4). Additionally, a progressive reduction of primordial follicles and increase of developing follicles ($P<0.05$) was observed with the increase of culture period from one to six days (Figures 3 and 4). Moreover, when compared to culture in α -MEM⁺, supplementation of 50 μ g/mL of jacalin to this medium even further reduced the percentage of primordial follicles and increased the percentage of developing follicles (Figure 3 and 4).

Experiment 2: Effects of jacalin and FSH on follicles growth, gene expression in cultured ovarian cortical tissue

In total, 1.282 preantral follicles were analyzed and after 6 days, culture of ovarian fragments in all tested media reduced the percentage of normal follicles, when compared to uncultured control (day 0) ($P<0.05$). After 6 days of culture, higher percentages of normal follicles were observed in ovarian tissue cultured in presence of FSH (50 ng/mL), Jacalin (50 μ g/mL) or both, when compared with control medium (α -MEM⁺), but no synergistic interaction between FSH and jacalin was observed (Figure 5).

After 6 days of culture, compared to the uncultured control group, a significant reduction ($P<0.05$) in the percentage of primordial follicles and increase of developing follicles was observed in all other tested media. When compared with tissue cultured in control medium (α -MEM⁺), a significant reduction ($P<0.05$) in the percentage of primordial follicles and increase of developing follicles was observed in tissues cultured in medium supplemented with FSH (50 ng/mL), jacalin (50 μ g/mL) or both, but no synergistic interaction was observed between FSH and jacalin (Figures 6 and 7).

Efficiency values obtained for qPCR amplification of the primers are presented in Table 2 and show that amplification efficiency was near the theoretical optimum level. Uncultured control tissue (day 0) and tissue cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or supplemented with FSH, jacalin or both had similar levels of mRNA for BMP-15 and KL (Figure 8A and B). In contrast, the presence of FSH in culture medium significantly increased the levels of mRNA for c-kit, when compared to tissues cultured with FSH and jacalin (Figure 8C). In addition, the presence of FSH increased the levels of mRNA for PCNA when compared with uncultured control ($P < 0.05$, Figure 8D). Unfortunately, when compared to control medium, the level of GDF-9 mRNA was significantly reduced in ovarian tissue cultured in medium containing jacalin, (Figure 8E).

DISCUSSION

The present study demonstrated the importance of jacalin and FSH on *in vitro* survival and follicular activation of caprine preantral follicles in a 6-day culture system. The percentage of primordial follicles was dramatically reduced, with a concomitant increase in the number of developing follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue. Supplementation of culture medium with 50 μ g/mL of jacalin or FSH caused further decrease of primordial follicles and increase of developing follicles, and contributed in maintaining follicle survival after 6 culture days. Since jacalin has the property to bind carbohydrates and to improve cell to cell adhesion (Sharma, *et al.*, 1997; Yagi, *et al.*, 1995), this lectin may have recognized and mediated adhesion between carbohydrates, that are present in granulosa cells and oocyte. The communication between granulosa cells during the preantral and early antral follicle stages is necessary to ensure survival and subsequent oocyte developmental competence. The interaction between oocytes and granulosa cells during follicular development is mutually beneficial, since the oocytes regulate granulosa cell functions and inhibit apoptosis in the

layers of cells immediately around the oocyte (Hussein, *et al.*, 2005). On the other hand, granulosa cells support oocyte competence (Albertini, *et al.*, 2001; Fatehi, *et al.*, 2005).

Apart from its favorable role in cellular adhesion, jacalin may have a mitogenic function on granulosa cells from activated primordial follicles, since lectins are considered to be mitogenic factors for different kinds of cells (Bunn Moreno e Campos Neto, 1981; Miranda-Santos, *et al.*, 1991; Misquith, *et al.*, 1994; Sell e Costa, 2002). It has been suggested that mitogenic lectins interact with components of cell membranes to stimulate cell proliferation (Sharon, 1986). Unfortunately, the exact mechanism of lectin-stimulated mitosis is unknown. Because this is the first study dealing with the effects of jacalin on the survival and growth of primordial follicles cultured *in vitro* follicles, our findings cannot be compared with those of other studies on follicular lectins.

The addition of FSH and jacalin was effective in promoting follicular viability and follicular activation, but there was no synergistic interaction between FSH and jacalin. The effect of FSH on follicular growth and survival *in vitro* is well described and many studies have emphasized the important role of FSH in maintaining viability (Matos, *et al.*, 2007a) and stimulation of *in vitro* follicle growth (Adriaens, *et al.*, 2004; Cecconi, *et al.*, 1999, Mao, *et al.*, 2002). It has been demonstrated that FSH receptors are expressed in follicles from the primary stage onward (Oktay, *et al.*, 1997; Médure, *et al.*, 2002), but the absence of FSH receptors at the primordial stage does not exclude the possibility that FSH has an indirect effect on very early follicle development via factors released by larger follicles or ovarian stromal cells (Silva, *et al.*, 2004b). The developing follicles may produce growth factors that act in a paracrine manner on surrounding primordial follicles. Among the local factors that may be involved in early folliculogenesis are fibroblast growth factor (FGF) (Almeida, *et al.*, 2012; Matos, *et al.*, 2007d), epidermal growth factor (EGF) (Silva, *et al.*, 2006; Silva, *et al.*,

2004b), BMP-15 (McNatty, 2005a; Otsuka, 2002), KL (Parrot and Skinner, 1999b; Celestino, *et al.*, 2010) and GDF-9 (Silva, 2004c; Dong, 1996; Juengel, 2002).

The presence of FSH in culture medium stimulated the expression of mRNA for PCNA in cultured ovarian tissue. PCNA performs the essential function of providing replicative polymerases with the high processivity required to duplicate an entire genome (Maga and Hubscher, 2003) and has been used as a marker of granulosa cell proliferation in various species [bovine: Wandji *et al.*, 1996; caprine: Silva *et al.*, 2004b; non-human primates: Wandji *et al.*, 1997; rodents: Muskhelishvili *et al.*, 2005; Oktay *et al.*, 1995]. Furthermore, the expression of PCNA by granulosa cells and oocyte is closely associated with the initiation of growth primordial follicle (Figueiredo *et al.*, 2006). Several authors have demonstrated that FSH promotes an increase in follicular diameter and proliferation of granulosa cells (rats: McGee *et al.*, 1997; mouse: Nayudu e Osborn, 1992; Cortvrindt *et al.*, 1996; 1998; bovine: Wandji *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 2000; caprine: Silva *et al.*, 2004b; ovine: Cecconi *et al.*, 1999; human: Roy and Treacy, 1993; Wright *et al.*, 1999). FSH-induced proliferation of granulosa cells is mediated by various paracrine factors (for review, see van den Hurk e Zhao, 2005).

Apart from PCNA mRNA expression, FSH also increased the expression of c-kit mRNA. The presence of jacalin, however, blocked this effect. Previous studies indicate that the KL/c-kit system is considered a key regulator of follicular growth, acting on the activation of primordial follicles and in its development (Yoshida *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2010). Lima *et al.*, (2011) quantified the expression of mRNA for c-kit and demonstrated a decrease in the levels of c-kit mRNA during the transition from the primary to the secondary follicle stage. Because lectins, as jacalin, are able to bind to glycoproteins (Roque-Barreira e Campos Neto, 1985), it is possible that binding of jacalin either to FSH or its receptors, which both are glycoproteins, did reduce the effects FSH during culture. FSH appeared able to control the

expression of GDF-9 (Wang *et al.*, 2006). The currently found jacalin-induced reduction of GDF-9 mRNA expression can also be due to a jacalin-evoked reduced ability of FSH to bind to its receptors.

In conclusion, jacalin and FSH are able to improve activation and survival of caprine primordial follicles within 6-days *in vitro* cultured ovarian cortical fragments. The presence of FSH increases the ovarian cortical tissue expression of mRNA for PCNA and c-kit, but jacalin blocks its effect on c-kit expression. Jacalin furthermore reduced the GDF-9 mRNA expression in cultured caprine ovarian cortical tissue. This study opens new perspectives to use jacalin as supplement in culture medium of preantral follicles.

Acknowledgments

This research was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, Grant number: 562686/2010-0).

References

- Adriaens I, Cortvrindt R, Smits J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reproduction* 2004; 19:398-408.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121:647–653.
- Almeida AP, Saraiva MVA, Alves Filho JG, Silva GM, Gonçalves RFB, Brito IR, Silva AWB, Lima AKF, Cunha RMS, Silva JRV, Figueiredo JR. Gene Expression and immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the ovary and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Reproduction in Domestic Animals* 2012; 47: 20–25.
- Blackmore DG, Baillie LR, Holt JE, Dierkx L, Aitken RJ, Mclaughlin EA. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 661–668.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006; 66:5-13.

Bunn-Moreno, MM; Campos-Neto, A. Lectin(s) extracted from seeds *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. *The Journal of Immunology* 1981; 127:427-429.

Cecconi S, Barboni B, Coccia M., Mattioli M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 594– 601.

Celestino JJH, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos, MHT, Saraiva MVA, Chaves RN, Martins FS, Almeida AP, Cunha RMS, Lima LF, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Bao SN, Figueiredo JR. 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* 2010; 77: 231-240.

Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Lima-Verde IB, Matos MHT, Bão SN, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* 2008; 20:640–647.

Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Human Reproduction* 1996; 11: 2656-2666.

Cortvrindt RH, Smitz, JY. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Human Reproduction* 1998; 13: 1292–1302.

Cushman RA, Wahl CM, Fortune JE. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Human Reproduction* 2002; 174:48–54.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531-535.

El-Hefnawy T, Zeleznik AJ .Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin D2 expression in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2001; 142:4357–4362.

Fatehi AN, Van Den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, Van Tol HT, Monteiro R M, Roelen BA, Bevers MM . Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology* 2005; 63:872–889.

Figueiredo JR, Rodrigues APR, Santos RR; Lopes C, Silva JRV. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34: 71-84.

Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 191:35-43.

Fortune JE, Kito S, Wandji AS, Srsen V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology* 1998; 49:441–9.

Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 2003; 78: 135-163.

Fricke PM, Al-Hassan MJ, Roberts AJ, Reynolds LP, Redmer DA, Ford JJ. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Domestic Animal Endocrinology* 1997; 14:171–80.

Frota IMA, Leitão CCF, Costa, JJN, R. van den Hurk, Brito, IR, Saraiva MVA, Figueiredo JR, Silva JRV. Effects of BMP-7 and FSH on the development of goat preantral follicles and levels of mRNA for FSH-R, BMP-7 and BMP receptors after culture. *Animal Reproduction* 2011; 8:25-31.

Gougeon A, Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000; 163:33–41.

Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RML. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction* 1997; 12:1032–6.

Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh ALW, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87:316–21.

Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science* 2005; 118:5257–5268.

Jin X, Han CS, Yu FQ, Wei P, Hu ZY, Liu YX. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Molecular Reproduction and Development* 2005; 70: 82–90.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O’Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, 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* 2002; 67: 1777–1789.

Knight PG, Glister C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science* 2003; 78:165-183.

Lima IMT, Brito IR, Rodrigues GQ, Silva CMG, Magalhães-Padilha D, Lima LF, Celestino JJH, Faustino LR, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Presence of c-kit mRNA in goat ovaries and improvement of *in vitro* preantral follicle survival and development with kit ligand. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 345: 38-47.

Lima IMT, Celestino JH, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Role of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Kit Ligand (KL) in the regulation of folliculogenesis in mammalian. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2010; 34:3-20.

Lin SY, Morrison JR, Phillips DJ, de Kretser DM. Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. *Reproduction* 2003; 126:133-148.

Lis H, Sharon N. Biological properties of lectins. In: The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. *Academic Press* 1986; 265-285.

Lis H., Sharon N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 1998; 98: 637-674.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25:402-8.

Lund SA, Murdoch J, Van Kirk EA, Murdoch WJ. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biology of Reproduction* 1999; 61:388-92.

Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 3051-3060.

Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 1197-1203.

Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia-Jr, JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão, SN, Lucci, CM, Figueiredo, JR. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote* 2007a; 15:173-182.

Matos, MHT, Van Den Hurk, R, Lima-Verde IB, Luque MCA, Santos KDB, Martins, FS, Bão SN, Lucci, C. M.; Figueiredo, J. R. Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on the *in vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. *Cells Tissues Organs* 2007d; 18:112-120.

McGee E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1997; 138: 2417-2424.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome N. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005a; 129:473-480.

Méduri G., Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Migrom E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 2266-2276.

Miranda-Santos IKF, Delgado M., Bonini PV, Bunn-Moreno MM, Campos-Neto A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. *Immunol. Lett* 1991; 31:65-72.

Misquith SP, Rani G, Surolia A. Carbohydrate Binding Specificity of the B-cell Maturation Mitogen from *Artocarpus integrifolia* Seeds. *The Journal of Biologicchemists* 1994; 269: 30393-30401.

Movilla MJ, Aviles M, Gómez-Torres MJ, Fernandez-Colom PJ, Castells MT, Juan J, Romeu A, Ballestal J. Carbohydrate analysis of the zona pellucid and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Human Reproduction* 2004; 19: 1842–1855.

Muskhelishvili L, Wingard SK, Latendresse JR. Proliferating cell nuclear antigen a marker for ovarian follicle counts. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 365–368.

Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992; 95: 349–362.

Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 3748– 3751.

Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M. Interaction of extracellular matrix and activin A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction* 2000; 63:457–61.

Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction* 1998; 13; 1133–1138.

Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 295–301.

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. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 8060-8065.

Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999a; 40: 262-271.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29:2002-2007.

Roque-Barreira MC, Campos-Neto, A. Jacalin: an IgA-binding lectin. *The Journal of Immunology* 1985; 134:1740-1743.

Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility* 1993; 59:783-791.

Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 2000; 2, 27–39.

Saxon A, Tsui F, Martinez-Maza O. Jacalin, an IgA-binding lectin, inhibits differentiation of human B cells by both a direct effect and by activating T-supressor cells. *Cellular Immunology* 1987;104:134-141.

Sell AM, Costa CP. Efeito inflamatório local induzido pelas lectinas PHA, WGA e jacalina. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* 2002; 6: 47-51.

Sharma V, Surolia A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *Journal of Molecular Biology* 1997; 267: 433–45.

Silva JRV, Van den Hurk R, Figueiredo JR. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote* 2006; 14: 107- 117.

Silva JRV, Van den Hurk R, Matos MHT, Santos RR, Pessoa C, Moraes MO, Figueiredo JR. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 2004b; 61:1691-1704.

Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Molecular Reproduction and Development* 2004c; 70:11-19.

Stulnig T, Schuweiger M, Hirsch-Kauffmann, M. Duchenne muscular dystrophy: lack of differences in the expression of endogenous carbohydrate-and heparin- binding proteins (lectins) in culture fibroblast. *European Journal of Cell Biology* 1993; 62:173-181.

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

Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig, JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Human Reproduction* 1997; 12:1993–2001.

Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction* 1996; 55:942–8.

Wang C, Roy SK. Expression of Growth Differentiation Factor 9 in the Oocytes Is Essential for the Development of Primordial Follicles in the Hamster Ovary. *Endocrinology* 2006; 147:1725–1734.

Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston, RML, Franks S, Hardy K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction* 1999; 14:1555-1562.

Yagi M., Campos-Neto, A., Gollahon K. Morphological and Biochemical changes in a hematopoietic cell line induced by jacalin, a lectin derived from *Artocarpus integrifolia*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1995; 209; 263-270.

Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 1997; 184: 122-137.

Young NM, Johnston RAZ, Watson DC. The aminoacid sequences of jacalin and the *Madura pomira* agglutinin. *Federation of European Biochemical Societies* 1991; 282:382-384.

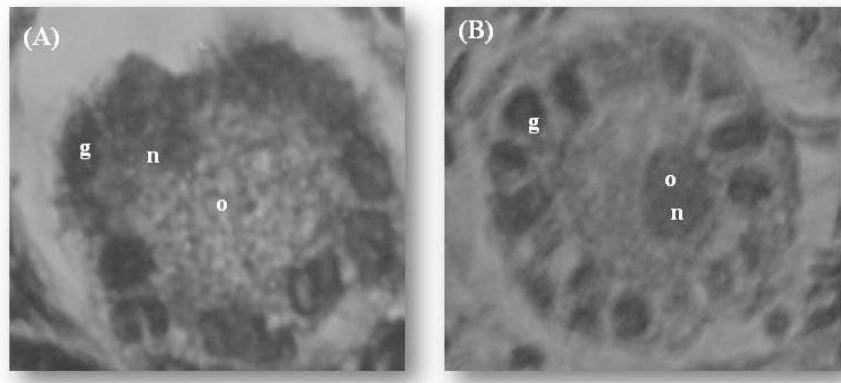


Figure 1. Histological section of non-cultured tissue after staining with hematoxylin and eosin (H&E), showing a degenerated primary follicle (a) and a normal primary follicle (b). O, oocyte; n, nucleus; G, granulosa cells. (Original magnification $\times 400$).

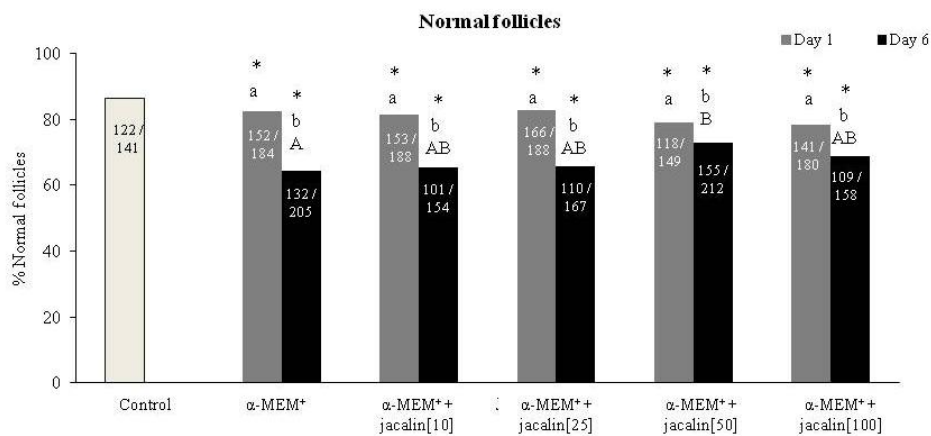


Figure 2. Percentage of morphologically normal follicles in uncultured control tissue and after culture for 1 or 6 days in α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). *Differs significantly from fresh control; A, B- differences between treatments after 6 days; a,b - Difference between days of cultured ($P < 0.05$).

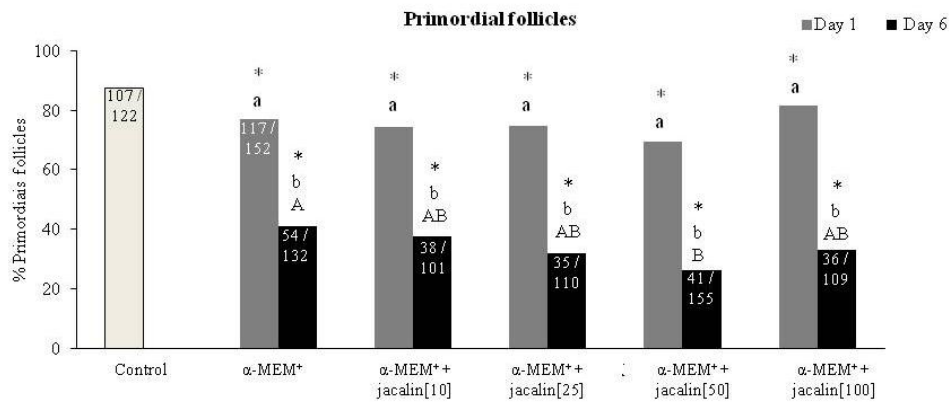


Figure 3. Percentage of primordial follicles in uncultured control tissue and after culture for 1 or 6 days in α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL). *Differs significantly from fresh control; A, B - differences between treatments after 6 days; a,b - Difference between days of cultured ($P < 0.05$).

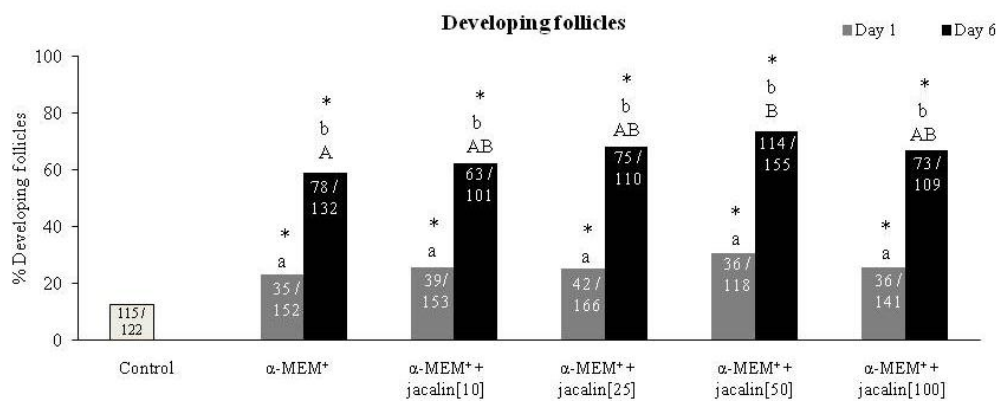


Figure 4. Percentage of development follicles in uncultured control tissue and after culture for 1 or 6 days in α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of jacalin (0, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL). *Differs significantly from fresh control; A, B - differences between treatments after 6 days; a,b - Difference between days of cultured ($P < 0.05$).

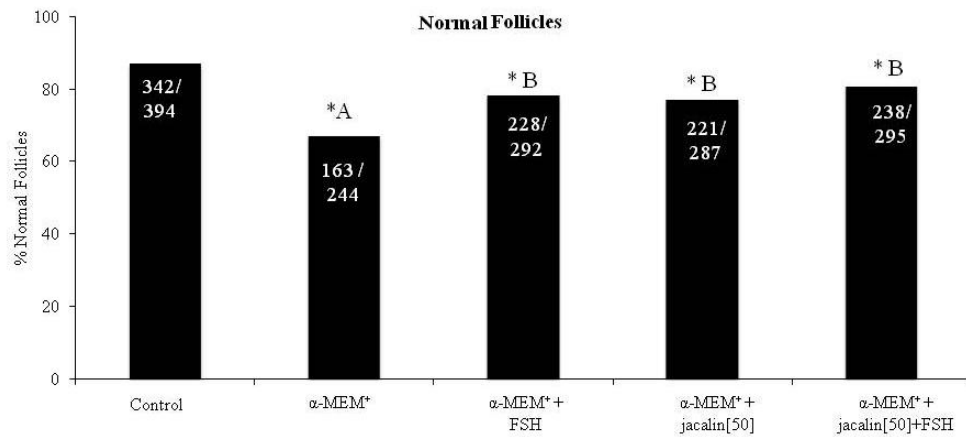


Figure 5. Percentage of morphologically normal follicles in uncultured control tissue (day 0), and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both. *Differs significantly from fresh control follicles. A, B - differences between treatments after 6 days ($P < 0.05$).

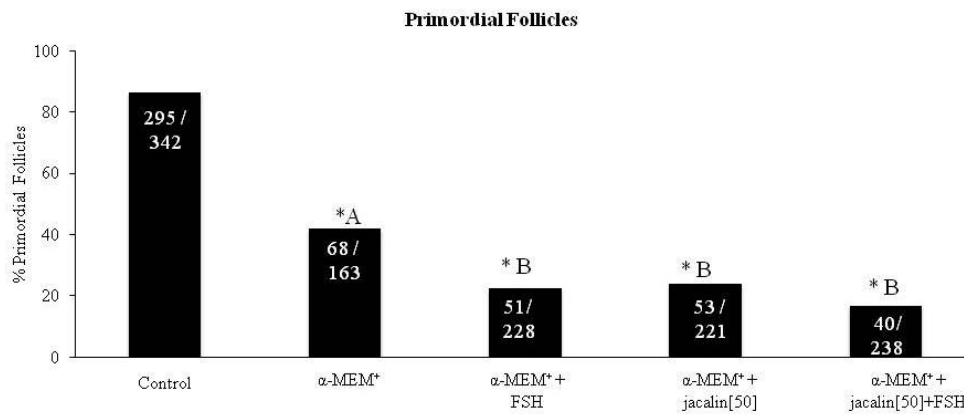


Figure 6. Percentage of primordial follicles in uncultured control tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both. *Differs significantly from fresh control follicles. A, B - differences between treatments after 6 days ($P < 0.05$).

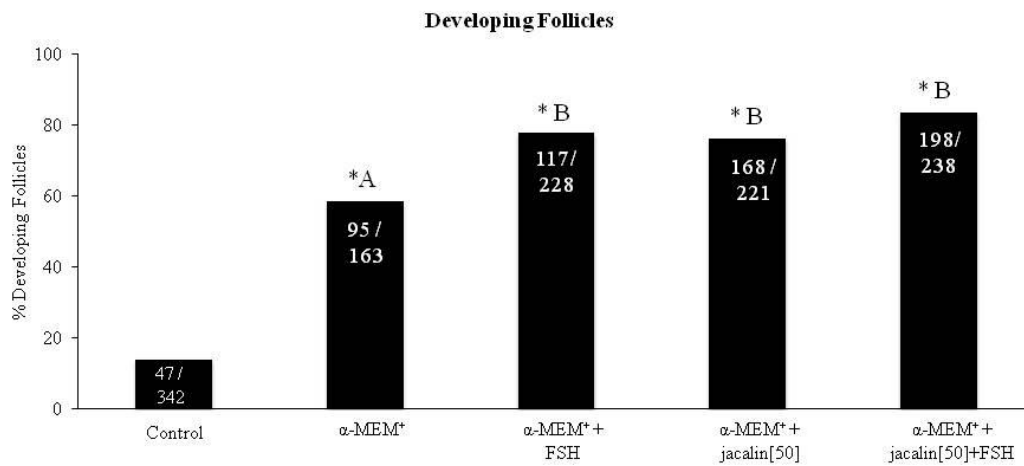
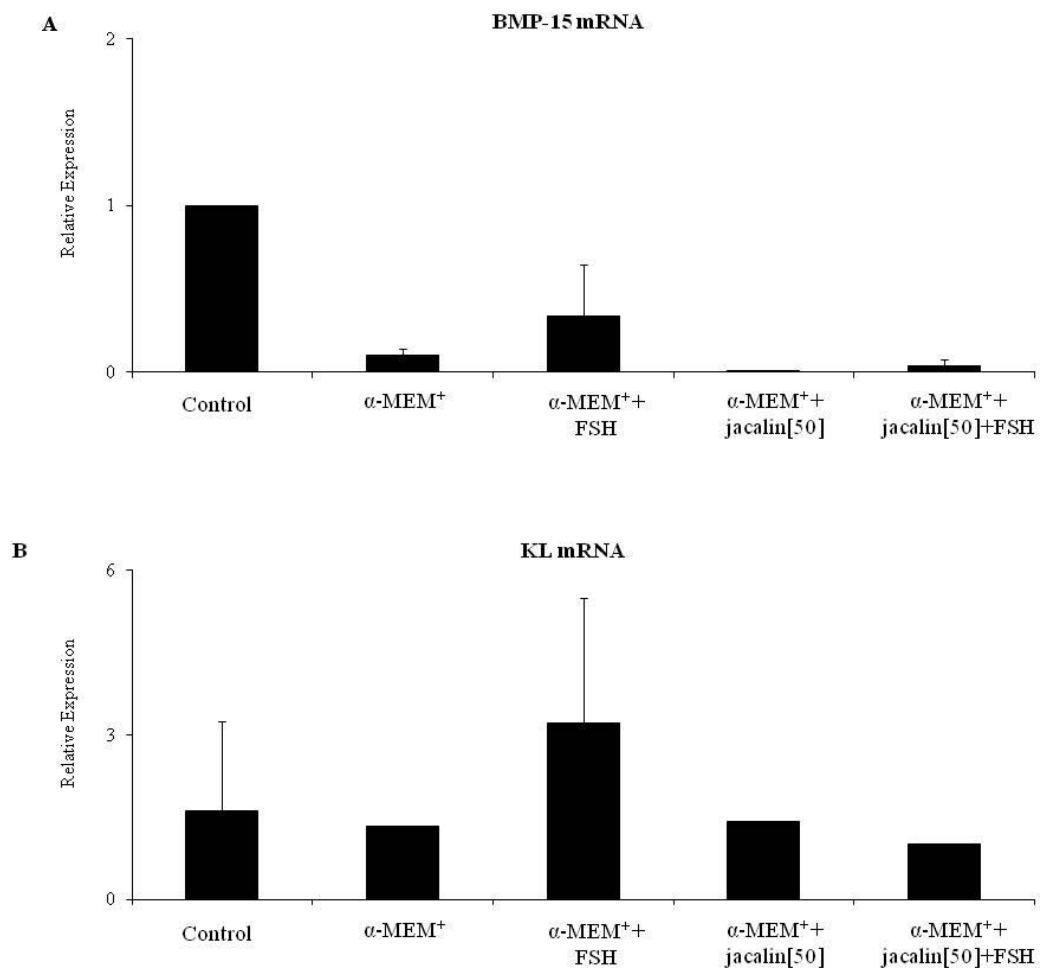


Figure 7. Percentage of developing follicles in uncultured control tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both. *Differs significantly from fresh control follicles. A, B - differences between treatments after 6 days ($P < 0.05$).



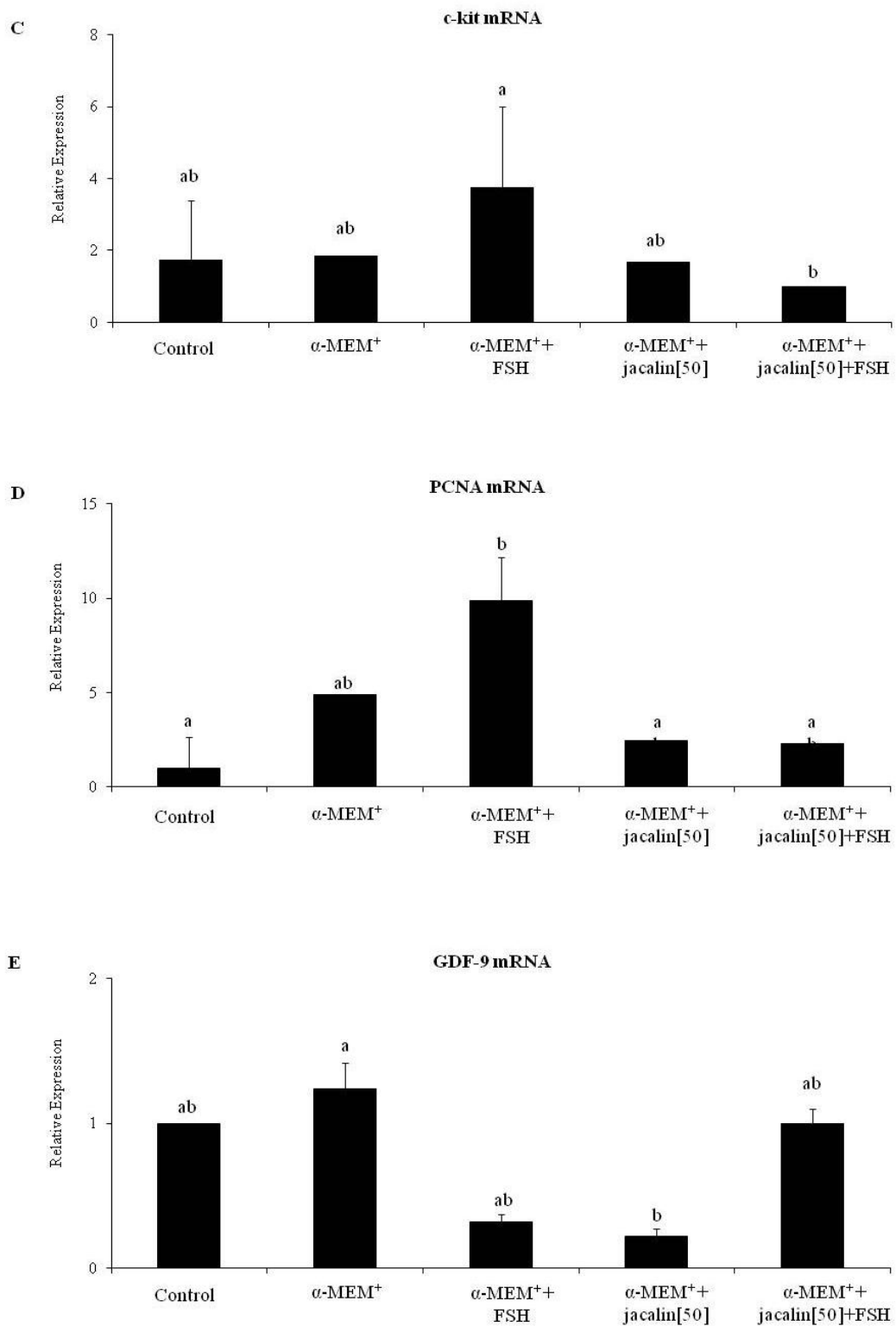


Figure 8. Levels of mRNA expression for in BMP-15 (A), KL (B), c-kit (C), PCNA (D) and GDF-9 (E) in uncultured control tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in medium containing FSH, jacalin or both.

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

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

Table 2. Efficiency of primers used in real-time PCR.

Target gene	efficiency of primer
UBQ	1.02
β -Actin	1.08
BMP-15	1.00
KL	1.04
c-kit	1.01
GDF-9	1.02
PCNA	1.02

7 CONCLUSÕES GERAIS

- A jacalina na concentração de 50 µg/mL foi a mais efetiva na promoção da ativação folicular, desenvolvimento e manutenção da viabilidade folicular durante o cultivo *in situ* por 6 dias.
- O cultivo *in situ* com 50 µg/mL de jacalina sozinha ou associada ao FSH promoveram ativação folicular, no entanto, não houve um sinergismo entre as duas substâncias.
- A presença de FSH aumentou a expressão do RNAm para PCNA e c-kit, enquanto que a presença da jacalina reduziu a expressão do GDF-9.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho poderão ser utilizados para aperfeiçoar a elaboração de meios de cultivo dinâmicos capazes de propiciar ótimas condições para manter a sobrevivência folicular, bem como a ativação de folículos primordiais durante o cultivo *in vitro*. Considerando que a jacalina tem um grande potencial biotecnológico, este estudo abre novas perspectivas para avaliar o efeito desta lectina em diferentes fases do desenvolvimento folicular *in vitro*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, v. 117, p. 421-426, 2004.

ACKERT, C. L.; GITTENS, J. E.; O'BRIEN, M. J.; EPIG, J. J.; KIDDER, G. M. Intracellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v. 233, p. 258-279, 2001.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82/83, p. 127-140, 2004.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R. Dinâmica folicular em bovinos: visão geral da história e atualização. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 377-396, 2008.

ADHIKARI, D.; FLOHR, G.; GORRE, N.; SHEN, Y.; YANG, H.; LUNDIN, E.; LAN, Z.; GAMBELLO, M. J.; LIU, K. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 765-770, 2009.

ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HÄMÄLÄINEN, T.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI I., LAN Z. J.; LIU K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 397-410, 2010.

ADRIAENS, I.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. **Human Reproduction**, v. 19, p. 398-408, 2004.

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

ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A. ALVES, FILHO. J. G.; SILVA, G. M.; GONÇALVES, R. F. B.; BRITO, I. R.; SILVA, A. W. B.; LIMA, A. K. F.; CUNHA, R. M. S.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Gene Expression and immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the ovary and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 20–25, 2012.

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

ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; DE OLIVEIRA, J. A.; FREDERICO RODRIGUES LOUREIRO BRACARENSE, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 64, p. 1104– 1113, 2005.

ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MAGALHÃES, D. M.; SILVA, G. M.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, p. 305-310, 2010.

ARDEN, K. C.; BIGGS, W. H. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 403, p. 292–298, 2002.

AVILES, M.; EL-MESTRAH, M.; JABER, L.; CASTELLS, M. T.; BALLESTA, J. K. Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona pellucida during folliculogenesis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 113, p. 207-219, 2000.

AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri: Manole, 2004, 531p.

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

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

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 401-409, 2001.

BAR-SHIRA MAYMON B, MAYMON R, BEN-NUN I, GHETLER Y, SHALGI R, AND SKUTELSKY E. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, 102: 81-86, 1994.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.

BLACKMORE, D. G.; BAILLIE, L. R.; HOLT, J. E.; DIERKX, L.; AITKEN, R. J.; MCLAUGHLIN, E. A. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 661-668, 2004.

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

BRITT, K. L.; FINDLAY, J. K. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 202, p. 11-17, 2003.

BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M. J.; LIN, M. Z.; JUO, P.; HU, L.S.; ANDERSON, M. J.; ARDEN, K. C.; BLENIS, J.; GREENBERG, M. E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, p.857-868, 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. 414-21, 2010.

BUNN-MORENO, M. M.; CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **The Journal of Immunology**, v. 127, p. 427-429, 1981.

CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; RIVERO, A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. **Theriogenology**, v. 52, p. 399-411, 1999.

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

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. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BAO, 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.; CHAVES, R. N.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; MAIA-JÚNIOR, J. E.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Mechanisms of atresia in ovarian follicles. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 4, p. 495-508, 2009.

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

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

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

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

COSSIGNY, D. A.; FINDLAY, J. K.; A. DRUMMOND. The effects of FSH and activin A on follicle development *in vitro*. **Reproduction**, v. 143, p. 221-229, DOI: 10.1530/REP-11-0105, 2012.

CUNHA, E. V.; COSTA, J. J. N.; ROSSI, R. O. D. S.; SILVA, A. W. B.; PASSOS, J. R. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PEREIRA, D. C. S. T.; DONATO, M. A. M.; CAMPELLO, C. C.; SARAIVA, M. V. A.; PEIXOTOS, C. A.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. P. Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of *in vitro*-cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.46, p. 245-252, 2013.

CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. **Human Reproduction**, v. 174, p. 48–54, 2002.

DEEPAK, A.; KUI, L. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 438–464, 2009.

DIEGO, H. C.; LILI, M.; RAMYA, K.; JAMES, W. H.; RONALD, A. P. Suppression of ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. **Science**, v. 300, p. 215-218, 2003.

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

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

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

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, 4, p. 495-516, 2007.

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

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 4, p. 233-254, 1986.

ERIKSEN, G. V., CARLSTEDT, I., MORGELIN, M., ULDBJERG, N., ALMSTROM, A. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid. **Biochemical Journal**, v. 340, p. 613–620, 1999.

FARBER, J. L. Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Laboratory Investigation**, v. 47, p. 114-123, 1982.

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

FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D.; RODRIGUES, A. P. R.; de BEM, A. R. *In vitro* development of isolated bovine preantral follicles. **Arquivo Faculdade UFRGS**, v. 25, p. 93-107, 1997.

- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2^aed. São Paulo: Roca, p. 303-327. 2008.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SANTOS, R. R.; LOPES, C.; SILVA, J. R. V. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, p. 71-84, 2006.
- FINDLAY, J. K.; DRUMMOND, A. E.; DYSON, M. L.; BAILLIE, A. J.; ROBERTSON, D. M.; ETHIER, J. F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 35-43, 2002.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.
- FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, A. S.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. **Theriogenology**, v. 49, p. 441-449, 1998.
- 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.
- FRICKE, P. M.; AL-HASSAN, M. J.; ROBERTS, A. J.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A.; FORD, J. J. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 171-180, 1997.
- FROTA, I. M. A.; LEITÃO, C. C. F.; COSTA, J. J. N. R.; VAN DEN HURK, BRITO, I. R.; SARAIVA, M. V. A. FIGUEIREDO JR, SILVA JR V. Effects of BMP-7 and FSH on the development of goat preantral follicles and levels of mRNA for FSH-R, BMP-7 and BMP receptors after culture. **Animal Reproduction**, v. 8, p. 25-31, 2011.
- GINTHER, O. J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, v. 42, p. 987-1001, 1994.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; MARTINS, S.; WILTBANK, M. C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves in the last six months of pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 271-279, 1996a.
- GONÇALVES, R. F.; WOLINETZ, C. G.; BARNABE, V. H.; KILLIAN, G. J. Influence of Osteopontin in Bovine Uterine Tube Fluid on Sperm Binding and Fertilization in RCA-1 Lectin-treated Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 152-155, 2009; doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01011.x
- 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.

GOUGEON, A.; DELANGLE, A.; AROUCHE, N.; STRIDSBERG, M.; GOTTELAND, J. P.; LOUMAYE, E. Kit ligand and the somatostatin receptor antagonist, BIM-23627, stimulate *in vitro* resting follicle growth in the neonatal mouse ovary. **Endocrinology**, v. 151, p. 1299–1309, 2010.

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.

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

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

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

HONDA, A.; HIROSE, M.; HARA, K.; MATOBA, S.; INOUE, K.; MIKI, H.; HIURA, H.; KANATSU-SHINOHARA, M.; KANAI, Y.; KONO, T.; SHINOHARA, T.; HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R. M. L. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1032–1036, 1997.

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

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining amorphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 5257–5268, 2005.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. KIT/KIT Ligand in Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis: Roles in Rabbit and Murine Ovarian Follicle Activation and Oocyte Growth. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 421 – 433, 2006.

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

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 277–288, 2002.

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.

JAYAPRAKASAN, K.; WALKER, K. F.; CLEWES, J. S.; JOHNSON, I. R.; RAINE-FENNING, N. J. The inter observer reliability of off-line antral follicle counts made from stored three-dimensional ultrasound data: a comparative study of different measurement techniques. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 29, p. 335 – 341, 2007b.

JEYAPRAKASH, A. A.; JAYASHREE, G.; MAHANTA, S. K.; SWAMINATHAN, C. P. K.; SEKAR, A. S.; M. VIJAYAN. Structural Basis for the Energetics of Jacalin–Sugar Interactions: Promiscuity Versus Specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, p. 181–188, 2005.

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

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a PI3K dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, v. 32, p. 197-204, 2008.

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.

JUNEJA, S. C.; BARR, K. J.; ENDERS, G. C.; KIDDER, G. M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking Cx43. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1263-1270, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 10^a ed., **Histologia Básica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 432-452, 2004.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Recent achievements *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. **Reproductive Biology**, v. 6, p. 3-16, 2006.

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.

LENZ, R. W.; AX, R. L.; GRIMEK, H. J.; FIRST, N. L.; Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances the acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 106, p. 1092- 1089, 1982.

LIMA, I. M. T.; CELESTINO, J. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Role of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Kit Ligand (KL) in the regulation of folliculogenesis in mammalian. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34 p. 3-20, 2010.

LIMA, I. M. T.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; MAGALHAES-PADILHA, D.; 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**, v. 345, n. 1-2, p. 38-47, 2011.

LIMA, I. M. T.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; MAGALHÃES-PADILHA, D.; LIMA, L. F.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Presence of c-kit mRNA in goat ovaries and improvement of *in vitro* preantral follicle survival and development with kit ligand. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 345, p. 38-47, 2011.

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. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v.19, p.240-247, 2010.

LIN, S.Y.; MORRISON, J. R.; PHILLIPS, D. J.; DE KRETZER, D. M. Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. **Reproduction**, v. 126, p. 133–148, 2003.

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

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

LIU L, RAJAREDDY, S.; REDDY, P.; JAGARLAMUDI, D. K, SHEN, Y.; GUNNARSSON, D.; SELSTAM, G.; BOMAN, K.; LIU, K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. **Development**, v.134, p.199–209, 2007.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Developmental Biology**, v.134, p.199–209, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25:402–8.

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

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.

LUND, S. A.; MURDOCH, J.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 388–392, 1999.

MAGA, G.; HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3051–3060, 2003.

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. Different follicle-stimulating hormone (FSH) sources influence preantral follicle viability and development *in vitro*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 378–386, 2009b.

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. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v. 33, p. 91–97, 2009a.

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 thecainterstitial cells. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 766–775, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; SANTOS, K. D. B.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on the *in vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. **Cells Tissues Organs**, v, 18, p. 112–120, 2007d.

MAYMON, B. B.; MAYMON, R.; BEN-NUN, I.; GHETLER, Y.; SHALGI, R.; SKUTELSKY, E. Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 81-86, 1994.

McARTHUR, M. E.; IRVING-RODGERS, H. F.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Identification and immune localization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 913-924, 2000.

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

McGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S. Y.; CHUN, S. Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A. J. W. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 138, p. 2417-2424, 1997.

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

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. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. **Reproduction**, v. 129, p. 473-480, 2005a.

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 and Metabolism**, v. 87, p. 2266-2276, 2002.

MIRANDA-SANTOS, I. K. F.; DELGADO, M.; BONINI, P. V.; BUNN-MORENO, M. M.; CAMPOS-NETO, A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. **Immunology Letters**, v. 31, p. 65-72, 1991.

- MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. Carbohydrate Binding Specificity of the B-cell Maturation Mitogen from *Artocarpus integrifolia* Seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 30393-30401, 1994.
- MOVILLA, M. J.; AVILES, M.; GOMEZ-TORRES, M. J.; FERNANDEZ-COLOM, P. J.; CASTELLS, M. T.; JUAN, J.; ROMEU, A.; BALLESTAL, J. Carbohydrate analysis of the zona pellucid and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. **Human Reproduction**, v. 19, p. 1842–1855, 2004.
- MUSKHELISHVILI, L.; WINGARD, S. K.; LATENDRESSE, J. R. Proliferating cell nuclear antigen a marker for ovarian follicle counts. **Toxicologic Pathology**, v. 33, p. 365–368, 2005.
- NAYUDU, P. L.; OSBORN, S. M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v 95, p. 349–362, 1992.
- NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1265-1272, 2003.
- NILSSON, E.; KEZEL, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, p. 65-73, 2002.
- NILSSON, E.; PARROT, J. A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.
- NIXON, B.; JONATHAN, W. P.; SPILLER, C. M.; ATTWELL-HEAP, A. G.; ASHMAN, L. K.; JOHN, R. A. Evidence for the involvement of PECAM-1 in a receptor mediated signal-transduction pathway regulating capacitation-associated tyrosine phosphorylation in human spermatozoa. **Journal of Cell Science**, v.118, p. 4865-4877, 2005.
- NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.
- O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1682-1686, 2003.
- OGURA, A. Isolation, characterization and *in vitro* and *in vivo* differentiation of putative thecal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America**, v. 104, p. 12389-12394, 2007.
- OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p. 3748–3751, 1997.

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

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G.; AKMAN, O.; OJAKIAN, G. K.; OKTAY, M. Interaction of extracellular matrix and activin A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 457–61, 2000.

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

OKTAY, K.; SCHENKEN, R. S.; NELSON, J. F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 295–301, 1995.

OTALA, M.; ERKKILÄ, K.; TUURI, T.; SJÖBERG, J.; SOUMALAINEN, L.; SUIKKARI, A. M.; PENTIKÄINEN, V.; DUNKEL, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. **Molecular Human Reproductive**, v. 8, p. 228-236, 2002.

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. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 8060-8065, 2002.

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 of Biological Chemistry**, v. 275, p. 39523–39528, 2000.

PARILLO, F.; DALL'AGLIO, A. C.; CECCARELLI, V. P.; GARGIULO, A.M. Immunogold study on lectin binding in the porcine zona pellucid and granulosa cells. **European Journal of Histochemistry**, v. 185, p.109-115, 2003.

PARK, C.; CHA, K.; KIM, K.; LEE, K. Expression of cell cycle regulatory genes during primordial-primary follicle transition in the mouse ovary. **Fertility and Sterility**, v. 83, p. 410-418, 2005.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 140, p. 4262–4671, 1999a.

PAULA, N. R. O.; CARDOSO J. F. S.; OLIVEIRA M. A. L.; FREITAS V. J. F. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 21-35, 2008.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Developmental Biology**, v. 234, p. 339-351, 2001.

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PHOOPHITPHONG, D.; WANGNAITHAM, S.; SRISUWATANASAGUL S.; TUMMARUK, P. The use of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immuno-staining technique to determine number and type of follicles in the gilt ovary. **Livestock Science**, v. 150, p. 425–431, 2012.

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

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

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

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

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

REDDY, P.; SHEN, L.; REN, C.; BOMAN, K.; LUNDIN, E.; OTTANDER, U.; LINDGREN, P.; LIU, Y. X.; SUN, Q. Y.; LIU, K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, v. 281, p. 160-70, 2005.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, p. 96-103, 2010.

REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; DRIANCOURT, M. A. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 483–494, 2000.

ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAMPOS-NETO, A. jacalin: an IgA-binding lectin. **The Journal of Immunology**, v. 134, p. 1740-1743, 1985.

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

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 271-287, 2003.

RUSSELL, D. L.; DOYLE, K. H.; OCHSNER, S. A. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 42330–42339, 2003a.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 2, p. 27–39, 2000.

SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 205-214, 2010b.

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, 2008b.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, p. 1098-1101, 2005.
SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SAXON, A.; TSUI, F.; MARTINEZ-MAZA, O. Jacalin, an IgA-binding lectin, inhibits differentiation of human B cells by both a direct effect and by activating T-suppressor cells. **Cellular Immunology**, v. 104, p. 134-141, 1987.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 297-303, 2000.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Efeito inflamatório local induzido pelas lectinas PHA, WGA e jacalina. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 6, p. 47-51, 2002.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Effects of Plant Lectins on *in vitro* Fibroblast Proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 349-354, 2003.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, p. 433–45, 1997.

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

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

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. **Zygote**, v. 14, p. 107-117, 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 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in the ovaries of goats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 11-19, 2004c.

SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D. A.; LI, E.; PAUL, D. L. Female infertility in mice lacking connexin37. **Nature**, v. 385, p. 525-529, 1997.

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. Fig α , a germa cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Development**, v. 127, p. 4645-4655, 2000.

STABENFELDT, H. G.; EDQVIST, E. L. Processos reprodutivos na fêmea. In: Swenson, j.m.; Reece, o.w. **Fisiologia dos animais domésticos** 11^a ed., Rio de Janeiro, p. 615-616, 1996.

STULNIG, T.; SCHUWEIGER, M.; HIRSCH-KAUFFMANN, M. Duchenne muscular dystrophy: lack of differences in the expression of endogenous carbohydrate- and heparin-binding proteins (lectins) in culture fibroblast. **European Journal of Cell Biology**, v. 62, p. 173-181, 1993.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575-692, 1998.

Van den HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

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

- Van den HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- van WEZEL, I. L., RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine follicles and their environment *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.
- WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, 1996.
- WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 807-813, 1992.
- 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 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.
- WANG, C.; ROY, S. K. Expression of growth differentiation factor 9 in the oocytes is essential for the development of primordial follicles in the hamster ovary. **Endocrinology**, v. 147, p. 1725-1734, 2006.
- WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 577-585, 2004.
- WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In, **The Physiology of Reproduction** (Knobil, E. and Neill, J.D., eds), p. 79-122, Raven Press, 1994.
- WEBB, R. B.; NICHOLAS, J. G.; GONG, B. K.; CAMPBELL, C. G.; GUTIERREZ, H. A.; GARVERICK, D. G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Supplement**, v. 61, p. 71-90, 2003.
- WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in vitro* growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1555-1562, 1999.

WU, G.; CUI, H.R.; SHU, Q.; XIA, Y.W.; XIANG, Y.B.; GAO, M.W.; CHENG, X. and ALTOSAAR, I. Stripped stem borer (*Chilo suppressalis*) resistant transgenic rice with a *cryIAb* gene from *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) and its rapid screening. **Journal of Zhejiang University**, v. 19, p. 15-18, 2000.

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

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

YAGI, M.; CAMPOS-NETO, A.; GOLLAHON, K. Morphological and Biochemical changes in a hematopoietic cell line induced by jacalin, a lectin derived from *Artocarpus integrifolia*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 209, p. 263-270, 1995.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. I. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Developmental Biology**, v. 184, p. 122-137, 1997.

YOUNG, N. M.; JOHNSTON, R. A. Z.; WATSON, D. C. The aminoacid sequences of jacalin and the *Madura pomira* agglutinin. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 282, p. 382-384, 1991.

ZHANG, P.; CHAO, H.; SUN, X.; LI, L.; SHI, Q.; SHEN, W. Murine folliculogenesis *in vitro* is stage-specifically regulated by insulin via the Akt signaling pathway. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 134, p. 75–82, 2010.