



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARILU CONSTANTINO MAX

**EFEITO DA ADIÇÃO DE EGF OU FSH NO CULTIVO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS
INCLUSOS EM FRAGMENTOS OVARIANOS**

MARILU CONSTANTINO MAX

**EFEITO DA ADIÇÃO DE EGF OU FSH NO CULTIVO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS
INCLUSOS EM FRAGMENTOS OVARIANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M463e Max, Marilu Constantino
Efeito da adição de EGF ou FSH no cultivo in vitro de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos / Marilu Constantino Max – Londrina, 2016.
80 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal – Teses. 2. Folículos ovarianos – Teses. 3. Equino. – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.
CDU 636.082

MARILU CONSTANTINO MAX

**EFEITO DA ADIÇÃO DE EGF OU FSH NO CULTIVO IN VITRO DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS
OVARIANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes
Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Evelyn Rabelo Andrade
Universidade Federal de Rondônia - UNIR

Profa. Dra. Roberta Garbelini Gomes
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Profa. Dra. Maria Isabel Melo Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Gustavo Martins Gomes dos Santos
SeepEmbryo

Londrina, 04 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho ao meu pai Lino
Max Sobrinho (*in memoriam*) e aos
meus filhos João e Paola, razão de
minha vida.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” Chico Xavier

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, nosso pai e criador, que em sua infinita misericórdia me abençoou com o Dom da Vida, me dando saúde, linda família, amigos maravilhosos e o mais importante, vontade de viver e querer sempre melhorar! Obrigada Senhor!!!

Aos meus pais, Lino e Deise, que sempre me ensinaram os verdadeiros valores da vida e foram instrumentos de Deus para que hoje eu aqui chegasse! Amo vocês eternamente...Pai, mesmo longe você sempre estará perto e vivo em nossos corações!

Aos meus filhos, João e Paola, que são a razão da minha vida, motivadores para que eu me esforce sem parar em ser um ser humano melhor. Obrigada Deus por filhos lindos e tão abençoados que me Deste. Amo vocês eternamente e incondicionalmente...

Ao meu companheiro e marido, Clayton, que apesar das dificuldades que percorremos juntos nestes anos, sempre me motivou para que eu seguisse meus sonhos! Imensa gratidão por me ajudar a formar esta família linda que temos e por ser um ótimo pai!!! Amo você.

Minhas irmã, Marina e Mariana, amadas e companheiras que sempre me deram apoio nas minhas escolhas. Obrigada por sempre me falarem o que eu muitas vezes não queria mas precisava ouvir. Tenho muito orgulho de vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Seneda, que no decorrer destes 12 anos de convivência se tornou um grande amigo, senão o melhor. Meu irmão, compadre, meus mais sinceros agradecimentos são pouco perto de tanta confiança, companheirismo e credibilidade em mim. Sempre ao meu lado me guiando com seus conselhos de um verdadeiro irmão. Profissionalmente me proporcionando ótimas oportunidades de trabalho e aprendizado.

A Profa. Dra. Evelyn, amiga querida que sempre foi fonte de inspiração, como mãe e profissional dedicada. Obrigada por fazer parte desta estapa de minha vida Vê!

A Profa. Dra. Fabiana, minha amiga que já tive oportunidade de trabalharmos juntas, e que me ensinou muitas coisas....também tenho muito orgulho pela pessoa que você é Fabi! Sempre dedicada e uma super profissional...Você não poderia faltar na minha defesa!

Minha outra amiga, Profa. Dra. Roberta, que teve paciência em me ensinar a ler as lâminas deste trabalho!!! Já tivemos ótimos momentos de convivência principalmente em nossas viagens profissionais (aliás divertidíssimas...).Obrigada Ro por também estar aqui!

Meu amigo, Dr. Gustravo, que felizmente aceitou fazer parte da minha banca, muito obrigada! Já trabalhamos juntos várias vezes e me lembro com muita saudade daquela época das reuniões na casa da Fabi...

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Livia, uma grande amiga. Me ensinou tudo que hoje eu sei sobre cultivo, me motivou neste novo desafio. Obrigada Lí por tudo que você fez e faz por mim.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Thales, Profa. Dra. Livia e Profa. Dra. Maria Isabel, que com suas brilhantes contribuições melhoraram este trabalho. Muito Obrigada!

Suelen e Camila Bizarro, minha mais profunda gratidão por tudo que contribuíram para que este trabalho fosse concluído. Profissionais extremamente dedicadas e competentes além de colegas muito queridas. Muito Obrigada meninas!!!! Vocês são demais!

Andressa, Isabela e Fabi, ótimas estagiárias que adoro e também contribuíram muito com o meu trabalho.

Ao Profr. Dr. Thales e Prof. Fábio que foram fundamentais na estatística. Obrigada pelo trabalho e parabéns pela competência.

Todos os integrantes do REPROA, que sempre me receberam com sorriso no rosto e com vontade de ajudar.

Ao João do laboratório LAPA, que orientava com simpatia o uso do micrótomo.

Nossa querida Eleni, que cuida com tanto carinho do Laboratório, sempre com simpatia e uma proatividade invejável.

Ao Prof. Dr. Amauri, que hoje é pró-reitor da pós graduação, exemplo de capacidade e dedicação, visando sempre o melhor para o programa. À CAPES, pela bolsa concedida durante o meu doutorado.

Nossa “santa” Helenice, que com boa vontade, simpatia e paciência orientando e ajudando os pós graduandos.

Finalmente, quero agradecer aos animais, infelizmente destinados ao abate, que também contribuíram no fornecendo do material para execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

MAX, Marilu Constantino. **Efeito da adição de EGF ou FSH no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos.** 2016. 101f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi testar a adição de diferentes concentrações de FSH ou EGF ao meio de cultivo *in vitro* por 2 ou 6 dias sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos. Para tanto foram realizados dois experimentos. No primeiro foram testadas diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL) adicionadas ao meio de cultivo *in vitro* durante 2 dias. Já o segundo utilizou concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL) por 2 ou 6 dias de cultivo. O protocolo a seguir foi o mesmo para os dois experimentos, diferenciando apenas as moléculas (EGF ou FSH) testadas. Ovários (n=5) de éguas em anestro sazonal foram coletados em abatedouro local. Fragmentos (n=6 EGF; n=11 FSH) de tecido ovariano com aproximadamente 3x3x1 mm foram obtidos de cada animal. Um fragmento foi imediatamente fixado e processado para análise histológica (grupo controle; Dia 0), o restante dos fragmentos foram colocados em PBS suplementado com penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 mg/mL) a 4° C durante 1 hora (período de transporte até o laboratório). Os fragmentos foram cultivados *in situ* durante 2 dias (D2) ou 6 dias (D6) em MEM+ ou MEM+ acrescido de concentrações diferentes de FSH ou EGF, criando os seguintes grupos para cada experimento: controle (D0); MEM+ (D2); MEM+ (D6); MEM+ 10 ng/mL FSH ou EGF (D2); MEM+ 10 ng/mL de FSH (D6); MEM+ 50 ng/mL de FSH ou EGF (D2); MEM+ 50 ng/mL de FSH (D6); MEM+ 100 ng/mL de FSH ou EGF (D2); MEM+ 100 ng/mL de FSH (D6); MEM+ 200 ng/mL de FSH ou EGF (D2); e MEM+ 200 ng/mL de FSH (D6). Os folículos pré-antrais foram avaliados por microscopia óptica e classificados de acordo com a fase de desenvolvimento (primordial, e em desenvolvimento) e a sua morfologia (normal ou degenerado). O modelo estatístico utilizado foi Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). No total foram avaliadas 1637 lâminas contendo 5818 cortes histológicos. Somente 13,85% dos cortes avaliados apresentavam folículos estando estes em diferentes fases de desenvolvimento. No primeiro experimento, após 2 dias de cultivo, os grupos cultivados com 200 ng/mL de FSH, tal como a concentração 10 ng/mL no cultivo por 6 dias apresentaram as melhores taxas de folículos em desenvolvimento comparando-os aos demais tratamentos. Em relação à integridade, os folículos pré-antrais na concentração de 100 ng/mL de FSH no cultivo por 2 dias e as concentrações de 50, 100 e 200 ng/mL de FSH no cultivo por 6 dias mostraram resultados superiores em relação ao restante dos grupos. No segundo experimento, por dois dias de cultivo, as concentrações 10, 100 e 200 ng/mL de EGF proporcionaram melhores taxas de desenvolvimento folicular em comparação com os demais tratamentos (controle D0, 50 e MEM+). Ao avaliar as taxas de folículos totais íntegros os tratamentos com 100 e 200 ng/mL de EGF obtiveram melhores resultados. Desta maneira concluímos que a adição de FSH por 2 ou 6 dias ou EGF por 2 dias ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos foram eficientes em promover o desenvolvimento e manter integridade folicular.

Palavras-chave: Folículo pré-antral. Égua. Cultivo *in vitro*. FSH. EGF

MAX, Marilu Constantino. **Effect of addition of EGF or FSH in equine preantral follicles included in ovarian fragments.** 2016. 101f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the addition of different concentrations of FSH or EGF in equine preantral follicles through in vitro culture. Therefore, we conducted two experiments. The first one was conducted to test different concentrations of EGF (10, 50, 100 and 200 ng / mL) added to the medium in vitro culture for 2. In the second one we used concentrations of FSH (10, 50, 100 and 200 ng / mL) for 2 or 6 days of culture. The standard protocol for both, except the inclusion of EGF or FSH, was as follows. Ovaries (n = 5) from mares in seasonal anestrus were collected at a local slaughterhouse. Ovarian tissue fragments (EGF n=6; FSH n = 11) of about 3x3x1 mm were obtained from each ovary. One fragment was immediately fixed and processed for histological analysis (non cultured control, Day 0)- and, the remaining fragments were placed in PBS supplemented with penicillin (200 IU / mL) and streptomycin (200 mg / mL) at 4 ° C for 1 hour (period of transport to the laboratory). The fragments were cultured for 2 days in situ (D2) or 6 days (D6) in MEM or MEM+ plus different concentrations of FSH or EGF, creating the following groups for each experiment: control (D0); MEM + (D2); MEM + (D6); MEM + 10 ng / mL EGF and FSH (D2); MEM + 10 ng / mL of FSH (D6); MEM + 50 ng / mL of FSH or EGF (D2); MEM + 50 ng / mL of FSH (D6); MEM + 100 ng / mL FSH and EGF (D2); MEM + 100 ng / mL of FSH (D6); MEM + 200 ng / mL FSH and EGF (D2); and MEM + 200 ng / mL of FSH (D6). Preantral follicles were evaluated by histology and classified according to the developmental stage (primary and developing) and morphology (normal or degenerated). The statistical model used was Fisher's Exact Test (p<0.05). At total of 1,637 slides were evaluated, containing 5,818 tissue sections. Only 13.8% of the evaluated sections presented follicles, which were at different stages of development. The first experiment, after 2 days of culture, samples cultured with 200 ng / mL FSH showed the best follicle development rates compared to the other treatments, while after six days the best results were found with 10 ng / mL FSH. Regarding the integrity of preantral follicles, the group exposed to 100 ng / mL FSH for for 2 days and 50, 100 and 200 ng / mL FSH for 6 days showed better results in comparison relation to the other groups. The second one, for two days of culture, concentrations 10, 100 and 200 ng / mL EGF provided the best developmental rates of follicles, when compared to the other treatments (D0 control 50 and MEM). We conclude that FSH for 2 or 6 days or EGF for 2 days added to the medium in vitro culture were effective in promoting follicular development in equine ovarian fragments.

Keywords: Pre-antral follicles. Mare. In vitro culture. FSH. EGF

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Diagrama comparando as relações entre as camadas cortical e medular de ovários equinos e de outras espécies mamíferas20
- Figura 2 - Características macroscópicas de ovários equinos. A: Ovário equino cíclico. B: Ovário equino em anestro estacional20
- Figura 3 - Imagens de folículos ovarianos de éguas obtidas através de histologia clássica, ilustrando a morfologia e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais e antral. Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Células da Granulosa e 4. Cavidade antral.26
- Quadro 1 - Diagrama ilustrativo dos principais avanços no cultivo *in vitro* de FOPA nas diferentes espécies.....31

ARTIGO 1

- Tabela 1 - Porcentagem total de folículos normais e degenerados avaliados durante 2 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL)43
- Tabela 2 - Porcentagem total de folículos primordiais e em desenvolvimento, avaliados durante 2 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL).....44
- Tabela 3 - Porcentagem de folículos íntegros, primordiais e em desenvolvimento, avaliados durante 2 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL).....44

ARTIGO 2

- Tabela 1 - Número total e porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento durante 2 (D2) e 6 (D6) dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL).....55
- Figura 1 - Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento totais durante 2 dias (D2) de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL).....55
- Figura 2 - Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento totais durante 6 dias (D6) de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL).....56
- Figura 3 - Porcentagem de folículos íntegros durante 2 (D2) e 6 (D6) dias (D6) de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL)57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IA	Inseminação artificial
TE	Transferência de embriões
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
ICSI	<i>Intracytoplasmic sperm injection</i> - injeção intracitoplasmática de espermatozoides
GIFT	<i>Gamete intrafallopian transfer</i> - transferência de gametas intrafalopiana
MOEPF	<i>Manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles</i>
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais
CGP	Células germinativas primordiais
LH	<i>Luteinizing hormone</i> - hormônio luteinizante
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> - fator de crescimento epidermal
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> - fator de crescimento de fibroblasto
TGF	<i>Transforming growth factor</i> - fator transformador do crescimento
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> - fator de crescimento semelhante à insulina
GDF	9 growth and differentiation factor - fator de crescimento e diferenciação
FSH	<i>Follicle stimulant hormone</i> - hormônio folículo estimulante
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> – antígeno nuclear de proliferação celular
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - albumina sérica bovina
GH	<i>Growth hormone</i> - hormônio do crescimento
AMH	<i>Anti-Müllerian hormone</i> - hormônio anti-Mülleriano
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i> - fator de crescimento de queratinócito
NGF	<i>Nerve growth factor</i> – fator de crescimento neural
SIP	<i>Sphingosine-1-phosphate</i> - esfingosina 1-phosphato
LIF	<i>Leukemia inhibitor factor</i> - fator inibidor de leucemia
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> – fator de crescimento endotélio vascular
MEM	<i>Minimum essential media</i> – meio essencial mínimo
M199	Meio 199

MEM+	<i>Supplemented minimum essential media</i> – meio essencial mínimo suplementado
D0	Day zero – dia zero
D2	Day two – dia 2
D6	Day six – dia 6
IVF-FIV	<i>In vitro fertilization</i> – fertilização <i>in vitro</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - tampão fosfato-salino
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i> - ácido periódico de Schiff
BPU	<i>Biopsy pick-up</i> – biópsia
GC	<i>Granulosa cell</i> - células da granulosa
ON	<i>Oocyte nucleus</i> - núcleo do oócito
DAB	<i>Diaminobenzidine substrate</i> - substrato de diaminobenzidina
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> - proteína morfogenética óssea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	OVÁRIO EQUINO.....	19
2.2	OOGÊNESE.....	21
2.3	FOLICULOGÊNESE	22
2.4	POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA	23
2.5	FOLÍCULOS OVARIANOS.....	24
2.5.1	Folículos Pré-antrais	24
2.5.2	Folículos Antrais	25
2.6	ATRESIA FOLICULAR.....	26
2.7	MOIFOPA - MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS	28
2.7.1	Estado do Cultivo <i>in vitro</i> de Folículos Pré-antrais	29
2.7.2	Cultivo <i>In vitro</i> de Folículos Ovarianos Pré-Antrais.....	31
2.7.3	Importância da Composição do Meio sobre o Desenvolvimento Folicular <i>in vitro</i>	32
2.7.3.1	Fator de crescimento epidermal (EGF).....	33
2.7.3.2	Hormônio folículo estimulante (FSH)	34
3	HIPÓTESES	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GERAL	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	38
5.1	ARTIGO 1	39
	Introdução	40
	Material e Métodos	40
	<i>Coleta dos ovários</i>	40

	<i>Protocolo Experimental</i>	41
	<i>Análise Estatística</i>	42
	Resultados	43
	Discussão	45
	Conclusão	47
	Referências	47
5.2	ARTIGO 2	50
	Introdução	51
	Material e Métodos	52
	<i>Coleta dos Ovários</i>	52
	<i>Protocolo Experimental</i>	53
	<i>Análise Estatística</i>	54
	Resultados	54
	Discussão	57
	Conclusão	59
	Referências	59
6	DISCUSSÃO GERAL	63
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICES	80

1 INTRODUÇÃO

A população mundial de equinos é estimada em 58.315.816 animais (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo e o maior da América Latina, com uma população de 7.986.023 de animais, sendo 5.541.702 equinos, 1.130.795 asininos e 1.313.526 muares (IBGE, 2012). Somente com a produção de animais, o agronegócio equestre movimenta 7,3 bilhões de reais. Além disso, a indústria equestre envolve mais de 30 segmentos entre insumos, criação e destinação final, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. O Brasil no período de 1997 a 2009, expandiu em 524% a exportação de equinos vivos (BRASIL, 2009).

Com isso, visando o aumento da produtividade e incremento genético da população de equídeos, algumas biotécnicas da reprodução já tem sido empregadas com êxito como a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE), a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) e a Clonagem. Também destacam-se a Produção *In vitro* de Embriões (PIV), a Transferência de Gametas Intrafalopiana (GIFT), e mais atualmente na espécie equina, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), a qual ainda esta sendo fruto de pesquisas (HAAG et al., 2013; GOMES et al., 2015).

A MOIFOPA consiste no isolamento ou resgate de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), seguido da conservação (resfriamento ou congelação) e cultivo folicular *in vitro*, tendo como finalidade promover o crescimento, a maturação e a fecundação dos oócitos previamente inclusos nos referidos folículos (FIGUEIREDO et al., 2007). Os FOPA representam 90% da população folicular ovariana e são responsáveis pela contínua renovação de folículos antrais no ovário (HASHIMOTO et al., 2007; SAUMANDE, 1991). No entanto, 99,9% destes folículos sofrem atresia (EGGAN et al., 2006). Esta biotécnica objetiva maximizar o aproveitamento dos folículos do *pool* de reserva ovariano, resgatando inúmeros oócitos para a realização de outras biotécnicas, como as citadas anteriormente, e melhor compreensão dos aspectos envolvidos na foliculogênese.

Desde a década de 80 a MOIFOPA tem sido estudada, apresentando resultados satisfatórios em algumas espécies. Como exemplo, em suínos (HIRAO et al., 1994; WU; CARREL; WILCOX, 2001), bubalinos (GUPTA et al., 2008), ovinos

(ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010) e caprinos (HUANMIN; YONG, 2000; MAGALHÃES et al., 2011; SARAIVA et al., 2010) já foi demonstrado que os oócitos de folículos pré-antrais podem crescer, adquirir competência meiótica, serem fertilizados *in vitro* e chegar até o estágio de blastocisto. Em humanos (ROY; TREACY, 1993) e bovinos (McCAFFERY et al., 2000; ROSSETTO et al., 2013a), folículos pré-antrais foram isolados e desenvolvidos *in vitro* até o estágio antral. Em animais de laboratório, os resultados foram ainda mais promissores. Em ratos relatou-se a produção *in vitro* de embriões (DANIEL; ARMSTRONG; GORE-LANGTON, 1989). Eppig e Schroeder (1989) obtiveram o nascimento de camundongos a partir de FOPA que cresceram, foram maturados e fecundados *in vitro*. Carroll et al. (1990) conseguiram produtos viáveis oriundos de FOPA de camundongos, os quais haviam sido submetidos à procedimentos de congelação e descongelação. Adicionalmente, nos últimos anos tem-se testado meios ideais para a vitrificação do tecido ovariano e posterior cultivo *in vitro* de FOPA inclusos de caprinos e bovinos com resultados satisfatórios (CASTRO et al., 2014; FAUSTINO et al., 2014).

Nos mamíferos, o contínuo crescimento folicular é controlado tanto por hormônios (gonadotróficos e somatotróficos), como por fatores de crescimento que agem, direta ou indiretamente, de forma autócrina e/ou parácrina. Neste contexto, uma melhor identificação e compreensão das diferentes substâncias envolvidas na promoção do desenvolvimento folicular e no curso da atresia são aspectos importantes para subsidiar o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente para que ocorra a ativação folicular *in vitro*, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais (DEMEESTERE et al, 2005).

Já foi demonstrado que o hormônio folículo estimulante (FSH) quando usado no cultivo *in vitro* de folículos pré antrais de várias espécies, mantém a viabilidade folicular, além de promover o crescimento dos mesmos (BARROS et al., 2013; GUTIERREZ et at., 2000; MATOS et al., 2007; SARAIVA et al., 2011; SILVA et al., 2004a).

O fator de crescimento epidermal (EGF) possui papel importante na foliculogênese ovariana, proporcionando a regulação de diversos processos de folículos primordiais, incluindo a ativação folicular, proliferação de células da granulosa, redução da taxa de atresia e manutenção da viabilidade folicular (ANDRADE et al., 2005; CELESTINO et al., 2009; DEMEESTERE et al., 2005; MAO et al., 2004; SILVA et al., 2010).

Em equinos, pesquisas envolvendo o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos ainda são escassas. Isto pode ser explicado principalmente devido à dificuldade em se obter ovários associada à baixa densidade populacional de folículos no estroma ovariano desta espécie (GOMES et al., 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição do fator de crescimento epidermal (EGF) ou do hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a viabilidade e o desenvolvimento de folículos pré-antrais no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos da espécie equina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVÁRIO EQUINO

Na espécie equina, por volta de 39 a 45 dias de gestação ocorre a diferenciação das gônadas. Estas se originam de espessamentos conhecidos como cristas gonadais formadas no terço médio dos ductos mesonéfricos. As células germinativas primordiais presentes no embrião migram do endoderma do saco vitelínico para as cristas gonadais e em seguida inicia-se a diferenciação gonadal quando estas células passam a ser denominadas ovogônias (fêmeas) ou espermatogônias (machos). As gônadas fetais equinas de 7 a 8 meses de idade gestacional são maiores que os ovários de éguas adultas (NAVES et al., 2008).

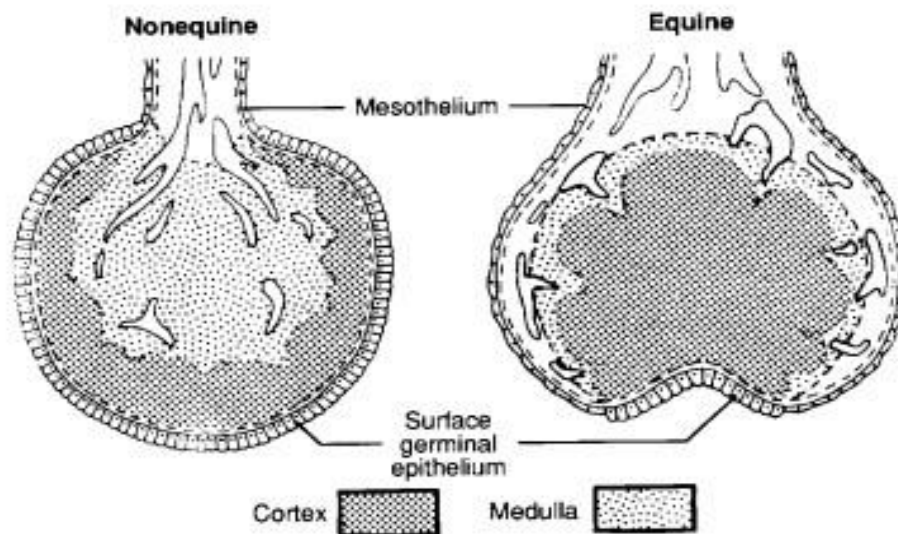
Diferentemente das outras espécies de mamíferos domésticos, o ovário equino desenvolve características peculiares durante a fase fetal, como por exemplo, possuir abundante estroma fibroso, conter frequentemente tecido adrenocortical ectópico e fossa ovulatória (NAVES et al., 2008). Além disso, na espécie equina, os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos se encontram na porção mais interna do ovário (borda mais ventral e côncava), que se localiza próxima à fossa ovulatória. A região vascular, mais dorsal e convexa (externa), é constituída por tecido conjuntivo, algumas células musculares lisas, nervos, artérias e veias, responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário, conhecida como hilo ovariano (BLANCHARD et al., 2003; EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007; HAFEZ, 1996) (Figura 1). Pequenos vasos sanguíneos estendem-se a partir da região vascular para dentro da região parenquimatosa do ovário. A fossa ovulatória se localiza na borda ventral do tecido ovariano (região côncava) (CORMACK, 1991; EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007).

Em equinos, os ovários estão suspensos pelo ligamento mesovárico na região sublombar da cavidade abdominal e apresentam pouca mobilidade. Dependendo do estágio do ciclo estral, estes possuem aproximadamente 5 a 8 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e seu peso varia entre 30 a 120 gramas (Figura 2) (BLANCHARD et al., 2003; EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007). No anestro estacional os ovários medem aproximadamente 2,4 x 1,6 x 1,6 cm, pesando em torno de 17,5

gramas e possuem folículos menores que 5 mm, sendo que a maioria sofrerá o processo de atresia (GINTHER, 1979).

O ovário possui funções endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides e diversos peptídeos) e exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos) a qual é exercida pela interação de dois fenômenos, a oogênese e a foliculogênese (EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007; HAFEZ, 1996; SAUMANDE, 1991).

Figura 1 - Diagrama comparando as relações entre as camadas cortical e medular de ovários equinos e de outras espécies mamíferas



Fonte: Ginther (1979).

Figura 2 - Características macroscópicas de ovários equinos. A: Ovário equino cíclico. B: Ovário equino em anestro estacional.



Fonte: Da Autora.

2.2 OOGÊNESE

Nos mamíferos a oogênese pode ser definida como uma sequência de eventos no período embrionário, em que as células germinativas primordiais (CGP) de origem extragonadal, desenvolvem-se e diferenciam-se até a formação do oócito haploide fecundado (RÜSSE, 1983). A oogênese inicia-se na vida fetal, mas somente alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007; WASSARMAN, 1988).

Após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, forma-se o zigoto que irá evoluir até blastocisto, o qual apresenta duas estruturas: o trofoblasto e o embrioblasto. O embrioblasto originará três folhetos: o ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Estes formarão várias estruturas, como por exemplo, o saco vitelínico (HIRSHFIELD, 1991). As CGP se originam no epiblasto e por fatores quimiotáticos migram para o hipoblasto. Após diversos eventos, estas células migram para o mesênquima da crista genital colonizando a gônada indiferenciada. Por fim, perdem a capacidade de migração e começam a se multiplicar ativamente por mitose e diferenciam-se em oogônias (ERICKSON, 1966; WASSARMAN, 1994).

Após várias mitoses, as oogônias entrarão na primeira divisão meiótica (estádio de prófase I) e serão denominadas de oócitos primários ou imaturos. O núcleo oocitário, que está na meiose I, irá passar por quase todos os estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), no entanto, o processo meiótico é interrompido no estágio de diplóteno e o núcleo do oócito irá permanecer neste estágio até que o animal entre na puberdade. Durante este período, o oócito passará por uma fase de crescimento, caracterizada por um aumento na síntese de RNA, acúmulo de lipídeos e absorção ativa e/ou passiva de diferentes nutrientes (FIGUEIREDO et al., 2008).

Ao atingir a puberdade a meiose é reiniciada, ocorrendo a liberação do hormônio luteinizante (LH) algumas horas antes da ovulação. Desta maneira o oócito passará pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, e então o primeiro corpúsculo polar é expulso. Neste momento, o oócito é denominado de secundário, pois seu núcleo se encontra na segunda divisão meiótica. Esta, por sua vez, tem uma rápida e às vezes inexistente prófase II, que avançará até metáfase II, quando então ocorre a segunda parada da meiose. O oócito só finalizará a meiose se for fecundado pelo

espermatozoide. Havendo a fecundação, o núcleo do oócito irá passar pelos estádios de anáfase II e telófase II, expulsará o segundo corpúsculo polar e formará o oócito haploide fecundado, assim finalizando a oogênese (BETTERIDGE et al., 1989).

2.3 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular. Este evento origina-se com a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (MOORE; PERSAUD, 1994; SAUMANDE, 1981). Sendo assim, a foliculogênese começa depois do início e termina antes do fim da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). Ela pode ser dividida em duas fases: 1) Fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; 2) Fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (FIGUEIREDO et al., 1995).

Os folículos ovarianos são unidades morfológicas funcionais onde células somáticas e germinativas estão interligadas, porém, interdependentes, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de um folículo maduro e na ovulação de um oócito competente para ser fecundado (CANIPARI, 2000).

Na vida fetal, uma camada de células da pré-granulosa (células somáticas planas ou achatadas) envolvem o oócito primário ou imaturo do feto (núcleo em prófase I), dando origem ao folículo primordial, o primeiro e mais primitivo dos estádios foliculares. Depois da formação destes folículos, as células da pré-granulosa cessam sua multiplicação e o folículo primordial entra no período de dormência ou quiescência (FIGUEIREDO et al., 2008). A retomada da proliferação celular só acontece quando o folículo primordial começa a crescer, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991), atravessando sucessivamente os estádios de folículos primários, secundários e terciário até chegar ao folículo préovulatório (FIGUEIREDO et al., 2008).

A maioria dos oócitos presentes no ovário estão inclusos em folículos primordiais, porém, a população destes folículos diminui progressivamente durante a vida reprodutiva da fêmea (EGGAN et al., 2006; GOSDEN et al., 1983; KERR et al., 2012). No ovário há uma grande reserva de folículos primordiais quiescentes e uma pequena quantidade de folículos em crescimento (CAHILL; MAULÉON, 1981).

Os mecanismos que promovem o crescimento dos folículos pré-antrais ainda estão sendo elucidados. Para que ocorra a foliculogênese e oogênese e, os FOPA se desenvolvam, é necessária a interação entre a sinalização de fatores parácrinos secretados pelo oócito e células somáticas do ovário (HUTT et al., 2006). O desenvolvimento dos folículos pré-antrais, possivelmente recebe grande influência de fatores intraovarianos como a ativina (THOMAS, ARMSTRONG; TELFER, 2003), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento de transformação (TGF α e β), fator de crescimento insulínico (IGF-1 e 2) (DUARTE et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2008; ZHAO et al., 2001), Kit ligand, também conhecido como “*stem cell factor*” ou “*steel factor*” (FAUSTINO et al., 2013), e fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9) (MARTINS et al., 2008).

2.4 POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA

A população de folículos presentes no ovário é influenciada por diversos fatores como genética, raça, idade, níveis hormonais, estado reprodutivo, variações individuais e nutricionais do animal (CAHILL; MAULÉON, 1981; ERICKSON, 1966; ERICKSON; REYNOLDS; MURPHEREE, 1976; PETERS, 1976; RÜSSE, 1983; SCARAMUZZI et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2011).

A estimativa da população de folículos pré-antrais em ovários de fêmeas bovinas de diferentes idades e raças variou de 143.929 a 285.155 folículos para fetos, 76.851 a 109.673 folículos para novilhas, e 39.438 a 89.577 folículos para vacas, *Bos indicus* e *Bos taurus* respectivamente (SILVA-SANTOS et al., 2011) e a população de folículos primordiais de vacas de até 24 meses de idade foi estimada em 130.000 folículos (ERICKSON, 1966). Em cabras, a população folicular ovariana foi descrita em 37.646 folículos (LUCCI et al., 1999), sendo 26.613 primordiais (LUCCI et al., 1999); nas ovelhas, 160.000 folículos (DRIANCOURT, 1991), sendo 77.000 folículos primordiais (LAND, 1970), na mulher 2.000.000 de folículos (ERICKSON, 1986) e, na cadela, variou de 6.164 a 59.283 folículos nas fêmeas adultas, dependendo do tamanho do animal (LUNARDON et al., 2015).

Na espécie equina, estima-se que sua população folicular seja ao redor de 36.000 folículos por ovário (EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007). Com relação à quantidade de folículos primordiais, Driancourt et al. (1982) estimaram que

ovários de pôneis e éguas de sela de 2 a 4 anos de idade apresentam em média 35.590 folículos primordiais.

2.5 FOLÍCULOS OVARIANOS

Os folículos diferem entre si pela forma e número de camadas de células que circundam o oócito (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002). De acordo com Hulshof et al. (1994), os folículos pré-antrais são classificados em primordiais, primários, secundários e, os antrais, em terciários e pré-ovulatórios. Os folículos primordiais e primários são diferenciados por suas características morfológicas e não pelo seu diâmetro.

Além disso, os folículos também podem ser classificados de acordo com a sua viabilidade, como folículos viáveis (lâmina basal, vesícula germinativa e nucléolos intactos e oócitos com não mais que três vacúolos citoplasmáticos), folículos em atresia inicial (estágio I: oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estágio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta condensação de cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estágio III: oócito completamente fragmentado ou ausente) (WANDJI et al., 1996).

2.5.1 Folículos Pré-antrais

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular do ovário mamífero (ERICKSON, 1986) e constituem o estoque de gametas femininos durante sua vida reprodutiva (LIU et al., 2001).

O crescimento folicular inicia-se com a ativação de folículos primordiais, sendo caracterizado por três eventos principais: mudanças na forma das células da granulosa de pavimentosa para cubóide, proliferação destas células e aumento de tamanho do oócito (FORTUNE, 2003; HIRSHFIELD, 1991).

Os folículos primordiais, também conhecidos como folículos de reserva ou quiescentes, compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário. Estes são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de células da pré-granulosa (células somáticas planas ou achatadas) de forma pavimentosa (ERICKSON, 1986; HIRSHFIELD, 1991). Os folículos que

apresentam algumas células da granulosa com formato pavimentoso e outras com formato cuboide são denominados folículos de transição (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKERS, 1997).

São considerados folículos primários aqueles que são constituídos por um oócito central circundado por uma única camada de células da granulosa, mais volumosas, em maior quantidade e de formato cuboide (HULSHOF et al., 1994; VAN DER HURK et al., 1997). Seu oócito aumenta de volume, ao mesmo tempo em que surge ao seu redor a zona pelúcida, que se mantém por todo o desenvolvimento do folículo (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002; GEORGE; ALVES; CASTRO 1998).

Já os folículos secundários são caracterizados por um oócito central circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cuboide. Os folículos secundários mais avançados apresentam as fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecais. Neste estágio, a zona pelúcida se torna evidente (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKERS, 1997). Neste estágio de desenvolvimento folicular, o núcleo do oócito passa de uma posição central no oolema dos folículos primordiais para uma região excêntrica, situando-se entre a zona pelúcida e o centro do oócito (HYTTEL et al., 1997).

2.5.2 Folículos Antrais

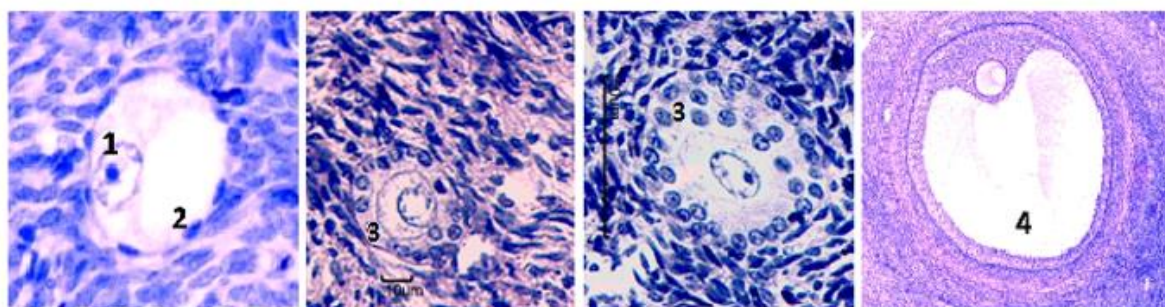
Esta categoria de folículos compreende os folículos terciários e os folículos maduros ou também conhecidos como pré-ovulatórios. O folículo antral é caracterizado por apresentar uma área preenchida por fluido folicular, conhecida como antro folicular e intensa proliferação das células da granulosa (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002).

Os folículos terciários são constituídos por um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, formada pelo acúmulo de líquido durante a evolução do folículo secundário, uma membrana basal e duas camadas de células tecais, conhecidas como teca interna e teca externa (GORDON, 1994).

Folículo maduro ou pré-ovulatório é representado pelo estágio terminal do desenvolvimento folicular, podendo medir 35 a 50 mm de diâmetro na espécie equina (EVANS; CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007; HULSHOF et al., 1994). Apresenta o

oócito aderido à parede do folículo pelas células foliculares e uma grande cavidade preenchida pelo líquido folicular. Os folículos pré-ovulatórios possuem também um conjunto de células envolvendo o oócito denominada *corona radiata* e também, o complexo *cumulus oophorus* (BANKS, 1992; FIGUEIREDO et al., 2008; GEORGE ALVES; CASTRO, 1998). A morfologia e desenvolvimento dos folículos ovarianos na espécie equina está ilustrada na Figura 3.

Figura 3 - Imagens de folículos ovarianos de éguas obtidas através de histologia clássica, ilustrando a morfologia e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais e antral. Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Células da Granulosa e 4. Cavidade antral. Da esquerda para direita: Folículo primordial; Folículo Primário; Folículo Secundário e Folículo Antral.



Fonte: Adaptado de Gomes et al. (2012).

2.6 ATRESIA FOLICULAR

Apesar dos folículos pré-antrais representarem 90% da população folicular ovariana, 99,9% deles não chegam até a ovulação, sofrendo um processo degenerativo ou apoptótico conhecido como atresia, tornando o ovário um órgão de baixíssima produtividade (IRELAND, 1987). A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, e indica ser um dos elementos que controla o número de folículos selecionados até chegar à ovulação. Este processo refere-se aos folículos antrais que sofrem mudanças degenerativas antes mesmo de ovularem (KRYSKO et al., 2008). A duração precisa, bem como o estágio no qual os folículos ovarianos são mais susceptíveis a sofrer atresia permanece desconhecida (HENDERSON et al., 1987).

Ainda na década de 80, foi postulado que a atresia ocorre por um processo de morte celular programada conhecido por apoptose (MARKSTROM et al., 2002; REYNAUD; DRIANCOURT, 2000; TILLY, 1996; TSAFIRI; BRAW, 1984). A apoptose

ocorre em todas os organismos multicelulares e em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a algum estímulo fisiológico. A alteração típica observada é a condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear. Independentemente da condensação da cromatina, endonucleases dependentes de cálcio e magnésio são ativadas, resultando na clivagem do DNA entre as unidades nucleossomais, a cada 180-200 pares de bases (HUGHES JUNIOR; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). O citoplasma de células apoptóticas é caracterizado pela agregação e desorientação das organelas citoplasmáticas. Concomitantemente, a membrana plasmática mostra sinais de retração e a célula rompe-se em diversos fragmentos conhecidos por corpos apoptóticos, que são posteriormente fagocitados (KAIPIA; HSUEH, 1997). Este processo usualmente inicia-se antes que a membrana plasmática perca completamente sua integridade. Desta forma, não ocorre extravasamento dos componentes citoplasmáticos e não é observada reação inflamatória (HSUEH; BILLIG; TSAFRIRI, 1994).

Durante a atresia folicular, muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa. O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento. Nesta fase alterações nas células da granulosa são raramente observadas (JORIO; MARIANA; LAHLOU-KASSI, 1991; MORITA; TILLY, 1999).

É importante ressaltar que após a formação da cavidade antral, ocorre uma modificação na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa. Os primeiros sinais morfológicos de atresia nestas são presença de núcleos picnóticos, condensação da cromatina e retração nuclear, observados nas células próximas à cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral (HUGHES JUNIOR; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). Com a progressão da atresia, observa-se redução no número de camadas das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos. Após estas drásticas mudanças na

camada granulosa, o oócito, frequentemente, sofre pseudomaturação, fragmenta-se e, finalmente, é eliminado durante os estágios finais de atresia (BYSKOV, 1974).

Desta maneira, a atresia, mesmo sendo um fenômeno fisiológico, reduz significativamente o número de oócitos potencialmente ovuláveis, tendo como consequência, a diminuição da produção de gamentas viáveis durante a vida reprodutiva do animal (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.7 MOIFOPA - MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIAS

A MOIFOPA é uma biotécnica que utiliza folículos ovarianos pré-antrais, os quais podem ser estocados por um período curto (resfriamento) ou longo (congelamento). Estes folículos são então destinados ao cultivo folicular *in vitro*, o qual objetiva promover o crescimento, maturação e fecundação dos oócitos previamente inclusos em FOPA (FIGUEIREDO et al., 2007).

Esta biotécnica tem papel importante tanto na pesquisa básica como na aplicada. Na pesquisa básica, a MOIFOPA poderá contribuir esclarecendo os mecanismos ainda desconhecidos nos estágios iniciais da foliculogênese. No tocante à reprodução animal aplicada, futuramente, o isolamento de FOPA de um ovário e, posterior cultivo *in vitro* de seus folículos até o estágio de maturação, poderá contribuir com a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção, que não respondem à tratamentos convencionais de superovulação, com patologias graves no oviduto e/ou útero e naqueles que por algum motivo vieram a óbito ou tiveram que ser sacrificados. Além disso, a MOIFOPA poderá fornecer um grande número de oócitos de um mesmo animal, que poderão ser maturados *in vitro* e utilizados na padronização de técnicas como de FIV e clonagem em diversas espécies. Outro aspecto relevante é a criopreservação de FOPA isolados ou *in situ* (no interior de tecido ovariano) para a formação de bancos de germoplasma (FIGUEIREDO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008; FAUSTINO et al., 2014).

2.7.1 Estado do Cultivo *in vitro* de Folículos Pré-antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tem apresentado progresso expressivo em diferentes espécies animais (Figura 4). Em felinos e em marsupiais já foi observado o crescimento de folículos ovarianos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém, sem a formação de antro (BUTCHER; ULLMAN, 1996; JEWGENOW; STOLTE, 1996). Jewgenow et al. (1998) descreveram o desenvolvimento de FOPA oriundos de ovários de gatas, leoa e tigresa. Butcher e Ullman (1996) relataram o efeito positivo do FSH no crescimento *in vitro* de FOPA em gambás sulamericanos. Em cadelas, o cultivo *in vitro* de FOPA promoveu o desenvolvimento dos folículos até o estágio antral (SERAFIM et al., 2010). Em bovinos folículos pré-antrais isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral, assim como em humanos (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000; ROSSETTO et al., 2013a; ROY; TREACY, 1993). Em suínos, folículos secundários cultivados *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* chegando até o estágio de blastocisto (HIRAO et al., 1994; WU; CARREL; WILCOX, 2001). Em bubalinos e ovelhas obteve-se também a produção de embriões a partir da MOIFOPA (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; GUPTA et al., 2008;).

Daniel, Armstrong e Gore-Langton (1989) relataram a produção *in vitro* de embriões de ratos a partir da fecundação de oócitos oriundos de FOPA. Em camundongos, o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais foi descrito por vários autores (CARROLL; WHITTINGHAM; WOOD, 1991; EPPIG, 1977; NAYÜDU; OSBORN, 1992; QVIST et al., 1990). Carroll et al. (1990) também promoveram o nascimento de camundongos após congelação e descongelação, crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais. Entretanto, os melhores resultados foram observados por Eppig e O'brien (1996) com o nascimento de camundongos a partir de folículos pré-antrais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*.

Em caprinos, Huanmin e Yong (2000) relataram o desenvolvimento de FOPA até o estágio antral, e Saraiva et al. (2010) promoveram o desenvolvimento dos FOPA com produção de embriões. Recentemente, Brito et al. (2014) e Silva et al. (2013) descreveram resultados promissores com o cultivo tridimensional com baixas concentrações de hidrogel de alginato de FOPA caprinos isolados. Estes resultados demonstraram a possibilidade deste tipo de sistema de cultivo mimetizar as condições

in vivo, promovendo a obtenção de oócitos competentes para posterior produção de embriões.

Atualmente, estão sendo testados meios ideais para a vitrificação de tecido ovariano e posterior cultivo *in vitro* de FOPA inclusos. Em caprinos, Faustino et al. (2014) vitrificaram fragmentos de tecido ovariano e em seguida, promoveram o cultivo dos FOPA e, observaram que não houve aumento do dano ao DNA destes folículos inclusos, podendo esta ser uma metodologia de conservação do tecido ovariano aplicável. Em bovinos, Castro et al. (2014) testaram os meios McCoy e M199 e evidenciaram que M199 é recomendado para o cultivo *in vitro* a fresco e o segundo para o cultivo após vitrificação do fragmento ovariano.

Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais nas espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório.

Na espécie equina, até o presente momento, existem poucos relatos sobre a realização da MOIFOPA. Isto pode ser explicado pela baixa disponibilidade de ovários. Os centros de pesquisas raramente dispõem de ovários oriundos de abatedouros de equinos devido à escassez dos mesmos no Brasil e na maioria dos países. Outra restrição importante refere-se à baixa densidade populacional e escassez de informações sobre a distribuição espacial dos folículos no parênquima ovariano desta espécie (GOMES et al., 2012).

Gomes et al. (2012) reportaram que FOPA equinos inclusos em fragmentos ovarianos podem ser conservados *in situ* com sucesso em PBS a 4° C por até 4 horas para posterior cultivo *in vitro*. Com relação ao cultivo *in vitro* propriamente dito, na espécie equina existem poucos relatos. Haag et al. (2013), através da obtenção de fragmentos ovarianos equinos via biópsia *in vivo*, compararam os meios α -MEM e TCM-199 no cultivo *in vitro* de FOPA por um ou sete dias através de análise histológica. Os resultados encontrados foram que FOPA equinos podem ser cultivados *in vitro* em α -MEM por sete dias promovendo desenvolvimento dos folículos e crescimento de oócitos e folículos, com 27% destes permanecendo morfolologicamente normais.

Recentemente Gomes et al. (2015), avaliaram o efeito da adição do ácido ascórbico (AA) ao meio de cultivo *in vitro* de Fopa equinos inclusos em fragmentos ovarianos durante 2 e 6 dias. Foi observado que o AA nas concentrações de 50 e 100

$\mu\text{g/mL}$ por 6 dias de cultivo *in vitro* foi benéfico tanto no desenvolvimento quanto na viabilidade folicular.

Devido a esta escassez literária a respeito do cultivo *in vitro* de FOPA inclusos em fragmentos ovarianos equinos, ainda faz-se necessária a realização de pesquisas adicionais, no intuito de desenvolver um meio de cultivo ideal e explorar e compreender com mais detalhes os mecanismos e eventos envolvidos na regulação dos estágios iniciais da foliculogênese nesta espécie.

Quadro 1 Diagrama ilustrativo dos principais avanços no cultivo *in vitro* de FOPA nas diferentes espécies

ESPÉCIE	CRESCIMENTO	ANTRO	MATURAÇÃO	EMBRIÃO	NASCIMENTO
ÉGUA	X				
GATA	X				
CADELA	X	X			
VACA	X	X			
MULHER	X	X			
OVELHA	X	X	X	X	
CABRA	X	X	X	X	
PORCA	X	X	X	X	
BÚFALA	X	X	X	X	
CAMUNDONGA	X	X	X	X	X

Fonte: Adaptado de Rossetto et al. (2011).

2.7.2 Cultivo *In vitro* de Folículos Ovarianos Pré-Antrais

O modelo de cultivo ideal deve promover três condições básicas e sequenciais: manter a viabilidade dos folículos, preservar sua morfologia pré-existente *in vivo* e, por último, propiciar o crescimento e a maturação folicular. No entanto, principalmente em animais domésticos, os sistemas de cultivo existentes ainda atendem parcialmente os pré-requisitos supracitados (FIGUEREDO et al., 2008). O desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* eficazes é possível desde que seja mantida a regulação entre os fatores inibitórios e estimulatórios presentes no ovário (NÓBREGA JUNIOR et al., 2014).

Outro fator que afeta a capacidade do folículo em responder aos diversos estímulos, é o substrato com que o folículo mantém contato. Dependendo de como se dá o contato do folículo com o substrato, pode-se classificar os sistemas de cultivo em bi ou tridimensionais. No sistema bidimensional, o folículo se localiza em cima do

substrato, que pode ser o plástico da placa de cultivo, envolto ou não por ágar, por compostos da matriz extracelular purificados (colágeno do tipo I, fibronectina, laminina e matrigel), ou ainda por monocamada de células somáticas (células da granulosa, fibroblastos e outros componentes do tecido ovariano) (FIGUEIREDO et al., 2008). Já no sistema tridimensional, o folículo se localiza no interior do substrato, ou seja, está completamente envolto por ele, portanto, o crescimento do oócito e a proliferação das células da granulosa ocorre de forma radial, iniciando no centro do folículo. Os substratos mais usados nesse sistema são o colágeno do tipo I, o ágar (FIGUEIREDO et al., 2008) e, recentemente, o polissacarídeo biocompatível conhecido como hidrogel de alginato (BRITO et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Silva et al. (2013) testaram a influência dos sistemas de cultivo *in vitro* bi e tridimensional com alginato, no desenvolvimento de FOPA caprinos e, afirmaram que os dois sistemas foram eficientes em promover oócitos competentes após maturação *in vitro* e, posteriormente, produção de embriões viáveis através de fertilização *in vitro*.

2.7.3 Importância da Composição do Meio sobre o Desenvolvimento Folicular *in vitro*

A composição do meio é o principal fator para o sucesso durante o cultivo de FOPA *in vitro* (ANDRADE et al., 2012; ROSSETTO et al., 2013b). Na maioria das espécies, o cultivo de FOPA tem sido realizado em meios já previamente definidos após testes experimentais, adicionando substâncias em diversas concentrações no intuito de encontrar o melhor meio para promover o desenvolvimento e manter a viabilidade folicular. Como exemplos podem-se citar o meio essencial mínimo (MEM) (MARTINS et al., 2010), meio Waymouth (BOLAMBA et al., 2002), Meio 199 (M199) (CASTRO et al., 2014) ou meio McCOY (CASTRO et al., 2014; DULEBA et al., 2001) suplementados com outras substâncias enriquecedoras. Castro et al. (2014), detectou que o meio M199 foi eficaz no cultivo de fragmentos de tecido ovariano bovino frescos, porém se forem vitrificados e posteriormente destinados ao CIV, estes devem ser cultivados no meio McCoy para manter sua viabilidade.

O MEM tem sido utilizado no cultivo de várias espécies como bovinos (ANDRADE et al., 2012), caprinos (SILVA et al., 2004b, 2004c), murinos (ZHAO et al., 2001) e até mesmo em equinos (HAAG et al., 2013).

Alguns compostos formam a base da maioria dos meios disponíveis, sendo alguns deles: solução salina, antibióticos, tampões, como o bicarbonato e diversos

substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, monossacarídeos, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucléicos, entre outras). Também podem ser adicionados à esses meios fontes proteicas como o soro de vaca em estro, soro fetal bovino, soro de macho castrado, albumina sérica bovina (BSA), soro de cabra em estro (BRUNO et al., 2006), alguns hormônios como o FSH (DUARTE et al., 2013; NÓBREGA JUNIOR et al., 2014), o LH, hormônio do crescimento (GH) (MARTINS et al., 2014), hormônio antimülleriano (AMH) (DURLINGER et al., 2002; ROCHA et al., 2013a), andrógenos e estradiol-17 β ; além de peptídeos como o peptídeo intestinal vasoativo (BRUNO et al., 2010) e antioxidantes como o alfa tocoferol (LIMA-VERDE et al., 2009), o ácido ascórbico (ANDRADE et al., 2012) e o ácido alfa lipoico (TALEBI et al., 2012).

Alguns fatores estimulatórios que também têm sido utilizados nos meios de cultivo em variadas concentrações para a ativação dos folículos primordiais são: “kit ligand” (FAUSTINO et al., 2013; PARROTT; SKINNER, 1999), GDF-9, FGF2 (NILSSON; PARROT, SKINNER, 2001), fator de crescimento de queratinócito (KGF) (NILSSON; SKINNER, 2003), proteína morfogenética óssea-4 (BMP-4) (TANWAR; O’SHEA; McFARLANE, 2008), fator de crescimento neural (NGF) (DISSEN et al., 2001), esfingosina 1-phosphato (SIP) (NÓBREGA JUNIOR et al., 2014), fator inibitório da leucemia (LIF) (NÓBREGA JUNIOR et al., 2012), fator de transformação do crescimento (TGF) (RODRIGUES et al., 2014), fator de crescimento insulínico (IGF-I e II) (DUARTE et al., 2013; ZHAO et al., 2001), melatonina (ROCHA et al., 2013b) e fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) (ARAÚJO et al., 2013), fator de crescimento epidermal (EGF) (CELESTINO et al., 2009).

Contudo, independente do meio, para que o cultivo seja bem sucedido, a osmolaridade e o pH devem estar entre 280 e 310 mOsm/L e 7,2 e 7,4, respectivamente. Ainda assim, a duração do cultivo depende do objetivo experimental, e pode variar de 1 a 36 dias dependendo da espécie (FIGUEREDO et al., 2008; PESSOA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; THOMAS et al., 2001).

2.7.3.1 Fator de crescimento epidermal (EGF)

O fator de crescimento epidermal é considerado um polipeptídeo pertence uma grande família composta por diversas substâncias (TGF- α , HB-EGF, anfiregulina (AREG), betacelulina (BTC) e epiregulina (EREG)) que atuam sobre o desenvolvimento folicular e possuem função mitogênica em diferentes tipos celulares

(SOFI et al., 2011; TOYODA et al., 2007; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

O EGF possui papel importante na foliculogênese ovariana, proporcionando a regulação de diversos processos, incluindo a ativação de folículos primordiais, proliferação de células da granulosa, redução da taxa de atresia e manutenção da viabilidade folicular (ANDRADE et al., 2005; CELESTINO et al., 2009; DEMEESTERE et al., 2005; MAO et al., 2004; SILVA et al., 2010). Estudos mostraram que o EGF induz o aumento do diâmetro de folículos pré-antrais bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), reduz os níveis de atresia em FOPA bovinos cultivados *in vitro*, promove o desenvolvimento de folículos primordiais ovinos e mantém a viabilidade por até 6 dias de cultivo (ANDRADE et al., 2005; HEMAMALINI et al., 2003).

Quando adicionado ao meio de cultivo de folículos pré-antrais suínos na concentração de 10ng/mL o EGF inibiu a apoptose das células da granulosa e levou a um aumento da formação de antro (MAO et al., 2004). Em caprinos, o EGF (50 ng/mL) estimulou a viabilidade oocitária (ZHOU; ZHANG, 2005) e na concentração de 100 ng/mL, beneficiou o crescimento de oócitos de folículos primários (SILVA et al., 2004b). Em caprinos a utilização do EGF (1 e 10 ng/mL) durante 7 dias de cultivo de FOPA foi capaz de aumentar o percentual de folículos primários e a manter a viabilidade folicular (CELESTINO et al., 2009).

Na espécie equina não há trabalhos sobre a adição do EGF ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA. No entanto, como citado anteriormente o uso deste fator de crescimento adicionado ao meio de CIV já foi testado com sucesso em outras espécies.

2.7.3.2 Hormônio folículo estimulante (FSH)

O hormônio folículo estimulante (FSH) é uma glicoproteína heterodímera que possui uma subunidade α em comum e uma subunidade β hormônio específica, e é sintetizado e secretado pelas células gonadotróficas, na hipófise anterior (BROWN; MCNEILLY, 1999).

Sabe-se que o FSH atua indiretamente nos folículos primordiais induzindo a liberação de fatores de crescimento pelos grandes folículos antrais e células do estroma, promovendo a proliferação de células da granulosa, aumentando a expressão de fatores parácrinos como o Fator de 34 Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e a ativina (JOYCE et al., 1999; THOMAS et al., 2005; VAN DEN

HURK; ZHAO, 2005). No entanto, estudos recentes na espécie caprina e ovina demonstram a presença de receptores para o FSH em oócitos de folículos primordiais, mostrando um efeito direto deste hormônio nesta fase folicular (ALMEIDA et al., 2015; PATEL et al., 2013).

Em folículos de camundongas o FSH regula a expressão do Kit Ligand (KL), do Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e da Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15) (JOYCE et al., 1999, THOMAS et al., 2005). Estes fatores mostraram ser importantes na ativação de folículos primordiais e posteriormente no crescimento de folículos primários e secundários (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Estudos demonstram que a adição do FSH (50 ng/mL) ao meio de cultivo de folículos pre-antrais caprinos foi capaz de manter a integridade ultraestrutural e promover o crescimento dos mesmos (ALMEIDA et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2009; MATOS et al., 2007).

Cabe ressaltar que na espécie equina há uma escassez de informações a respeito do meio ideal de cultivo *in vitro* de FOPA inclusos em fragmentos ovarianos. Desta maneira, é de suma importância a realização de mais pesquisas, incluindo a adição de hormônios e fatores de crescimento no meio de cultivo *in vitro* de FOPA, no intuito de elucidar o melhor meio e os suplementos que possam promover a ativação, desenvolvimento e manter a viabilidade dos FOPA.

3 HIPÓTESES

- A adição do fator de crescimento epidermal (EGF) ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos por 2 dias promove o desenvolvimento e mantém a integridade folicular.

- A adição do hormônio folículo estimulante (FSH) ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos por 2 ou 6 dias promove o desenvolvimento e mantém a integridade folicular.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição do EGF ou do FSH em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento e integridade de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos cultivados *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, por histologia clássica, o efeito do fator de crescimento epidermal (EGF) adicionado em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 ng/mL) ao Meio Essencial Mínimo suplementado (MEM⁺) cultivados *in vitro* por 2 dias, sobre o desenvolvimento e integridade de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos;
- Avaliar, por histologia clássica, o efeito do hormônio folículo estimulante (FSH) adicionado em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 ng/mL) ao Meio Essencial Mínimo suplementado (MEM⁺) cultivados *in vitro* por 2 ou 6 dias, sobre o desenvolvimento e integridade de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos;

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1

Suplementação de EGF no cultivo *in vitro* para promover o desenvolvimento e manter a integridade de folículos pré-antrais equinos

ARTIGO 2

Incremento no desenvolvimento e manutenção da integridade de folículos pré-antrais equinos por 6 dias de cultivo *in vitro* com suplementação de FSH

5.1 ARTIGO

Suplementação de EGF no cultivo *in vitro* para promover o desenvolvimento e manter a integridade de folículos pré-antrais equinos

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do fator de crescimento epidermal (EGF) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina. Ovários (n=5) provenientes de abatedouro local de éguas em anestro estacional foram coletados, lavados em álcool 70% e PBS e transportados até o laboratório. A porção interna do ovário foi dividida em 06 fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm. Um fragmento de cada ovário foi imediatamente fixado em Bouin (grupo controle, D0). Os outros 05 fragmentos foram cultivados individualmente por 2 dias. O meio foi suplementado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL). Após o término do cultivo os fragmentos foram fixados em Bouin e processados para histologia clássica. Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordiais ou em desenvolvimento) e morfologia (íntegros ou degenerados). Foram avaliadas 450 lâminas contendo 1.800 cortes histológicos. O modelo estatístico utilizado foi Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). Aos dois dias de cultivo houve uma maior proporção de folículos íntegros na concentração de 100 e 200 ng/mL EGF. Quanto ao desenvolvimento folicular as melhores concentrações de EGF foram as de 10, 100 e 200 ng/mL. Portanto, sugerimos que o EGF promove desenvolvimento e mantém a integridade folicular na espécie equina nas concentrações de 100 ou 200 ng/mL no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos por dois dias.

Palavras-chave: Ovário. Égua. Folículos ovariano. Fator de crescimento. Cultivo *in situ*.

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effects of different Epidermal Growth Factor (EGF) concentrations in the *in vitro* preantral follicles culture in the equine species. Ovaries (n=5) from a local slaughterhouse of mares in seasonal anestrus were collected, washed in 70% alcohol and PBS and transported to the laboratory. The inner portion of the ovary was divided into 06 fragments of about 3x3x1 mm. A fragment of each ovary was immediately fixed in Bouin (control group, D0). The remaining 05 fragments were individually cultured for 2 days. The medium was supplemented with different concentrations of EGF (10, 50, 100 and 200 ng/mL). After the cultivation, the fragments were fixed in Bouin and processed for classic histology. Follicles were classified according to the developmental stage (primary or developing) and morphology (intact or degenerated). 450 slides containing 1,800 tissue sections were evaluated. The statistical model used was Fisher's Exact Test ($p < 0.05$). Within two days of culture there was a higher proportion of intact follicles at the concentration of 100 and 200 ng/mL EGF. With respect to follicular development the concentrations 10, 100 and 200 ng/mL showed the best results. Therefore, we suggest that EGF promotes development and maintain follicular integrity in the equine species at concentrations of 100 or 200 ng/mL in *in situ* cultivation for two days.

Keywords: Ovaries. Mare. Ovarian follicles. Growth factor. *In situ* cultivation.

Introdução

As biotécnicas associadas à reprodução apresentaram crescimento ascendente nos últimos anos, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos diretamente aplicados. Dentre essas, o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais propõe investigações quanto aos fatores relacionados ao desenvolvimento e atresia folicular. Uma vez otimizado, este sistema ainda permitiria a ovulação *in vitro* e a produção de embriões a partir dos oócitos inclusos em folículos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 2008).

Visando incrementar o crescimento folicular e inibir da atresia, diversas substâncias são adicionadas ao meio de cultivo *in vitro*, dentre os quais, o fator de crescimento epidermal (EGF) demonstrou resultados relevantes sobre a sobrevivência e crescimento folicular na espécie caprina (CELESTINO et al., 2011; SILVA et al., 2010).

O EGF possui papel importante na foliculogênese ovariana, proporcionando a regulação de diversos processos, incluindo a ativação de folículos primordiais, proliferação de células da granulosa, redução da taxa de atresia e manutenção da viabilidade folicular (CELESTINO et al., 2009; DEMEESTERE et al., 2005; SILVA et al., 2010). Na espécie bovina este fator promoveu o aumento do diâmetro folicular (GUTIERREZ et al., 2000), e em porcas inibiu a apoptose das células da granulosa e levou a formação do antro folicular (MAO et al., 2004). Na espécie caprina, Celestino et al. (2011) descreveram-no como um importante regulador da fisiologia ovariana, proporcionando a regulação de diversos processos, incluindo a ativação folicular. Contudo, não há estudos que incluam o EGF no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina.

O objetivo deste estudo propõe que o EGF adicionado ao meio de cultivo *in situ* atue sobre o desenvolvimento e integridade de folículos pré-antrais equinos.

Material e Métodos

Coleta dos Ovários

Foram coletados 5 ovários (n=5) de cinco éguas em anestro estacional, provenientes de abatedouro localizado a aproximadamente 40 km do laboratório. No abatedouro, os ovários foram lavados com álcool 70%, seguido por uma lavagem com PBS. Cada ovário foi cuidadosamente dissecado com bisturi, e os tecidos adiposo e

conjuntivo foram removidos. Os ovários foram seccionados no plano sagital, e aqueles que continham CL ou folículos antrais em abundância foram descartados. A porção do parênquima (interno) dos cinco ovários selecionados foram cortados em 06 fragmentos de cerca de 3x3x1 mm. Um fragmento de cada ovário foi aleatoriamente selecionado e foi imediatamente fixado em Bouin para análise histológica (grupo controle; Dia 0). Seguindo o protocolo de Gomes et al. (2012), todos os outros fragmentos foram imediatamente colocados em PBS suplementado com penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 mg/mL); em seguida os fragmentos foram mantidos a 4° C durante 1 hora (período de transporte para o laboratório).

Protocolo Experimental

No laboratório, os fragmentos de ovários de cada animal foram cultivados em placas de cultura de 24 poços contendo o meio base (1 mL/poço; controle) ou o meio base suplementado com EGF (1 mL/poço). O meio base utilizado foi o meio essencial mínimo (MEM; pH 7,2-7,4) suplementado com penicilina (200 UI/mL), estreptomicina (200 mg/mL), BSA (1,25 mg/mL), hipoxantina (2 mM), glutamina (2 mM), piruvato (0,23 mM), insulina (6,25 mg/mL), transferrina (6,25 mg/mL), e selênio (6,25 mg/mL); este meio será referido como MEM+.

O meio essencial mínimo foi suplementado com 10, 50, 100, ou 200 ng/mL de EGF. O cultivo *in vitro* foi realizado a 39° C numa atmosfera de 5% de CO₂ em ar por um período de 2 dias. Cada tratamento foi repetido cinco vezes usando os dez fragmentos ovarianos de cada égua. O meio de cultura (MEM; número do produto, M 7278; ZHAO et al., 2001; SILVA et al., 2004; HAAG et al., 2013), EGF, e outros produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

No final do período de cultivo, os fragmentos ovarianos foram avaliados por histologia clássica. Todas as amostras foram fixadas em Bouin durante 24 horas, desidratados em etanol, diafinizadas em xilol, embebidas em parafina, cortados sequencialmente na espessura de 5 µm, para montagem de lâminas com albumina. A coloração foi realizada com a ácido periódico de Schiff.

Os folículos foram classificados de acordo com os seguintes estágios de desenvolvimento: (1) folículos primordiais (oócito rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas); (2) folículos em desenvolvimento compostos de folículos

primários (oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cubóide) e folículos secundários (o oócito é rodeado por mais do que uma camada completa de células da granulosa cubóides); ou (3) folículos antrais (um oócito com várias camadas de células da granulosa e um antro). O início do crescimento folicular foi avaliado através da quantificação dos folículos primordiais e em desenvolvimento no grupo controle e então feita a comparação com a contagem dos demais tratamentos.

Os folículos também foram classificados como íntegros ou degenerados de acordo com a morfologia do oócito e as células da granulosa. Assim foi determinada a taxa de degeneração folicular no grupo controle e em cada grupo cultivado. Os folículos foram classificados como morfológicamente íntegros, quando apresentavam oócitos intactos e as células da granulosa organizadas em camadas sem núcleos picnóticos. Folículos degenerados foram definidos como folículos contendo um oócito com núcleo picnótico e/ou um oócito rodeado por células da granulosa desorganizadas que se destacaram da membrana com citoplasma retraído (ANDRADE et al., 2012; HAAG et al., 2013).

Análise Estatística

As proporções de folículos primordiais e em desenvolvimento para cada tratamento (Controle, MEM, EGF 10, EGF 50, EGF 100 e EGF 200) por dois dias de cultivo foram comparados. Cada variável foi analisada quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O modelo estatístico foi não paramétrico empregando o Teste Exato de Fisher para comparar as percentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento entre os grupos controle, MEM e as diferentes concentrações de EGF. O nível de significância para rejeitar a hipótese nula foi $p \leq 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada no programa estatístico Minitab® 16.1.1.

Resultados

Neste experimento, foram avaliadas 450 lâminas, contendo 1.800 cortes histológicos de 30 fragmentos ovarianos que foram obtidos a partir de cinco éguas. Os folículos encontrados estavam presentes em apenas 4,2% (76 de 1.800) dos fragmentos avaliados. Houve ausência de folículos em 95,8% dos cortes histológicos (1.724 de 1.800). Dos 220 folículos avaliados, 50% eram folículos primordiais, 50% estavam em desenvolvimento, sendo 51,36 % íntegros.

O grupo controle apresentou 83,17% de folículos primordiais e destes 87,1% eram considerados íntegros.

Por dois dias de cultivo, as concentrações de 100 e 200 ng/mL de EGF proporcionaram melhores taxas de integridade folicular em comparação com os demais tratamentos (Tabela 1). Ao avaliar a porcentagem de folículos em desenvolvimento os melhores resultados foram nos fragmentos cultivados apenas em MEM e nos tratamentos com 10, 100 e 200 ng/mL de EGF (Tabela 2). Quando avaliamos os tratamentos que foram capazes de promover ambos desenvolvimento e integridade folicular, a concentração de 200 ng/mL de EGF foi a que apresentou resultado superior (Tabela 3).

Tabela 1 – Porcentagem total de folículos íntegros e degenerados avaliados durante 2 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL).

Tratamentos	Folículos Íntegros	Folículos Degenerados
	% (n/n)	% (n/n)
Controle	61,4 ^{a, A} (62/101)	38,6 ^{b, B} (39/101)
MEM	31,0 ^{b, B} (9/29)	69,0 ^{a, A} (20/29)
EGF 10	26,7 ^{b, B} (4/15)	73,3 ^{a, A} (11/15)
EGF 50	20,7 ^{b, B} (6/29)	79,3 ^{a, A} (23/29)
EGF 100	87,5 ^{a, A} (7/8)	12,5 ^{b, B} (1/8)
EGF 200	65,8 ^{a, A} (25/38)	34,2 ^{b, B} (13/38)

Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b) e dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos (controle, MEM, EGF 10, EGF 50, EGF 100 e EGF 200).

Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B) e dentro de uma mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre a proporção de folículos Normais e Degenerados.

Tabela 2 – Porcentagem total de folículos primordiais e em desenvolvimento, avaliados durante 2 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL).

Tratamentos	Folículos Totais	
	Primordiais % (n/n)	Desenvolvimento % (n/n)
Controle	83.17 ^{a, A} (84/101)	16.83 ^{d, B} (17/101)
MEM	27.59 ^{c, B} (8/29)	72.41 ^{b, A} (21/29)
EGF 10	0.00 (0/15)	100.00 ^a (15/15)
EGF 50	55.17 ^{b, A} (16/29)	44.83 ^{c, A} (13/29)
EGF 100	0.00 (0/8)	100.00 ^a (8/8)
EGF 200	5.26 ^{d, B} (2/38)	94.74 ^{a, A} (36/38)

Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c, d) e dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos (controle, MEM, EGF 10, EGF 50, EGF 100 e EGF 200).

Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B) e dentro de uma mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre a proporção de folículos Primordiais e em Desenvolvimento.

Tabela 3 – Porcentagem de folículos íntegros, primordiais e em desenvolvimento, avaliados durante 2 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL).

Tratamentos	Folículos Íntegros	
	Folículos Primordiais % (n/n)	Folículos em Desenvolvimento % (n/n)
Controle	87,1 ^{a, A} (54/62)	12,9 ^{c, B} (8/62)
MEM	33,3 ^{b, A} (3/9)	66,7 ^{b, A} (6/9)
EGF 10	0,0 (0/4)	100,0 ^{ab, A} (4/4)
EGF 50	33,3 ^{b, A} (2/6)	66,7 ^{b, A} (4/6)
EGF 100	0,0 (0/7)	100 ^{ab, A} (7/7)
EGF 200	4,0 ^{c, B} (1/25)	96,0 ^{a, A} (24/25)

Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b, c) e dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos (controle, MEM, EGF 10, EGF 50, EGF 100 e EGF 200).

Valores seguidos de letras maiúsculas sobrescritas (A, B) e dentro de uma mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre a proporção de folículos Primordiais e em Desenvolvimento.

Discussão

Neste estudo a adição 100 e 200 ng/mL de EGF durante dois dias no meio de cultivo *in vitro* demonstrou efeitos benéficos tanto para o desenvolvimento quanto para integridade dos folículos pré-antrais equinos. Cabe ressaltar que este consiste no primeiro trabalho com a adição do EGF no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos.

Os fatores de crescimento estão envolvidos na regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (SAHA et al., 2000). Já foi demonstrado que o EGF é essencial para o crescimento de FOPA cultivados *in vitro* em ovinos (HEMAMALINI et al., 2003), roedores (DEMEESTERE et al., 2005), caprinos (RAJARAJAN et al., 2006) e búfalos (GUPTA et al., 2008).

O cultivo *in vitro* com suplementação de EGF foi estudado em suínos, caprinos e ovinos. Dentre estas espécies, o EGF na concentração de 10ng/mL adicionado ao meio de cultivo de folículos pré-antrais suínos, inibiu a apoptose das células da granulosa e proporcionou aumento da formação do antro (MAO et al., 2004). Em caprinos, o EGF (50 ng/mL) manteve a viabilidade oocitária (ZHOU; ZHANG, 2005) e na concentração de 100 ng/mL, beneficiou o crescimento de oócitos dos folículos primários (SILVA et al., 2004).

Semelhante à espécie caprina, estudos com folículos ovarianos ovinos suplementados com 50 ng/mL de EGF ao meio de cultivo proporcionou a formação da cavidade antral, altas taxas de crescimento folicular e aumento na proporção de folículos morfológicamente íntegros (SILVA et al., 2013; DA PAZ SANTOS et al., 2014). Ainda para esta espécie, o cultivo com MEM ou TCM-199 adicionado de EGF (10 ng/mL) possibilitou o aumento do diâmetro oocitário durante o crescimento folicular (ANDRADE et al., 2014).

Nosso estudo corrobora com Silva et al. (2004), pois a concentração 100 ng/mL de EGF proporcionou bons resultados sobre a integridade e desenvolvimento folicular na espécie caprina. No entanto a concentração de 50 ng/mL não repercutiu efeitos benéficos significativos, diferentemente do que foi comprovado para espécie suína e ovina. Observamos também que a concentração de 10 ng/mL de EGF foi capaz de promover o desenvolvimento folicular, no entanto não manteve a integridade dos mesmos. Fato também observado com o grupo cultivado apenas no MEM.

Na concentração de 200 ng/mL de EGF, constatamos resultados positivos tanto sobre o desenvolvimento quanto à integridade (Tabela 3) para o cultivo *in vitro* por dois dias de folículos pré-antrais equinos. No entanto, desconhecemos o uso desta concentração para o cultivo *in vitro* de FOPA nas demais espécies, o que pode sugerir que na espécie equina exista uma maior demanda de EGF na fase inicial do desenvolvimento folicular.

Em equinos ainda são escassos os trabalhos com a adição de substâncias no meio de cultivo *in vitro*. Neste contexto o único estudo disponível é com a adição do ácido ascórbico ao meio de cultivo *in vitro* (GOMES et al., 2015), o que dificulta a comparação de nossos dados com outros experimentos na mesma espécie.

A técnica de MOIFOPA em equinos apresenta entraves importantes diante da restrição na obtenção de ovários provenientes de abatedouros, o que dificulta o acesso desse material para pesquisa. Assim, informações referentes à distribuição espacial dos folículos ovarianos equinos são limitadas, situação distinta das espécies de produção. Recentemente, os estudos disponíveis utilizaram a biópsia ovariana de éguas *in vivo* para obtenção de pequenos fragmentos (HAAG et al., 2013), além de ovários provenientes de abatedouro (GOMES et al., 2015). Tais recursos mostraram-se eficientes para o estudo da foliculogênese nesta espécie.

No presente trabalho notou-se uma variação quantitativa dos folículos pré-antrais encontrados em cada tratamento. Tal fato também foi relatado por outros autores, os quais relataram diferenças significativas na população folicular pré-antral em éguas (DRIANCOURT et al., 1982, ALVES et al., 2015, GOMES et al., 2015). Isto pode ser explicado devido a população folicular na espécie equina (35.590) (DRIANCOURT et al., 1982) ser significativamente menor que da espécie bovina (130.000) (ERICKSON, 1966).

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina encontra-se em progresso e necessita de investigações consistentes em relação a localização da reserva folicular, estudos sobre substâncias antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento adicionados no meio. Nossos resultados com EGF no cultivo *in vitro* contribui na busca do meio ideal para desenvolvimento folicular nesta espécie.

Conclusão

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais equinos realizado durante 2 dias em MEM suplementado com 100 ou 200 ng/mL de EGF estimulou o desenvolvimento e manteve a integridade folicular.

Referências

ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F.; GASTAL, M. O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in diferente ovarian histological section thicknesses *Theriogenology*, Los Altos, v. 83, n. 6, 1048-1055, 2015.

ANDRADE, E. R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L. A.; HERTEL, M. F.; MELO STERZA, F. A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A. P.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral Follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 379-388, 2012.

ANDRADE, P. M.; CHAVES, R. N.; ALVES, A. M. C. V.; ROCHA, R. M. P.; LIMA, L. F.; CARVALHO, A. A.; RODRIGUES, A. P. R.; CAMPELLO, C. C.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of α -MEM and TCM-199 culture media and epidermal growth factor on survival and growth of goat and sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 11, n. 4, p. 567-572, 2014.

CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured *In Vitro*. *Reproductive Sciences*, Thousand Oaks, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009.

CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V.; ROCHA, R. M.; BRITO, I. R.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cell and Tissue Research*, Berlin, v. 344, n. 3, p. 539-550, 2011.

DA PAZ SANTOS, L.; BARROS, V. R. P.; CAVALCANTE, A. Y. P.; ARAÚJO, V. R.; MATOS, M. H. T. Effects of epidermal growth factor on *in vitro* survival and antrum formation of isolated ovine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, Melbourne, v. 26, n. 1, p. 173-173, 2014.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, Cambridge, v. 130, n.2, p. 147-156, 2005.

DRIANCOURT, M. A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J. C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reproduction, Nutrition, Development*, Paris, v. 22, n. 6, p. 1035-1047, 1982.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966.

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.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 227-327.

GOMES, R. G.; LISBOA, L. A.; SILVA, C. B.; MAX, M. C.; MARINO, P. C.; OLIVEIRA, R. L.; GONZALEZ, S. M.; SANTOS, M. M.; BARREIROS, T. R.; MARINHO, L. S.; SENEDA, M. M. Improvement of development of equine preantral follicles after six days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation, *Theriogenology*, Los Altos, v. 84, n. 5, p. 750-755, 2015.

GUPTA, P. S.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2008.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, New York, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.

HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology*, Los Altos, v. 79, n. 6, p. 911-917, 2013.

HEMAMALINI, N. C.; RAO, B. S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; NAIDU, K. S.; REDDY, K. K.; RAO, V. H. Influence of transforming growth factor- α , insulinlike growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 11-22, 2003

MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of epidermal growth factor and insulin like growth factor 1 on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, 2004.

RAJARAJAN, K.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; RAO, V. H. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 63, p. 204-212, 2006.

SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, G. Q.; BRITO, I. R.; ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V. A.; CAMPELLO, C. C.; LOBO, C. H.; SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated

goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. *Research in Veterinary Science*. Oxford, v. 94, n. 3, p. 453–461, 2013.

SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na função ovariana e desenvolvimento embrionário. *Acta Veterinaria Brasilica*, Mossoró, v. 4, n. 4, p. 215-226, 2010.

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*, Los Altos, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 90, n. 3-4, p. 265-272, 2005.

5.2 ARTIGO 2

Incremento no desenvolvimento e manutenção da integridade de folículos pré-antrais equinos por 6 dias de cultivo *in vitro* com suplementação de FSH

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) no meio essencial mínimo suplementado (MEM+) no desenvolvimento de folículos pré-antrais equinos cultivados *in vitro* durante 2 ou 6 dias. Os ovários (n=5) de éguas em anestro sazonal foram coletados em abatedouro local. Onze fragmentos de tecido ovariano com aproximadamente 3x3x1 mm foram obtidos a partir de cada animal. Um fragmento foi imediatamente fixado e processado para análise histológica (grupo de controle; Dia 0), e o restante dos fragmentos foram colocados em PBS suplementado com penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 mg/mL) a 4° C durante 1 hora (período de transporte até o laboratório). Os fragmentos foram cultivados *in situ* durante 2 dias (D2) ou 6 dias (D6) em MEM+ ou MEM+ acrescido de quatro concentrações diferentes de FSH, criando os seguintes grupos: controle (D0); MEM+ (D2); MEM+ (D6); MEM+ 10 ng/mL FSH (D2); MEM+ 10 ng/mL de FSH (D6); MEM+ 50 ng/mL de FSH (D2); MEM+ 50 ng/mL de FSH (D6); MEM+ 100 ng/mL de FSH (D2); MEM+100 ng/mL de FSH (D6); MEM+ 200 ng/mL de FSH (D2); e MEM+ 200 ng/mL de FSH (D6). Após o cultivo os fragmentos foram fixados em Bouin e processados para histologia clássica. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com a fase de desenvolvimento (primordial, primário e secundário) e a sua morfologia (normal ou degenerado). O modelo estatístico utilizado foi Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$). As lâminas (n=1.187) com 4.018 secções foram avaliadas por microscopia óptica. Os folículos foram observados em apenas 9,65% (388 de 4.018) das secções histológicas. Dos 861 folículos avaliados, 488 eram primordiais e 373 estavam em desenvolvimento em diferentes estágios (primários e secundários), além disto, 59,7% eram morfologicamente normais. Após 2 dias de cultivo, os grupos cultivados com 200 ng/mL de FSH, tal como a concentração 10 ng/mL no cultivo por 6 dias apresentaram as melhores taxas de folículos em desenvolvimento comparando-os aos demais tratamentos. Em relação a integridade dos folículos pré-antrais equinos a concentração de 100 ng/mL no cultivo por 2 dias e as concentrações de 50, 100 e 200 ng/mL no cultivo por 6 dias mostraram resultados superiores em relação ao restante dos grupos. Com base no desenvolvimento folicular e a presença de folículos morfologicamente íntegros, pode-se concluir um efeito positivo da adição de FSH no cultivo *in vitro*, sendo que a concentração desta gonadotrofina varia aos 2 e 6 dias de cultivo.

Palavras-chave: Equino. FSH. Folículo pré-antral. Cultivo *in vitro*. Integridade folicular.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of follicle stimulating hormone (FSH; 10, 50, 100 e 200 mg/mL) in minimal essential medium supplemented (MEM +) in developing equine pre-antral follicles *in vitro*

cultured for 2 or 6 days. The mares ovaries (n=5) in seasonal anoestrus were collected from a local slaughterhouse. Ten ovarian tissue fragments of approximately 3x3x1 were obtained from each animal. One fragmente was immediately fixed and processed for histological analysis (control group; Day 0), and the remaining fragments were placed in PBS supplemented with penicillin (200 IU/mL) and streptomycin (200 mg/mL) at 4° C for 1 hour (transport time to the laboratory). The fragments were cultured in situ for 2 days (D2) or 6 days (D6) in MEM+ or MEM+ supplemented with four different concentrations of follicle stimulating hormone (FSH), which creates the following eleven groups: control (D0); MEM + (D2); MEM + (D6); MEM + 10 ng/mL of FSH (D2); MEM + 10 ng/mL of FSH (D6); MEM + 50 ng/mL of FSH (D2); MEM + 50 ng/mL of FSH (D6); MEM + 100 ng/mL of FSH (D2); MEM + 100 ng/mL of FSH (D6); MEM + 200 ng/mL of FSH (D2); and MEM + 200 ng/mL of FSH (D6). After the cultivation, the fragments were fixed in Bouin and processed for classic histology. The preantral follicles were classified according to the developmental stage (primordial, primary and secondary) and its morphology (normal or degenerated). The statistical model used was Fisher's Exact Test ($p < 0.05$). The blades (n = 1,187) with 4,018 histologic sections were evaluated. The follicles were observed in only 9.65% (388 of 4,018) of histological sections. Of the 861 evaluated follicles, 488 were primordial and 373 were under development at different stages (primary and secondary), moreover, 59.7% were morphologically normal. After 2 days of culture, cultured groups with 200 ng/mL of FSH, as the concentration of 10 ng/mL in cultured for 6 days showed the best follicles development rates compared to the other treatments. Regarding the integrity of preantral follicles equines, the concentration of 100 ng/mL in the culture for 2 days and concentratrions of 50, 100 and 200 ng/mL in the culture for 6 days showed superior results in relation to the rest of the group. Based on follicular development and the presence of morphologically intact follicles, it is concluded a positive effect with the addition of FSH in the in vitro culture, wherein the concentration of gonadotropin varies at 2 and 6 days of culture.

Keywords: Equine. FSH. Preantral follicles. In vitro culture. Follicular integrity.

Introdução

Na última década, a ampliação do mercado equino foi evidente tanto pelo número de animais como pela condição fenotípica de alto nível. Assim, progressivamente, animais de alto valor genético são requisitados para o comércio, demonstrando a importância da pesquisa aplicada a reprodução desses espécimes (GOMES; SENEDA, 2013).

O desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas depara-se com um entrave, a grande perda folicular, fato este que ocorre naturalmente na fisiologia das fêmeas mamíferas. Cerca de 99% dos folículos presentes no *pool* de reserva sofrem atresia folicular, na qual a maioria da população folicular não atinge a ovulação (IRELAND, 1987; HICKEY et al., 2005; HAAG et al., 2013). Para tanto, o cultivo *in vitro*

é uma biotécnica que possibilita a recuperação de folículos ovarianos pré-antrais e a maturação folicular *in vitro* (ANDRADE et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2011). Dentre as substâncias que visam melhorar o desenvolvimento e sobrevivência *in vitro* de folículos pré-antrais, destacam-se os hormônios Folículo Estimulante (FSH) (GUTIERREZ et al., 2000) e insulina (CHAVES et al., 2011); os fatores de crescimento GDF-9 (fator de diferenciação do crescimento-9) (MARTINS et al., 2008), proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) (CELESTINO et al., 2011b) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (CELESTINO et al., 2011a). Dentre estas substâncias o FSH possui papel notável durante a ativação folicular (BETTERIDGE et al., 1989).

O FSH possui receptores que estão dispostos de forma específica para atuarem em sincronia e promoverem a estimulação e/ou efeitos inibitórios (ALMEIDA et al., 2011). Já foi demonstrado que o FSH quando usado no cultivo *in vitro* de folículos pré antrais de várias espécies, mantém a viabilidade folicular além de promover o crescimento dos mesmos (BARROS et al., 2013; MATOS et al., 2007; SARAIVA et al., 2011).

Neste estudo foi avaliado o efeito da adição de distintas concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) no meio de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos da espécie equina.

Material e Métodos

Coleta dos ovários

Ovários (n=5) foram coletados a partir de cinco éguas em anestro sazonal, provenientes de abatedouro localizado a aproximadamente 40 km do laboratório. No abatedouro, os ovários foram lavados com álcool 70%, seguido por uma lavagem com PBS. Cada ovário foi cuidadosamente dissecado com bisturi, e os tecidos adiposo e conjuntivo foram removidos. Os ovários foram seccionados no plano sagital, e aqueles que continham CL ou folículos antrais em abundância foram descartados. A porção do parênquima (interno) dos cinco ovários selecionados foram cortados em fragmentos de cerca de 3x3x1 mm. Um fragmento de cada ovário foi aleatoriamente selecionado e imediatamente fixado em Bouin para análise histológica (grupo controle; Dia 0). Seguindo protocolo de Gomes et al. (2012), todos os outros fragmentos eram imediatamente colocados em PBS suplementado com penicilina (200 UI/mL) e

estreptomicina (200 mg/mL); em seguida os fragmentos foram mantidos a 4° C durante 1 hora (período de transporte para o laboratório).

Protocolo Experimental

No laboratório, os fragmentos ovarianos de cada animal foram cultivados em placas de cultivo de 24 poços contendo (1 mL/poço) o meio base ou o meio base suplementado com FSH. O meio base utilizado foi o meio essencial mínimo (MEM; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2-7,4) suplementado com penicilina (200 UI/mL), estreptomicina (200 mg/mL), BSA (1,25 mg/mL), hipoxantina (2 mM), glutamina (2 mM), piruvato (0,23 mM), insulina (6,25 mg/mL), transferrina (6,25 mg/mL), e selênio (6,25 mg/mL).

O meio essencial mínimo foi suplementado com 10, 50, 100, ou 200 ng/mL de FSH. O cultivo *in vitro* foi realizado a 39° C em atmosfera de 5% de CO₂ por 2 ou 6 dias. O meio foi trocado a cada dois dias. Cada tratamento foi repetido cinco vezes usando os dez fragmentos ovarianos de cada égua. O meio de cultivo (MEM; código do produto, M 7278) (HAAG et al., 2013; SILVA et al., 2004; ZHAO et al., 2001), FSH (Folltropin[®], Bioniche Canadá Inc, Ontário, Canadá), e outros produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

No final do período de cultivo, os fragmentos ovarianos foram processados e avaliados utilizando técnica de histologia clássica. Todas as amostras foram fixadas em Bouin durante 24 horas, desidratados em etanol, diafinizadas em xilol, embebidas em parafina, cortados sequencialmente na espessura de 5 µm, para montagem de lâminas (Gomes et al., 2012). A coloração foi realizada com a ácido periódico de Schiff.

Os folículos foram classificados de acordo com os seguintes estágios de desenvolvimento: (1) folículos primordiais (oócito rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas); (2) folículos em desenvolvimento compostos de folículos primários (oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa cubóide) e folículos secundários (oócito rodeado por mais do que uma camada completa de células da granulosa cubóides). Para avaliar a ativação e o crescimento de folículos primordiais nos diferentes estágios de desenvolvimento, a quantidade de folículos primordiais e folículos em crescimento foram determinados no grupo controle e em cada grupo de tratamento do cultivo *in vitro*.

Os folículos também foram classificados como normais ou degenerados de acordo com a morfologia do oócito e as células da granulosa em cada grupo cultivado. Folículos morfologicamente normais apresentavam oócitos intactos e as células da granulosa organizadas em camadas discretas sem núcleos picnóticos. Folículos degenerados foram definidos por conter um oócito com núcleo picnótico e/ou um oócito rodeado por células da granulosa desorganizadas que se destacaram da membrana com citoplasma retraído (ANDRADE et al., 2012; HAAG et al., 2013).

Análise Estatística

As proporções de folículos primordiais e em desenvolvimento para cada tratamento (Controle, MEM, FSH 10, FSH 50, FSH 100 e FSH 200) e em cada dia (D2 e D6) do experimento foram comparados. Cada variável foi analisada quanto à normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O modelo estatístico foi não paramétrico empregando o teste exato de Fisher para comparar as percentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento entre os grupos controle, MEM e as diferentes concentrações de FSH. O nível de significância para rejeitar a hipótese nula foi $p \leq 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada no programa estatístico Minitab® 16.1.1.

Resultados

Neste trabalho, foram avaliadas 1.187 lâminas, contendo 4.018 cortes histológicos, nos quais apenas 9,7% (388/4.018) apresentavam folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Houve ausência de folículos em 90,3% dos cortes histológicos (3.630/4.018). Dos 861 folículos avaliados, 488 (56,7%) eram folículos primordiais, 373 (43,7%) estavam em desenvolvimento, e 59,7% eram morfologicamente normais.

O grupo controle apresentou 86,77% de folículos primordiais e 13,23% em desenvolvimento, sendo que 70,8% foram classificados como íntegros.

O cultivo *in vitro* por 2 dias acrescido com FSH na concentração de 200 ng/mL, tal como a concentração 10 ng/mL no cultivo por 6 dias apresentaram as melhores taxas de folículos em desenvolvimento comparando-os aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Quanto a integridade dos folículos pré-antrais, a concentração de 100 ng/mL no cultivo por 2 dias e as concentrações de 50, 100 e 200 ng/mL no cultivo por 6 dias

mostraram resultados superiores em relação aos outros grupos ($p < 0,05$; Tabela 1, Figura 1, 2 e 3).

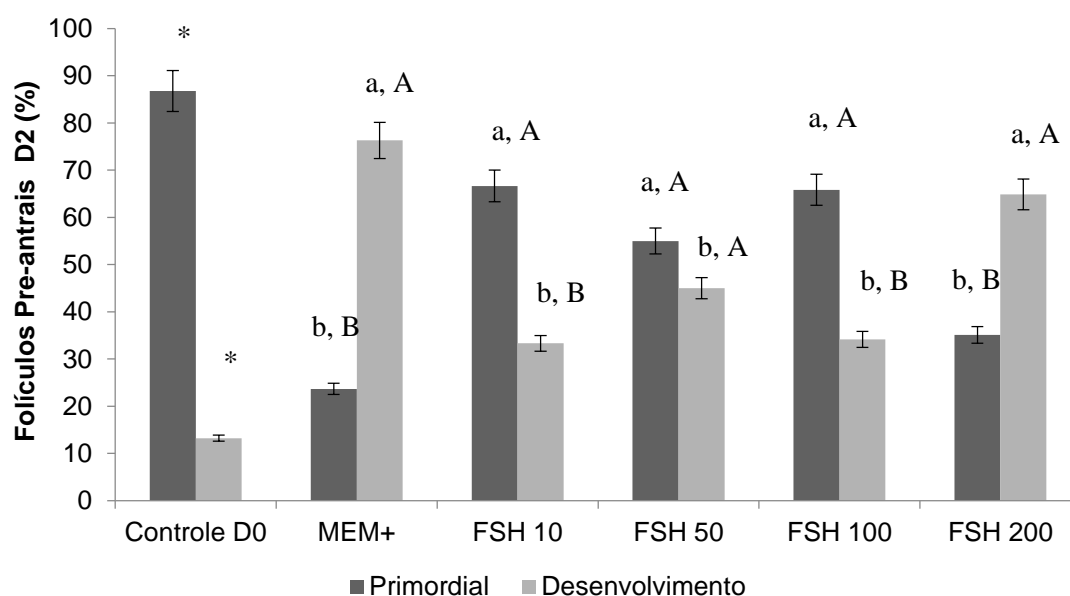
Tabela 1 - Número total e porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento durante 2 (D2) e 6 (D6) dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL).

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS TOTAIS				
CONTROLE (D0)	Folículos Primordiais n(%)		Folículos em Desenvolvimento n(%)	
	223/257 (86.77) ^{a, A}		34/257 (13.23) ^{d, E}	
	Primordiais n (%)	Desenvolvimento n (%)	Primordiais n (%)	Desenvolvimento n (%)
Período de cultivo	D2	D2	D6	D6
MEM ⁺	18/76 (23.7) ^{c, D}	58/76 (76.3) ^{a, B}	7/57(12.3) ^{c, E}	50/57(87.7) ^{a, A}
FSH 10	26/39 (66.7) ^{b, B}	13/39 (33.3) ^{b, D}	8/29(27.6) ^{c, D}	21/29(72.4) ^{ab, AC}
FSH 50	66/120 (55.0) ^{b, C}	54/120(45.0) ^{b, C}	5/12(41.7) ^{bc, BC}	7/12(58.3) ^{bc, B}
FSH 100	27/41(65.9) ^{b, B}	14/41(34.2) ^{b, D}	56/114(49.1) ^{b, B}	58/114(50.9) ^{c, B}
FSH 200	33/94 (35.1) ^{c, D}	61/94(64.9) ^{a, BC}	19/22(86.4) ^{a, A}	3/22(13.6) ^{d, E}

Fonte: Da Autora

Letras minúsculas diferem estatisticamente dentro da mesma coluna ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos de acordo com o dia de cultivo

Figura 1 - Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento totais durante 2 dias (D2) de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL).

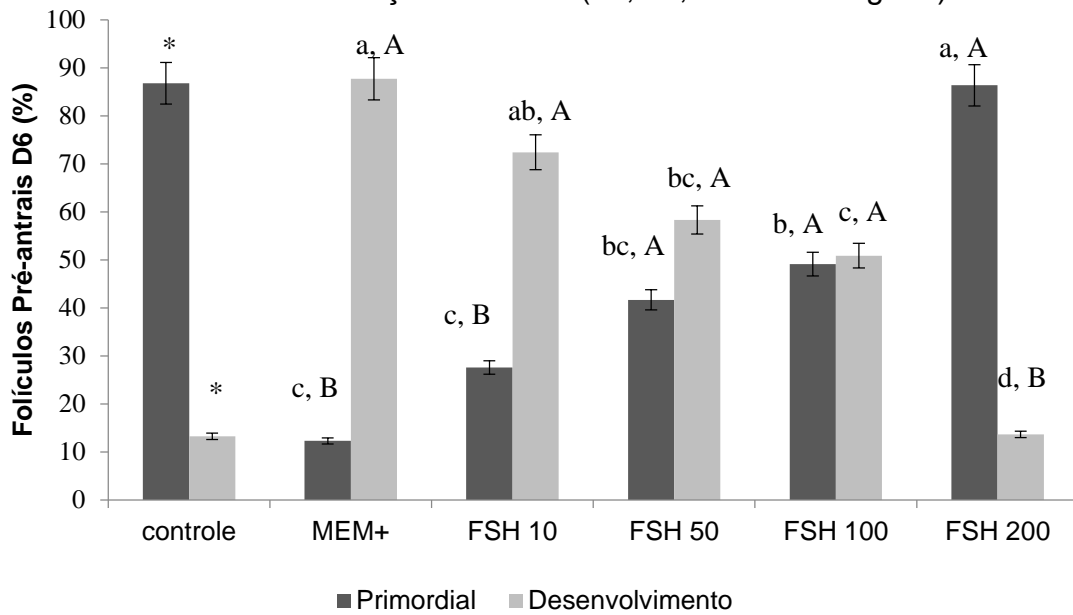


Fonte: Da Autora

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos (controle, MEM⁺, FSH 10, FSH50, FSH 100 e FSH 200) dentro da mesma cor.

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre folículos primordiais e em desenvolvimento dentro do mesmo tratamento. Colunas com (*) apresentaram diferença estatística com os demais tratamentos.

Figura 2 - Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento totais durante 6 dias (D6) de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL).

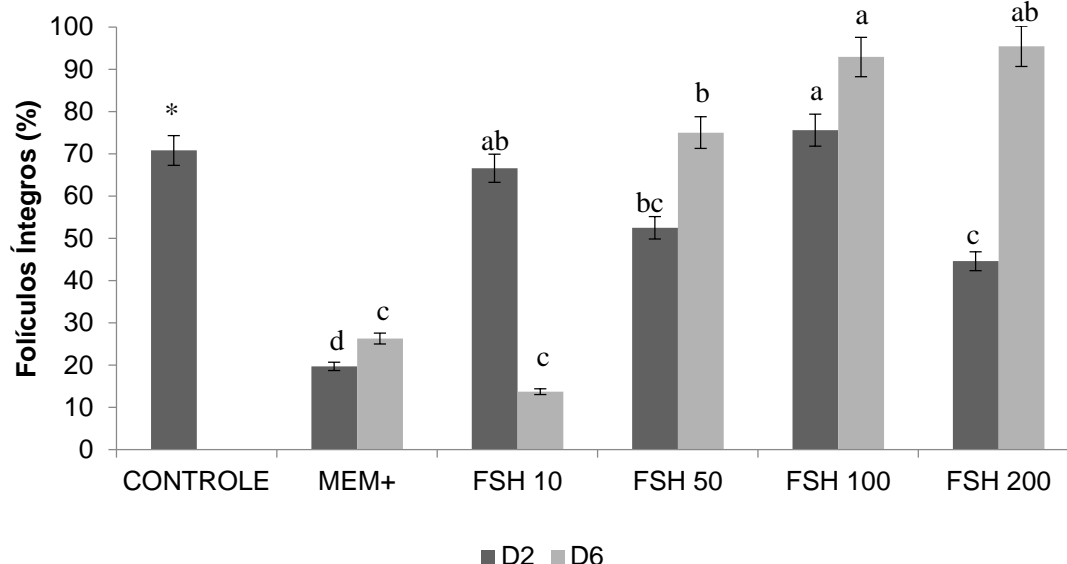


Fonte: Da Autora

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos (controle, MEM⁺, FSH 10, FSH50, FSH 100 e FSH 200) dentro da mesma cor.

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre folículos primordiais e em desenvolvimento dentro do mesmo tratamento. Colunas com (*) apresentaram diferença estatística com os demais tratamentos.

Figura 3 - Percentagem de folículos íntegros durante 2 (D2) e 6 (D6) dias (D6) de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) ou adicionado com diferentes concentrações de FSH (10, 50, 100 e 200 ng/mL)



Fonte: Da Autora

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b, c, d) diferem estatisticamente entre os tratamentos (controle, MEM⁺, FSH 10, FSH50, FSH 100 e FSH 200) dentro da mesma cor ($p < 0.05$). Colunas com (*) apresentaram diferença estatística com os demais tratamentos.

Discussão

Este estudo demonstrou que houve maior mobilização da reserva folicular ovariana equina com a adição de 200 ng/mL (D2) e 10 ng/mL (D6) de FSH no meio de cultivo. Tal fato foi também constatado por Magalhães et al. (2009), utilizando a concentração de 10 ng/mL no cultivo *in vitro* de folículos caprinos isolados.

As concentrações de 100 ng/mL (D2), 50 ng/mL (D6), 100 ng/mL (D6) e 200 ng/mL (D6) foram benéficas para a preservação da integridade folicular, constatando que nem todas as concentrações obtiveram efeitos favoráveis no cultivo *in vitro*.

Com relação ao desenvolvimento e integridade, Barros et al. (2013) obtiveram bons resultados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados utilizando a concentração de 100 ng/mL de FSH por 6 dias. Estudos similares foram realizados com a mesma espécie por Behl e Pandey (2002) e Costa et al. (2010) com a espécie ovina, em que as concentrações de 100 ng/mL e 200 ng/mL de FSH também possibilitaram o desenvolvimento e preservação da integridade folicular. Nosso estudo

corroborar com os relatos para as espécies caprina e ovina, pois nas concentrações citadas, o FSH obteve efeito benéfico para os folículos pré-antrais equinos.

Observamos que o controle cultivado (MEM⁺) por dois e seis dias também demonstraram eficiência em promover o desenvolvimento de FOPA *in vitro*. No entanto não foram capazes em manter a integridade dos folículos pré-antrais em desenvolvimento, demonstrando a necessidade da adição do FSH para promover melhores resultados.

O FSH atua indiretamente nos folículos primordiais induzindo a liberação de fatores de crescimento pelos grandes folículos antrais e células do estroma, promovendo a proliferação de células da granulosa, aumentando a expressão de fatores parácrinos como o Fator de 34 Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e a ativina (JOYCE et al., 1999; THOMAS et al., 2005; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). No entanto, estudos recentes na espécie caprina e ovina demonstram a presença de receptores para o FSH em oócitos de folículos primordiais, mostrando um efeito direto deste hormônio nesta fase folicular (ALMEIDA et al., 2015; PATEL et al., 2013).

Segundo Duarte et al. (2013) a adição de FSH ao meio de cultivo é essencial para promover a ativação dos folículos pré-antrais, além de atuar na manutenção da integridade folicular. Neste mesmo trabalho constataram que a adição de FSH concomitante ao fator de crescimento IGF-II beneficiou os folículos caprinos, mas sem o acréscimo desse hormônio, os resultados repercutiram no aumento da degeneração folicular. Em nosso estudo observamos que o FSH adicionado ao meio de cultivo *in vitro* promoveu aumento gradativo de folículos normais em desenvolvimento. Este resultado demonstra que o FSH é uma possível substância necessária no meio base de cultivo de folículos pré-antrais equinos.

Notamos também que por 2 dias de cultivo foi necessária uma alta concentração de FSH (200 ng/mL) para iniciar o desenvolvimento folicular. Isto pode sugerir que na fase inicial de ativação folicular o FSH atue em altas concentrações, pois com 6 dias de cultivo a melhor concentração foi a de 10 ng/mL, mostrando que a demanda por esta gonadodrofina pode ser menor em estágios de desenvolvimento folicular mais avançados.

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina é pouco estudado devido à restrição de abatedouros na maioria dos países, inviabilizando a obtenção de ovários para pesquisa. Há estudos com biópsia ovariana (HAAG et al., 2013) e com ovários de abatedouro para aprimoramento da técnica (GOMES et al., 2015). Em

razão das informações referentes aos folículos ovarianos equinos serem limitadas, constata-se uma dificuldade na comparação de nossos dados com maior número de trabalhos.

Notou-se neste trabalho uma discrepância quanto à quantidade de folículos encontrados em cada tratamento. É importante ressaltar que existe uma grande variação individual na população folicular pré-antral equina, apresentando distinções quanto ao número de folículos encontrados em relação às demais espécies (DRIANCOURT et al., 1982). Alves et al. (2015) sugerem que exista uma variação na distribuição folicular dentro do ovário, e ainda, a influência de genes reguladores controladores da sobrevivência, proliferação, colonização e inclusão de células germinativas primordiais. Este comportamento, também foi relatado por Gomes et al. (2015) em estudos com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos, no qual os tratamentos também não obtiveram homogeneidade quantitativa, corroborando com o encontrado neste estudo.

Conclusão

Conclui-se que as concentrações de 100 ng/mL de FSH por 2 dias e 50, 100 e 200 ng/mL de FSH por 6 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos foram eficientes em manter a integridade folicular. Com relação ao desenvolvimento folicular as concentrações de 200 ng/mL por 2 dias e 10ng/mL por 6 dias apresentaram os melhores resultados.

Referências

ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A.; ARAÚJO, V. R.; MAGALHÃES, D. M.; DUARTEA, A. B. G.; FROTA, I. M. A.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; J. R. V. SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 100, n. 2-3, p. 169-176, 2011.

ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F.; GASTAL, M. O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in diferente ovarian histological section thicknesses *Theriogenology*, Los Altos, v. 83, n. 6, 1048-1055, 2015.

ANDRADE, E. R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L. A.; HERTEL, M. F.; MELO STERZA, F. A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A. P.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral Follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 379-388, 2012.

BARROS, V. R.; CAVALCANTE, A. Y.; MACEDO, T. J.; BARBERINO, R. S.; LINS, T. L.; GOUVEIA, B. B.; MENEZES, V. G.; QUEIROZ, M. A.; ARAÚJO, V. R.; PALHETA JUNIOR, R. C.; LEITE, M. C.; MATOS, M. H. Immunolocalization of melatonin and follicle-stimulating hormone receptors in caprine ovaries and their effects during *in vitro* development of isolated pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 48, n. 6, p. 1025-1033, 2013.

BEHL, R., PANDEY, R. S. FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells in vitro. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 70, n. 3-4, p. 215-221, 2002.

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*, Oxford, v. 38, p. 87-98, 1989.

CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V.; ROCHA, R. M.; BRITO, I. R.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cell and Tissue Research*, Berlin, v. 344, n. 3, p. 539-550, 2011a.

CELESTINO, J. J.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdam, v. 338, n. 1-2, p. 1-9, 2011b.

CHAVES, R. N.; ALVES, A. M.; FAUSTINO, L. R.; OLIVEIRA, K. P.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell and Tissue Research*, Berlin, v. 346, n. 3, p. 451-456, 2011.

COSTA, S. H.; SANTOS, R. R.; RONDINA, D.; ANDRADE, E. R.; OHASHI, M. O.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of IAA in combination with FSH on *in vitro* culture of ovine preantral follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 89-92, 2010.

DRIANCOURT, M. A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J. C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reproduction, Nutrition, Développement*, Paris, v. 22, n. 6, p. 1035-1047, 1982.

DUARTE, A.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; SILVA, G. M.; LUZ, V. B.; HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ALMEIDA, A. P.; LOBO, C. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Insulin-like growth factor II (IGF-II) and follicle stimulating hormone (FSH) combinations can improve the *in vitro* development of grown oocytes enclosed

in caprine preantral follicles. *Growth Hormone & IGF Research*, London, v. 23, n. 1-2, p. 37-44, 2013.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.; SILVA, J. R.; SANTOS, R. R. Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles, *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, v. 23, n. 1, p. 40-47, 2011.

GOMES, R. G.; ANDRADE, E. R.; LISBOA, L. A.; CIQUINI, C.; BARREIROS, T. R.; FONSECA, N. A.; SENEDA, M. M. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*, Los Altos, v. 78, n. 4, p. 731-736, 2012.

GOMES, R. G.; LISBOA, L. A.; SILVA, C. B.; MAX, M. C.; MARINO, P. C.; OLIVEIRA, R. L.; GONZALEZ, S. M.; SANTOS, M. M.; BARREIROS, T. R.; MARINHO, L. S.; SENEDA, M. M. Improvement of development of equine preantral follicles after six days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation, *Theriogenology*, Los Altos, v. 84, n. 5, p. 750-755, 2015.

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*, New York, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.

HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology*, Los Altos, v. 79, n. 6, p. 911-917, 2013.

HICKEY, T. E.; MARROCCO, D. L.; AMATO, F.; RITTER, L. J.; NORMAN, R. J.; GILCHRIST, R. B.; ARMSTRONG, D. T. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, New York, v. 73, n. 4, p. 825-832, 2005.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility*, Oxford, v. 34, p. 39-54, 1987.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Developmental Biology*, New York, v. 214, n. 2, p. 342-353, 1999.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 171-182, 2009.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; MATOS, M. H.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, v. 20, n. 8, p. 916-924, 2008.

MATOS, M. H. ; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C.; MAIA JUNIOR, J. E.; SILVA, J. R.; CELESTINO, J. J.; MARTINS, F. S.; BÃO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R.

Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, Cambridge, v. 15, n. 2, p. 173-182, 2007.

SARAIVA, M. V.; CELESTINO, J. J.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 205-214, 2011.

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*, Los Altos, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004.

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, Los Angeles, v. 146, n. 2, p. 941-949, 2005.

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

6 DISCUSSÃO GERAL

No Brasil a população de equinos tem aumentado substancialmente nos últimos anos, com isto a necessidade de biotécnicas reprodutivas para que haja um incremento genético se faz necessária.

O uso da IA, TE, ICSI e clonagem como biotécnicas mais aplicáveis, pode abrir portas para o uso da MOIFOPA no futuro, visto que esta última proporciona um aproveitamento dos FOPA disponíveis no ovário através do cultivo *in vitro* destes folículos. Além disto, através desta biotécnica é possível uma maior compreensão dos eventos implicados na foliculogênese, produção de bancos de germoplasma, assim como, a produção de embriões em larga escala.

No entanto, existem muitos entraves em se obter ovários para pesquisas na espécie equina em razão da falta de abatedouros além da não existência de plantéis comerciais equinos destinados ao abate. Neste contexto, os animais ofertados para abate são na grande maioria equinos descarte, ou seja, éguas doentes e/ou velhas com problemas reprodutivos e/ou sanitários. Outro aspecto relevante é com relação a distribuição espacial dos folículos no ovário equino. Não existe trabalhos com esta informação e desta maneira, muitas vezes os fragmentos ovarianos destinados ao cultivo não contêm folículos.

Em assim sendo, esses fatores limitantes com relação a espécie equina explicam a escassez de trabalhos a respeito da anatomia ovariana, população folicular, oogênese, foliculogênese e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

Um grande desafio na técnica de MOIFOPA é desenvolver um meio de cultivo *in vitro* ideal que mimetize todos os eventos fisiológicos que ocorrem *in vivo*, proporcionando assim o ambiente necessário para a ativação e desenvolvimento de FOPA viáveis *in vitro*. Sabe-se que em outras espécies há um acervo expressivo de trabalhos como uso de diversas moléculas que podem ser adicionadas ao meio de CIV visando incrementar a eficácia da MOIFOPA. No entanto, na espécie equina ainda se faz necessário mais pesquisas com relação à composição do meio de cultivo *in vitro* de FOPA.

A adição do FSH ou EGF ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA em outras espécies foi capaz de promover a ativação e manter a viabilidade dos mesmos. Por esta razão, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso do FSH ou EGF em diferentes concentrações ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA na espécie equina.

Com relação ao primeiro artigo, avaliou-se a adição de diferentes concentrações de EGF (10, 50, 100 e 200 ng/mL) ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA equinos inclusos em fragmentos ovarianos. Foi possível constatar que o EGF nas concentrações de 100 e 200 ng/mL proporcionou o desenvolvimento e manteve a integridade folicular por dois dias de cultivo. Vale ressaltar que este consiste no primeiro estudo sobre o efeito do EGF no cultivo de fragmentos ovarianos equinos.

No segundo artigo foi testada a adição do FSH no meio de cultivo *in vitro* de FOPA equinos inclusos em fragmentos ovarianos em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 ng/mL). Observamos que as melhores taxas de desenvolvimento folicular foram obtidas com as concentrações de 200 ng/mL de FSH aos 2 dias de cultivo e 10 ng/mL aos 6 dias de cultivo. Com relação à integridade folicular, as melhores concentrações de FSH foram 100 ng/mL no D2 e 50, 100 e 200 ng/mL no D6. Desta maneira concluímos que o FSH teve um efeito benéfico quando adicionado ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovarianos equinos.

No presente trabalho, constatou-se que é possível realizar o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equino por 2 ou 6 dias em meio suplementado com EGF ou FSH. Entretanto, a baixa densidade populacional de folículos, a variação anatômica da zona parenquimatosa e o tamanho dos folículos antrais, entre outros podem ser fatores limitantes na realização desta biotécnica. Corroborando com outros experimentos sobre MOIFOPA em equinos, notou-se que os FOPA desta espécie podem ser mais sensíveis aos meios e períodos de cultivo *in vitro*.

7 CONCLUSÕES

- O EGF atuou de maneira benéfica sobre o desenvolvimento e integridade folicular nas concentrações de 100 e 200 ng/mL por dois dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos;

- O FSH nas concentrações de 200 ng/mL por 2 dias e 10 ng/mL por 6 dias de cultivo *in vitro* apresentaram melhores resultados com relação ao desenvolvimento folicular;

- O FSH quando utilizado nas concentrações de 100 ng/mL por 2 dias e 50, 100 e 200 ng/mL por 6 dias de cultivo *in vitro* foi capaz de manter a integridade folicular.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ARAÚJO, V. R.; COSTA, S. L.; CHAVES, R. N.; LOPES, C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C.C.; BURATINI JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of sequencial médium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on *in vitro* development of goat preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 152, p. 32-38, 2015.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Desenvolvimento e otimização de um método mecânico para o isolamento de folículos ovarianos pré-antrais ovinos: resultados preliminares. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 2., 1996, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: UECE, 1996. p. 471.
- ANDRADE, E. R., SENEDA, M. M., ALFIERI, A. A., OLIVEIRA, J. A., BRACARENSE, A. P. F. R. L., FIGUEIREDO, J. R., TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005.
- ANDRADE, E. R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L. A.; HERTEL, M. F.; MELO STERZA, F. A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A. P.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral Follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 379-388, 2012.
- ANDRADE, P. M.; CHAVES, R. N.; ALVES, A. M. C. V.; ROCHA, R. M. P.; LIMA, L. F.; CARVALHO, A. A.; RODRIGUES, A. P. R.; CAMPELLO, C. C.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of α -MEM and TCM-199 culture media and epidermal growth factor on survival and growth of goat and sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Animal Reproduction*, Belo Horizonte, v. 11, n. 4, p. 567-572, 2014.
- ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B.; BRUNO, J. B.; PINHO LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 295-304, 2013.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v. 74, n. 5, p. 884-894, 2010.
- BANKS, W. J. *Histologia veterinária aplicada*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BARROS, V. R.; CAVALCANTE, A. Y.; MACEDO, T. J.; BARBERINO, R. S.; LINS, T. L.; GOUVEIA, B. B.; MENEZES, V. G.; QUEIROZ, M. A.; ARAÚJO, V. R.; PALHETA JUNIOR, R. C.; LEITE, M. C.; MATOS, M. H. Immunolocalization of melatonin and follicle-stimulating hormone receptors in caprine ovaries and their effects during *in vitro* development of isolated pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 48, n. 6, p. 1025-1033, 2013.

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*, Oxford, v.38, p.87-98, 1989.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L. *Manual of Equine Reproduction*. Missouri: Elsevier Health Sciences, 2003.

BOLAMBA, D.; FLOYD, A. A.; MCGLONE, J. J.; LEE, V. H. Epidermal growth factor enhances expression of connexin 43 protein in cultured porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, New York, v. 67, n. 1, p. 154-60, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Espécies: equídeos*. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

BRITO, I. R.; SILVA, C. M. G.; DUARTE, A. B. G.; LIMA, I. M. T.; RODRIGUES, G. Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A. D.; LOBO, C. H.; BERNUCI, M. P.; ROSA-E-SILVA, A. C. J. S.; CAMPELLO, C. C.; XU, M.; FIGUEIREDO, J. R. Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, New York, v. 81, n. 7, p. 636-45, 2014.

BROWN, P.; MCNEILLY, A. S. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Reviews of Reproduction*, Colchester, v. 4, n. 2, p. 117-124, 1999.

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*, New York, v. 191, p. 414-421, 2010.

BRUNO, J. B.; MARTINS, F. S.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; WANDERLEY, L. S.; CORREIA, J. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Influência de diferentes origens e concentrações de soro sobre folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, suppl. 1, p. 352, 2006.

BUTCHER, L.; ULLMAN, S. L. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, shorttailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, v. 8, n. 4, p. 535-539, 1996.

BYSKOV, A. G. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 37, n. 2, p. 277-285, 1974.

CAHILL, L. P.; MAULÉON, P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *Journal of Reproduction Fertility*, Cambridge, v. 61, n. 1, p. 201-206, 1981.

CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cells interactions. *Human reproduction Update*, Oxford, v. 6, n. 3, p. 279-289, 2000.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J. Effects of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 71-79, 1991.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 90, n. 1, p. 321-327, 1990.

CASTRO, S. V.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; SANTOS, F. W. Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during *in vitro* culture. *Cell and Tissue Banking*, Dordrecht, v. 15, n. 4, p. 591-601, 2014.

CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reproductive Sciences*, Thousand Oaks, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009.

CORMACK, D. H. O sistema reprodutor feminino. In: _____. *Ham histologia*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 485-508.

DA PAZ SANTOS, L.; BARROS, V. R. P.; CAVALCANTE, A. Y. P.; ARAÚJO, V. R.; MATOS, M. H. T. Effects of epidermal growth factor on *in vitro* survival and antrum formation of isolated ovine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, Melbourne, v. 26, n. 1, p. 173-173, 2014.

DANIEL, S. A.; ARMSTRONG, D. T.; GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. *Gamete Research*, New York, v. 24, n. 1, p. 109-121, 1989.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, Cambridge, v. 130, n. 2, p. 147-156, 2005.

DISSEN, G. A.; ROMERO, C.; HIRSHFIELD, N. A.; OJEDA, S. R. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*, Los Angeles, v. 142, n. 5, p. 2078-2086, 2001.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, Los Altos, v. 35, n. 1, p. 55-79, 1991.

DRIANCOURT, M. A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J. C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reproduction, Nutrition, Development*, Paris, v. 22, n. 6, p. 1035-1047, 1982.

DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; SILVA, G. M.; LUZ, V. B.; HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ALMEIDA, A. P.; LÔBO, C. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Insulin-like growth factor II (IGF-II) and follicle stimulating hormone (FSH) combinations can improve the *in vitro* development of grown oocytes

enclosed in caprine preantral follicles. *Growth Hormone & IGF Research*, London, v. 23, n. 1-2, p. 37-44, 2013.

DULEBA, A. J.; PEHLIVAN, T.; CARBONE, R.; SPACZYNSKI, R. Z. Activin stimulates proliferation of rat ovarian thecal-interstitial cells. *Biology of Reproduction*, New York, v. 65, n. 3, p. 704-709, 2001.

DURLINGER, A. L.; GRUIJTERS, M. J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; INGRAHAM, H. A.; NACHTIGAL, M. W.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMME, A. P. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, Los Angeles, v. 143, n. 3, p. 1076-1084, 2002.

EGGAN, K.; JURGA, S.; GOSDEN, R.; MIN, I. M.; WAGERS, A. J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, London, v. 441, n. 7097, p. 1109-1114, 2006.

EPPIG, J. J. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Developmental Biology*, San Diego, v. 60, n. 2, p. 371-78, 1977.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, New York, v. 54, n. 1, p. 197-207, 1996.

EPPIG, J. J.; SCHOEDER, A. C. Capacity of mouse oocyte from preantral follicles undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction*, New York, v. 41, n. 2, p. 268-276, 1989.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHEREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biology of Reproduction*, New York, v. 15, n. 4, p.555-560, 1976.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. *In: SEMINARS IN REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY*, 1986. San Diego. *Proceedings...* San Diego, 1986. p. 233-254,

EVANS, T. J.; CONSTANTINESCU, G. M.; GANJAN, V. K. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. *In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. Current Therapy in Large Animal Theriogenology* 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2007. p. 47-67.

FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M.; ROSSETTO, R.; LOPES, C. A.; VAN TILBURG, M. F.; CARNEIRO, P. B.; BÁO, S. N.; MOURA, A. A.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex. *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, 2014.

FAUSTINO, L. R.; LIMA, I. M. T.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; LUCCI, C. M.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kit ligand

on the goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 112-119, 2013.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Livraria Varela, 2002.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; THIRY, M.; VAN DER HURK, R.; BEVERS, M. M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J. F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v. 43, n. 5, p. 845-58, 1995.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 227-327.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT. *Production: live animals*. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em: 29 de janeiro de 2015.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. *Histologia comparada*. 2. ed. São Paulo: Rocca, 1998.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the Mare: basic and applied aspects. Wisconsin: Equiservices, 1979.

GOMES, R. G.; ANDRADE, E. R.; LISBOA, L. A.; CIQUINI, C.; BARREIROS, T. R.; FONSECA, N. A.; SENEDA, M. M. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*, Los Altos, v. 78, n. 4, p. 731-736, 2012.

GOMES, R. G.; LISBOA, L. A.; SILVA, C. B.; MAX, M. C.; MARINO, P. C.; OLIVEIRA, R. L.; GONZÁLEZ, S. M.; BARREIROS, T. R.; MARINHO, L. S.; SENEDA, M. M. Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation. *Theriogenology*, Los Altos, v. 84, n. 5, p. 750-755, 2015.

GORDON, I. Recovery the primary oocyte. In: _____. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: CAB International: Raven Press, 1994. p. 71-82.

GOSDEN, R. G.; LAING, S. C.; FELICIO, L. S.; NELSON, J. F.; FINCH, C. E. Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6 mice. *Biology of Reproduction*, New York, v. 28, n. 2, p. 255-260, 1983.

GUPTA, P. S.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2008.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. *Biology of Reproduction*, New York, v. 62, n. 5, p. 322-1328, 2000.

HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology*, Los Altos, v. 79, n. 6, p. 911-917, 2013.

HAFEZ, E. S. E. Anatomy of female reproduction. In: _____ *Reproduction in farm animals*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. p. 20-58.

HASHIMOTO, S.; OHSUMI, K.; TSUJI, Y.; HARAUMA, N.; MIYATA, Y.; FUKUDA, A.; HOSOI, Y.; IRITANI, A.; MORIMOTO, Y. Growing porcine oocyte-granulosa cell complexes acquired meiotic competence during *in vitro* culture. *The Journal of Reproduction and Development*, Tokyo, v. 53, n. 2, p. 379-384, 2007.

HEMAMALINI, N. C.; RAO, B. S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; NAIDU, K. S.; REDDY, K. K.; RAO, V. H. Influence of transforming growth factor- α , insulinlike growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 11-22, 2003

HENDERSON, K. M.; McNATTY, K. P.; SMITH, P.; GIBB, M.; O'KEEFFE, L. E.; LUN, S.; HEALTH, D. A.; PRISK, M. D. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 79, n. 1, p. 185-193, 1987.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 333-339, 1994.

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

HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, Baltimore, v. 15, n. 6, p. 707-24, 1994.

HUANMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v. 54, n. 4, p. 641-650, 2000.

HUGHES JUNIOR, F. M.; GOROSPE, W. C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism

underlying follicular atresia. *Endocrinology*, Los Angeles, v. 129, n. 5, p. 2415-2422, 1991.

HULSHOF, S. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. *The Veterinary Quarterly*, The Hague, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

HUTT, K. J.; McLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. KL and KIT have diverse role during mammalian oogenesis. *Molecular Human Reproduction*, Oxford, v. 12, n. 2, p. 61-9, 2006.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLENSSEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, Los Altos, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

IBGE. *Anuário estatístico do Brasil*. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb.2012.pdf>>. Acesso em: 9 ago. 2015.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility*, Oxford, v. 34, p. 39-54, 1987.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L. M.; MEYER, H. H.; WILDT, D. E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, Oxford, v. 112, n. 1, p. 39-47, 1998.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 183-93, 1996.

JORIO, A.; MARIANA, J. C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 26, n. 3-4, p. 239-250, 1991.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Developmental Biology*, New York, v. 214, n. 2, p. 342-353, 1999.

KAIPIA, A.; HSUEH, A. J. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*, Palo Alto, v. 59, p. 349-363, 1997.

KERR, J. B.; BROGAN, L.; MYERS, M.; HUTT, K. J.; MLADENOVSKA, T.; RICARDO, S.; HAMZA, K.; SCOTT, C. L.; STRASSER, A.; FINDLAY, J. K. The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or γ -irradiation mediated depletion. *Reproduction*, Cambridge, v. 143, n. 4, p. 469-476, 2012.

KRYSKO, D. V.; DIEZ-FRAILE, A.; CRIEL, G.; SVISTUNOV, A. A.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*, London, v. 13; n. 9 p. 1065-1087, 2008.

LAND, R. B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross blackface and Welsh sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 21, n.3, p. 517-521, 1970.

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; MARTINS, F. S.; SANTOS, R. R.; BÁO, S. N.; LUQUE, M. C. A.; VIEIRA, G. A. B.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Effects of α -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 57-65, 2009.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT, M. Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. *Biology and Reproduction*, New York, v. 64, n. 1, p. 171-178, 2001.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Study of preantral follicles population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 56, n. 3-4, p. 223-236, 1999.

LUNARDON, N. T.; SILVA-SANTOS, K. C.; JUSTINO, R. C.; DESSUNTI, G. T.; SENEDA, M. M.; MARTINS, M. I. Population estimate of the preantral follicles and frequency of multiocyte follicles in prepubertal and adult bitches. *Theriogenology*, Los Altos, v. 83, n. 6, p. 1015-1020, 2015.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early. *Biocell*, Mendoza, v. 33, n. 2, p. 91-97, 2009.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, Los Altos, v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011.

MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of epidermal growth factor and insulin like growth factor 1 on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, 2004.

MARKSTROM, E.; SVENSSON, E. C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, Cambridge, v. 123, n. 1, p. 23-30, 2002.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulinlike growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat

preantral follicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010.

MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ALMEIDA, A. P.; CELESTINO, J. J.; PADILHA, R. T.; CUNHA, R. M.; SILVA, J. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Presence of growth hormone receptor (GH-R) mRNA and protein in goat ovarian follicles and improvement of *in vitro* preantral follicle survival and development with GH. *Theriogenology*, Los Altos, v. 82, n. 1, p. 27-35, 2014.

MATOS, M. H. ; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C.; MAIA JUNIOR, J. E.; SILVA, J. R.; CELESTINO, J. J.; 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*, Cambridge, v. 15, n. 2, p. 173-182, 2007.

MARTINS, F. S.; CELESTINO J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JÚNIOR C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. *Reproduction , Fertility and Development*, v.20, p.916-9124, 2008.

McCAFFERY, F. H.; LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: Markers for assessment of growth and development. *Biology of Reproduction*, New York, v. 63, n. 1, p. 267-273, 2000.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Início do desenvolvimento humano. *In: _____*. *Embriologia Clínica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.13-38.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, San Diego, v. 213, n. 1, p. 1-17, 1999.

NAVES, C. S.; VIEIRA, R. C.; DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O.; BELLETI, M. E.; OLIVEIRA, R. C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 416-422, 2008.

NAYÜDU, 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*, Cambridge, v. 95, n. 2, p. 577-84, 1992.

NILSSON, E.; PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdam, v. 175, n. 1-2, p. 123-130, 2001.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Bone morphogenetic protein-4 acts as a KGF and primordial follicle development ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of Reproduction*, Champaign. v. 69, p. 1265-1272, 2003.

NÓBREGA JUNIOR, J. E.; GONÇALVES, P. B. D.; PEREIRA, G. R.; FIGUEIREDO, J. R. Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor de leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p. 75-79, 2014.

NÓBREGA JUNIOR, J. E.; GONÇALVES, P. B.; CHAVES, R. N.; MAGALHÃES, D. M.; ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; PEREIRA, G. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, J. F. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability *in vitro*. *Zygote*, Cambridge, v. 20, n. 1, p. 73-78, 2012.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, Los Angeles, v. 140, n. 9, p. 4262-4271, 1999.

PATEL, H.; BHARTIYA, D.; PARTE, S.; GUNJAL, P.; VEDULKAR, S.; BHATT, M. Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternately spliced receptor variant FSH-R3. *Journal of Ovarian Research*, London, v.6, p. 52, 2013.

PESSOA, A. F.; ROCHA, R. M.; SILVA, G. M.; BRITO, I. R.; CHAVES, R. N.; PADILHA, D. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of morphological integrity, period, and type of culture system on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v. 82, n. 2, p. 312-317, 2014.

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

QVIST, R.; BLACKWELL, L. F.; BOURNE, H.; BROWN, J. B. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 89, n. 1, p. 169-180, 1990.

RAJARAJAN, K.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; RAO, V. H. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 63, p. 204–212, 2006.

REYNAUD, K.; DRIANCOURT, M. A. Oocyte attrition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdam, v. 163, n. 1-2, p. 101-108, 2000.

ROCHA, R. M. P.; ALVES, A. M. C. V.; LIMA, L. F.; ARAÚJO, V. R.; BERNUCI, M. P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Regulação da função ovariana: caracterização estrutural e papel do hormônio anti-mülleriano (AMH). *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 41, p. 1-12, 2013a.

ROCHA, R. M.; LIMA, L. F.; ALVES, A. M.; CELESTINO, J. J.; MATOS, M. H.; LIMA-VERDE, I. B.; BERNUCI, M. P.; LOPES, C. A.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, Domendo, v. 44, p. 1-9, 2013b.

RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M. T.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; COSTA, S. L.; CASTRO, S. V.; BARROS, V. R. P.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Transforming growth factor- β (TGF- β) maintains follicular ultrastructure and stimulates preantral follicle growth in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 66, n. 2, p.411-416, 2014.

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

ROSSETTO, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, C. M.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Comparative study on the *in vitro* development of caprine and bovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 167-70, 2013a.

ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, Cambridge, v. 21, n. 2, p. 125-128, 2013b.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility*, New York, v. 59, n. 4, p. 783-90, 1993.

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

SARAIVA, M. V.; CELESTINO, J. J.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 205-214, 2011.

SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I.R.; CELESTINO, J.J.H.; FAUSTINO, L.R.; ALMEIDA, A.P.; LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES, D.M.; LIMA, I.M.T.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamic médium containing FSH, LH and EGF produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, supl. 2, p. 712, 2010.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, Paris, v. 167, n. 3-4, p. 205-218, 1991.

SAUMANDE, J. Ovogénèse et folliculogénèse. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, Paris, v. 157, p. 29-38, 1981.

SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, East Melbourne, v. 23, n. 3, p. 444-467, 2011.

SERAFIM, M. K.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ALMEIDA, A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, L. D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of folliclestimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, Los Altos, v. 74, n. 5, p. 749-55, 2010.

SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, G. Q.; BRITO, I. R.; ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V. A.; CAMPELLO, C. C.; LOBO, C. H.; SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A. A.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. *Research in Veterinary Science*. Oxford, v. 94, n. 3, p. 453–461, 2013.

SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na função ovariana e desenvolvimento embrionário. *Acta Veterinaria Brasílica*, Mossoró, v.4, n. 4, p. 215-226, 2010.

SILVA, G. M.; ROSSETTO, R.; CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; FELTRIN, C.; BERNUCI, M. P.; ANSELMO-FRANCI, J.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. *Zygote*, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 475-484, 2015.

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*, Los Altos, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004.

SILVA, J. R.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H.; 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*, Los Altos, v. 61, n. 9, p. 1691-704, 2004c.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. *Theriogenology*, Los Altos, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SOFI, K. A.; KHAN, M. Z.; ISLAM, R.; LONE, F. A. Effect of cysteamine and epidermal growth factor supplementation on the *in vitro* maturation rate of ovine oocytes. *Small Ruminant Research*, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 191-194, 2011.

TALEBI, A.; ZAVAREH, S.; KASHANI, M. H.; LASHGARBLUKI, T.; KARIMI, I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, New York, v. 29, n. 2, p. 175-183, 2012.

TANWAR, P. S.; O'SHEA, T.; McFARLANE, J. R. *In vivo* evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 106, n. 3-4, p. 232-240, 2008.

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

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, Los Angeles, v. 146, n. 2, p. 941-949, 2005.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S. C.; SPEARS, N.; TELFER, E. E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, Cambridge, v. 122, n. 3, p. 487-495, 2001.

TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*, Colchester, v. 1, n. 3, p. 162-172, 1996.

TOYODA, T.; NAKAMURA, K.; YAMADA, K.; THANSEEM, I.; ANITHA, A.; SUDA, S.; TSUJII, M.; IWAYAMA, Y.; HATTORI, E.; TOYOTA, T.; MIYACHI, T.; IWATA, Y.; SUZUKI, K.; MATSUZAKI, H.; KAWAI, M.; SEKINE, Y.; TSUCHIYA, K.; SUGIHARA, G.; OUCHI, Y.; SUGIYAMA, T.; TAKEI, N.; YOSHIKAWA, T.; MORI, N. SNP analyses of growth factor genes EGF, TGF- β 1, and HGF reveal haplotypic association of EGF with autism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 360, p. 715-720, 2007.

TSAFIRI, A.; BRAW, R. H. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Oxford, v. 6, p. 226-265, 1984.

Van DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, Los Altos, v. 47, n. 1, p. 73-82, 1997.

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

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*, Los Altos, v. 45, n. 4, p. 817-832, 1996.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. *The physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p. 571-628.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. p. 69-101.

WU, J.; CARREL, D. T.; WILCOX, A. L. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 65, n. 5, p. 1579-15785, 2001.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001.

ZHAO, J.; TAVENE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, New York, v. 58, n. 3, p. 287-296, 2001.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 90, n. 3-4, p. 265-272, 2005.

APÊNDICES

ABAIXO SEGUEM OS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO