



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DIOGO MANOEL FARIAS DA SILVA

**INSULINA AFETA O DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS OVINOS CULTIVADOS IN SITU**

Recife

2019

DIOGO MANOEL FARIAS DA SILVA

**INSULINA AFETA O DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS OVINOS CULTIVADOS IN SITU**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte da exigência para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dr. Aurea Wischral.

Co-orientador: Prof. André Mariano

Recife

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S586i Silva, Diogo Manoel Farias da.
Insulina afeta o desenvolvimento de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in Situ* / Diogo Manoel Farias da Silva. – Recife, 2019.
53 f.: il.

Orientador(a): Aurea Wischral.
Coorientador(a): André Mariano Batista.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Folículo gênese 2. Esteroidogênese 3. Apoptose 4. Expressão gênica 5. Animais domésticos I. Wischral, Aurea, orient. II. Batista, André Mariano, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

INSULINA AFETA O DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS OVINOS
CULTIVADOS IN SITU

Tese de Doutorado elaborado por

DIOGO MANOEL FARIAS DA SILVA

Aprovado em 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. AUREA WISCHRAL
Orientadora- Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. ANDRÉ MARIANO BATISTA
Co-orientadora- Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. SILDIVANE VALCÁCIA SILVA
Centro de Biotecnologia da UFPB

Prof. Dr. CLÁUDIO COUTINHO BARTOLOMEU
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Dra. ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Dra. SUZANA SANTINO NUNES DA ROCHA
ROYAL CANIN-BR

Profa. Dra. SANDRA SILVA DUARTE
Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

“Clareza na idéia, pureza no coração,
sentimento como guia e honestidade como
religião.”

AGRADECIMENTOS

“À Deus e ao meu anjo da guarda por me guiar ao longo da minha caminhada;

À minha família que sempre esteve ao meu lado, apoiando e incentivando as atividades acadêmicas;

À minha mãe por sempre ser uma referência em tudo na minha vida, iluminando sempre os meus caminhos;

Aos meus amigos/irmãos (Augusto Afonso; Guilherme Nunes; Felipe Rodrigues; Rafael Vasconcelos) que sempre me apoiaram;

Aos Professores Áurea Wischral, Manoel Adrião e André Mariano, que além de me orientarem foram meus padrinhos científicos durante toda a minha formação acadêmica;

Aos professores Álvaro Coelho, Valeria Teixeira e Marcos Antônio por permitirem o desenvolvimento das atividades no laboratório sobre sua coordenação.

Aos meus companheiros de pesquisa do FAMA e aos meus novos companheiros do laboratório de histologia;

Aos meus amigos Carolline Guimarães, Renata Revêredo, Cíntia Ferreira, Ismaela Melo e Sandra Duarte pelos ensinamentos e companheirismo;

Ao LANAGRO/PE, pelo apoio;

À minha nova família (Lucy Lemos e Gercineide Lemos);

Um especial agradecimento a Geisy Lemos, meu amor, por ser uma grande companheira;

À UFRPE onde foi trilhada toda essa jornada

À FACEPE por permitir o desenvolvimento das atividades

A todos aqueles que fizeram parte desta jornada, ajudando direta ou indiretamente;

Obrigado por fazerem parte desta caminhada, que eu acredito está apenas começando.”

RESUMO

A insulina pode desempenhar, no cultivo *in vitro*, efeitos sobre a foliculogênese os quais permitiram uma maior obtenção de folículos pré-antrais para posterior produção de embrião. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do hormônio insulina sobre o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos da espécie ovina, associando ou não com FSH. Para ovários foram coletados em matadouros e armazenados em meio MEM-HEPES a 4 °C e levados ao laboratório. Para o cultivo *in vitro*, foram obtidos fragmentos do córtex ovariano (3x3x2mm) e cultivados em meio α -MEM⁺ por 8 dias a 39°C com 5% de CO₂. Após os cultivos os fragmentos foram processados e analisados na histológica para avaliação morfológica do desenvolvimento folicular (ativação, manutenção da morfologia e diâmetro do oócito e folículo), análise imuno-histoquímica para localização do antígeno de proliferação nuclear e expressão gênica do RNA mensageiro mRNA para o gene apoptótico (caspase 3) e da esteroidogênese (CYP17 e CYP19). O fluxo de informação permitiu separar o estudo em dois experimentos. Experimento 1: Cultivo *in vitro* dos tecidos, avaliando os efeitos do hormônio insulina nas concentrações de (0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ng/mL), sobre a ativação, desenvolvimento e manutenção da morfologia. Experimento 2: Cultivo *in vitro* com hormônio insulina (0, 1, 100 ng/mL) associada com FSH sobre a ativação, desenvolvimento, manutenção da morfologia, antígeno de proliferação nuclear (PCNA) e expressão dos genes *caspase 3*, *CYP17* e *CYP19*. No experimento 1 os resultados demonstraram que: Os maiores percentuais de ativação foram observados nas concentrações de 1 e 100 ng/mL do hormônio ($P < 0,05$), a porcentagem de folículos morfológicamente normais foi significativamente maior ($P < 0,05$) para os tecidos cultivados em 1 e 10 ng/mL de insulina comparado aos tecidos cultivados apenas em α -MEM⁺. Com relação ao crescimento não foi observada diferença do diâmetro do oócito e folículo após o cultivo *in vitro* em nenhuma das concentrações da insulina. Entretanto na concentração de 10.000 ng/mL houve uma redução significativa no diâmetro folicular quando comparado aos tecidos cultivados apenas em α -MEM⁺ ($P < 0,05$). No experimento 2: Os resultados demonstraram que após 8 dias de cultivo com as concentrações de insulina (1, 10 e 100 ng/mL) associado com FSH, apresentaram uma maior ativação ($P < 0,05$). Do mesmo modo, a porcentagem de folículos morfológicamente normais foi significativamente maior na concentração de 10 ng/mL com e sem FSH ($P < 0,05$). A marcação do PCNA pela imuno-histoquímica demonstrou a presença do antígeno no oócito, em todos os grupos analisados, e nas células da granulosa, apenas no grupo que não foi submetido ao cultivo. A porcentagem de pixel para a marcação do PCNA em todas as concentrações de insulina associada ao FSH, foi maiores que os grupos sem FSH ($P < 0,05$). A expressão dos genes CYP17 e CYP19 foram identificadas em todos os grupos, entretanto sem diferença significativa. A expressão do gene caspase 3 no grupo IN1FSH ($P < 0,05$) do que nos grupos IN10, IN100, IN10FSH e IN100FSH. Em conclusão a insulina no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de ovelhas, sozinha ou associada com FSH atua de forma dose-dependente na ativação folicular, preservando a morfologia, mas sem alterar o diâmetro folicular. Em alta concentração (10.000 ng/mL) a insulina possui efeito inibitório sobre o crescimento inicial dos folículos. Conclui-se, ainda, que a insulina pode reduzir a expressão do gene relacionado com a apoptose (caspase 3), quando em concentrações intermediárias (10 e 100 ng/mL) especialmente associados ao FSH.

Palavra Chave: Ativação; Foliculogênese; Esteroidogênese; Expressão Gênica; Animais Domésticos.

ABSTRACT

Insulin may have effects on folliculogenesis in in vitro culture, which allowed a greater preantral follicles to be obtained for later embryo production. In this context, the objective of this work was to determine the effect of the hormone insulin on the in vitro culture of ovarian fragments of the ovine species, associated or not with FSH. For ovaries were collected in slaughterhouses and stored in MEM-HEPES medium at 4 ° C and taken to the laboratory. For in vitro culture, fragments of the ovarian cortex (3x3x2mm) and cultured in α -MEM + medium were obtained for 8 days at 39 ° C with 5% CO₂. After culture, the fragments were processed and histologically analyzed for morphological evaluation of follicular development (activation, maintenance of the morphology and diameter of the oocyte and follicle), immunohistochemical analysis for localization of the nuclear proliferation antigen and gene expression of mRNA messenger RNA for the apoptotic gene (caspase 3) and steroidogenesis (CYP17 and CYP19). The flow of information allowed to separate the study in two experiments. Experiment 1: In vitro culture of the tissues, evaluating the effects of the hormone insulin at the concentrations of (0, 1, 10, 100, 1.000 and 10.000 ng/mL) on the activation, development and maintenance of morphology. Experiment 2: In vitro culture with hormone insulin (0.1, 100 ng/mL) associated with FSH on the activation, development, maintenance of morphology, nuclear proliferation antigen (PCNA) and expression of caspase 3, CYP17 and CYP19 genes. In the experiment 1 the results showed that: The highest percentages of activation were observed at concentrations of 1 and 100 ng/mL of the hormone (P <0.05), the percentage of morphologically normal follicles was significantly higher (P <0.05) for tissues cultured in 1 and 10 ng / mL insulin compared to tissues cultured only in α -MEM⁺. Regarding growth, no difference in oocyte and follicle diameter was observed after in vitro culture at any of the insulin concentrations. However, at the concentration of 10,000 ng / mL there was a significant reduction in follicular diameter when compared to tissues cultured only in α -MEM⁺ (P <0.05). In the experiment 2, the results showed that after 8 days of culture with insulin concentrations (1, 10 and 100 ng / mL) associated with FSH, they presented a greater activation (P<0.05). Likewise, the percentage of morphologically normal follicles was significantly higher at 10 ng / mL concentration with and without FSH (P <0.05). The PCNA labeling by immunohistochemistry showed the presence of the antigen in the oocyte, in all the analyzed groups, and in the granulosa cells, only in the group that was not submitted to the culture. The percentage of pixel for PCNA labeling at all FSH associated insulin concentrations was higher than the non FSH groups (P <0.05). The expression of the CYP17 and CYP19 genes were identified in all groups, however without significant difference. The expression of the caspase 3 gene in the IN1FSH group (P <0.05) than in the IN10, IN100, IN10FSH and IN100FSH groups. In conclusion, insulin in the in vitro culture of ovarian sheep fragments alone or associated with FSH acts in a dose-dependent manner on follicular activation, preserving the morphology, but without altering the follicular diameter. At high concentration (10,000 ng/mL) insulin has an inhibitory effect on the initial follicle growth. It is also concluded that insulin can reduce the expression of the gene related to apoptosis (caspase 3), when in intermediate concentrations (10 and 100 ng/mL) especially associated with FSH.

Keyword: Activation; Folliculogenesis; Steroidogenesis; Gene expression; Domestic animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação de hormônios e fatores de crescimento sobre o desenvolvimento folicular.....	16
Figura 2 - Esquema demonstrando as categorias foliculares (morfologia e número de camadas das células da granulosa.....	18
Figura 3 - Biossíntese de esteroides: O colesterol, precursor de todos os esteroides, é entregue na membrana mitocondrial interna por STAR e TSPO, onde é clivado em pregnenolona. A pregnenolona difunde-se livremente das mitocôndrias e é usada para a biossíntese de testosterona e estradiol nas gônadas	19
Figura 4 - Via de sinalização da insulina: Ligação da insulina e do FSH aos seus receptores regulando a apoptose, esteroidogênese, síntese proteica e crescimento celular.	23
Figura 5 - Análise histológica de fragmentos ovarianos ovinos corados com hematoxilina e eosina, após 8 dias de cultivo com insulina. Imagem (A) e (B). Folículo degenerado (D), folículo normal (N).....	33
Figura 6 - Diâmetro médio dos folículos de acordo com a categoria, após 8 dias de cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com diferentes concentrações de insulina	34
Figura 7 - Marcação do antígeno de proliferação celular (PCNA) por imunohistoquímica; Controle não cultivado (A e B), tratamento insulina (C e D), tratamentos insulina + FSH (E e F). Marcação positiva; célula da granulosa (CG), oócito (O). Imagem A (400X); imagem B, C, D, E, F (1000X).	36
Figura 8 - Detecção do pixel da marcação do PCNA no cortex folicular, após cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com as associações de insulina com FSH.....	37
Figura 9 - Quantificação relativa do mRNA para os genes da caspase-3, CYP-19 e CYP-17 no fragmento do córtex ovariano após cultivo com insulina associada ou não ao FSH	38

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Descrição dos grupos para o cultivo do fragmento folicular com suplementação de diferentes concentrações de insulina associado ou não com FSH.	27
Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para análise da expressão gênica pela qPCR.	30
Tabela 3- Percentual de folículos ativados e com a morfologia preservada após cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com diferentes concentrações de insulina.	32
Tabela 4- Percentual de folículos ativados e com a morfologia preservada após cultivos com diferentes concentrações de insulina associada com FSH.....	35

LISTA DE ABREVIACÕES

bFGF- Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos-

BMP-4- Proteína Morfogenética Óssea 4

BMP-7- Proteína Morfogenética Óssea 7

cAMP- 3' , 5'-Clico de Adenosina Monofosfato

CYP11A1- Citocromo P450 - família 11

CYP17A1- 17 α -hidroxilase

CYP19A1- Aromatase

DHEA-Ddehidroepiandrosterona

DNA- Ácido Desoxirribonucleotídeo

ECM- Matriz Extra-Celular

FOPA- Folículos Ovarianos Pré-antrais

FSH- Hormônio Folículo Estimulante

FSH-R- Receptor de FSH

GLUT 4- Transportador de Glicose 4

GLUT- Transportador de glicose

IR- Receptor de Insulina

IR- Receptores de Insulina

KL- Kit Ligand

KL- Kit Ligand

LH- Hormônio Luteinizante

LH-R- Receptor do Hormônio Luteinizante

LH-R- Receptor do hormônio luteinizante

LIF- Fator Inibidor da Leucemia

LIF- Fator Inibitório da Leucemia

MAPK- Proteína quinase Mitogenicamente Ativa

MAPK- Proteína Quinase Mitogenicamente Ativada

MOIFOPA- Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

MOIFOPA- Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

mRNA- RNA Mensageiro

mRNA- RNA mensageiro

PCNA- Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PCNA- Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PI3K- Fosfatidilinositol 3-Quinase

StAR- Proteína Aguda Reguladora da Esteroidogênese

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Ativação e Desenvolvimento folicular.....	16
2.2 Folículos Ovarianos	18
2.3 Hormônio Folículos Estimulante (FSH).....	18
2.4 Esteroidogênese.....	18
2.5 Atresia folicular	20
2.6 Manipulação e Cultivo de Folículos Ovarianos	21
2.7 Insulina	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivo Específico	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Reagentes.....	26
4.2 Desenho experimental	26
4.2.1 Experimento 1: Determinação das concentrações de insulina no cultivo In Vitro (CIV) dos folículos inclusos no córtex ovariano	26
4.2.2 Experimento 2: Avaliação da associação da insulina com FSH no CIV dos folículos inclusos no córtex ovariano.	26
4.3 Coleta dos ovários	27
4.4 Cultura in vitro de tecido ovariano	28
4.5 Análise morfológica e avaliação in situ do desenvolvimento folicular	28
4.6 Avaliação imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) dos folículos e córtex ovarino.	29
4.7 Quantificação da expressão gênica por PCR real time (qPCR).....	29
4.1.1 Extração do RNA e síntese do cDNA	29
4.6.2 Expressão Gênica	30
4.8 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Experimento 1: Determinação das concentrações de insulina no cultivo In Vitro (CIV) dos folículos inclusos no córtex ovariano.....	32
5.2 Experimento 2: Avaliação da associação da insulina com FSH no CIV dos folículos inclusos no córtex ovariano.	34

6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	42
8 REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

No Nordeste brasileiro a ovinocultura apresenta grande importância socioeconômica, sendo a carne e a pele o produto de exploração o qual é bastante utilizada, como produto de subsistência, pelas populações de média e baixa renda (SILVA et al., 1998). Porém apesar da sua importância existem entraves que afetam as características produtivas como manejo deficientes, alterações nutricionais impostas pelas condições climáticas do semi-árido e pelas precárias condições sanitárias. Com isso, essas características atuam diminuindo a eficiência reprodutiva (SILVA e ARAÚJO, 2002). Neste contexto a utilização de biotecnias reprodutivas permitiriam aumentar a eficiência reprodutiva o qual repercutir direta no aumento da produção e da produtividade na espécie ovina (SIMPLÍCIO et al., 2007).

O cultivo *in vitro* (CIV) de fragmentos do córtex ovarino permite a ativação dos folículos primordiais e seu desenvolvimento (CAVALCANTE et al., 2015). Estes folículos representam a grande maioria folicular (90%) (HASHIMOTO et al., 2007) que posteriormente poderá fornecer um grande número de oócitos viáveis para produção de embrião (ANDRADE et al., 2011). Apesar de estudos demonstrarem que este desenvolvimento é regulado por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (CELESTINO *et al.*, 2009; CELESTINO *et al.*, 2010; NILSSON et al., 2001; ESMAIELZADEH et al., 2013) pouco se sabe sobre os fatores que iniciam e estimulam o crescimento mantendo as características morfológicas dos folículos pré-antrais na espécie ovina.

Neste contexto, vem sendo demonstrado que a insulina atua na reprodução regulando a foliculogênese (PONCHIROLLI, 2003; SHIMIZU et al., 2008). Seus receptores foram localizados nas células do estroma ovariano (PORETSKY et al., 1984), oócito (SAMOTO et al., 1993) e nas células da granulosa e da teca (SOMCHIT-ASSAVACHEEP et al., 2013) demonstrando que a mesma possui ação sobre essas células durante o desenvolvimento folicular.

O efeito da insulina sobre o crescimento folicular *in vitro* foi demonstrado em diversas espécies tais como ratos (SUN et al., 2010), bovinos (MCLAUGHLIN et al., 2010), caprinos (CHAVES et al., 2011) e equinos (AGUIAR et al., 2016), com resultados diferentes na função folicular. Quando a insulina é associada ao hormônio folículo estimulante (FSH) observou-se maior estimulação da via esteroidogênica em mulheres (WILLIS et al., 1996), bovinos (SILVA et al., 2002) e caprinos (CHAVES et al., 2012). Além disso esta associação mostrou efeitos positivos sobre a viabilidade folicular (LOUHIO et al., 2000; CHAVES et al., 2012).

Apesar das evidências da ação da insulina e de sua associação com o FSH na reprodução dos animais domésticos, não há relatos destes efeitos sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano cultivados *in vitro* na espécie ovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ativação e Desenvolvimento folicular

Os folículos primordiais representam mais de 90% de todos os folículos nos ovários independentemente da idade ou estágio do ciclo estral (SHAW et al., 2000; HASHIMOTO et al., 2007) permanecendo inativos por anos (LI, et al., 2010). Durante a vida reprodutiva, alguns folículos são ativados para o desenvolvimento e, uma vez ativados, os folículos primordiais se desenvolvem em folículos primários e secundários, considerados folículos pré-antrais (MCGEE; HSUE, 2000).

O início do crescimento folicular é determinado a partir da transição de folículos primordiais quiescentes para primários. Esta iniciação é caracterizada pela transformação das células da granulosa da forma achatada para cuboidal e pela sua proliferação (TAL et al., 2002).

Alguns fatores parácrinos atuam na transição dos folículos primordiais para folículos em crescimento (ROCHE, 1996), entre eles estão o fator inibitório da leucemia – (LIF) (NILSSON et al., 2002), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (NILSSON et al., 2001), kit ligand (KL) (PARROTT; SKINNER, 1999), proteína morfogenética óssea 4 e 7 (BMP-4) e (BMP-7) (NILSSON; SKINNER, 2003; LEE et al., 2004) e a insulina, que em ratos permitiu ativação para estágio primário do folículo (KEZELE et al., 2002) bem como na promoção da maturação folicular e oocitária (YOUNG; MCNEILY, 2010) (Fig. 1). Além disso, os componentes da matriz extracelular parecem atuar de maneira indireta na ativação e no crescimento folicular (OKTAY et al., 1997???)

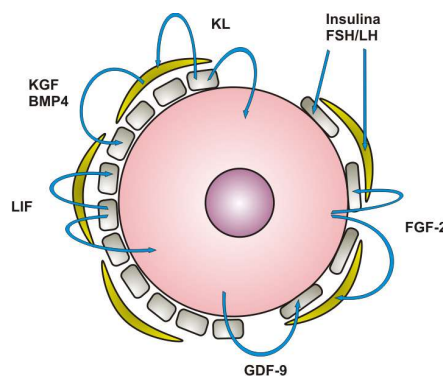


Figura 1 - Ação de hormônios e fatores de crescimento sobre o desenvolvimento folicular. (Fonte: Magalhães et al., 2009).

Em ovinos, o crescimento e recrutamento folicular ocorre quando os mesmos apresentam um diâmetro maior que 2 mm, sendo dependentes de gonadotrofinas (DRIANCOURT et al., 1991; DRIANCOURT, 2001), tendo o FSH como o principal hormônio

do recrutamento (PICTON et al., 1990). Além disso, os folículos maiores que 4 mm de diâmetro contêm altos níveis de estradiol e baixos de testosterona, (CARSON et al., 1981) e a aromatase P450 tem sido detectada apenas nas células da granulosa de folículos ovinos maiores que 3,5 mm de diâmetro (HUET et al., 1997). Nas células ovarianas ovinas, as células da granulosa em folículos pré-antrais e antrais expressam o mRNA para o receptor de FSH (FSH-R) e em folículos antrais grandes ocorre a expressão da aromatase P450 e receptor do hormônio luteinizante (LH-R) (MC-NATTY et al., 1999; JUENGEL et al., 2000).

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína presente no núcleo das células que atua como cofator da DNA polimerase delta, atuando na replicação do DNA (MOLDOVAN et al., 2007). Esta técnica vem sendo utilizada para identificação do início de atividade folicular, por isso, atua como um marcador de ativação e diferenciação celular do início do crescimento e proliferação das células foliculares, sendo localizados nas células da granulosa e oócito (WANDJI et al., 1996).

2.2 Folículos Ovarianos

Os folículos são as unidades morfofuncionais do ovário, sendo constituídos por um oócito circundado por células da granulosa e por células tecais, podendo ser divididos, de acordo com o nível de desenvolvimento, em folículos não cavitários ou pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e folículos cavitários ou antrais (folículos terciários e folículos de Graaf) (Fig. 2). Os folículos ovarianos pré-antrais são responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário.

Os folículos primordiais são caracterizados por apresentar um oócito esférico ou ovoide, completamente rodeado por uma camada simples de células da granulosa achatadas ou pavimentosas, os de transição apresentam pelo menos uma célula da granulosa com o formato cúbico, os primários apresentam-se com uma única camada de células da granulosa de morfologia cúbica em torno do oócito e os secundários possuem o oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica (BERTOLDO et al., 2014).

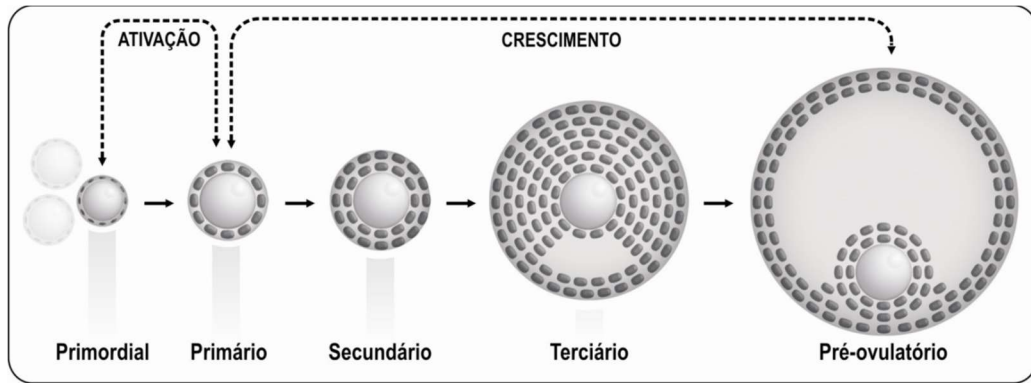


Figura 2 - Esquema demonstrando as categorias foliculares (morfologia e número de camadas das células da granulosa) (Fonte: Lima-Verde et al., 2011).

2.3 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O FSH é uma gonadotrofina produzida pela hipófise anterior e tem ação sobre os folículos ovarianos. No cultivo *in vitro* foi demonstrado que este hormônio promove o crescimento de folículos pré-antrais, formação de antro em muitas espécies (ZHOU; ZHANG, 2005; MATOS et al., 2007) e inibição da apoptose em folículos pré-antrais (MCGEE et al., 1997). Estudos na espécie ovina demonstraram que a utilização de FSH na concentração de 50 ng/mL no meio de cultivo de fragmentos ovarianos promoveram uma maior ativação folicular, crescimento do folículo e do oócito e manteve a integridade morfológica dos folículos (ESMAIELZADEH et al. 2013). Já na espécie caprina, Silva et al. (2004) demonstraram que o FSH, na concentração de 100 ng / mL, aumentou os diâmetros folicular e oocitário após 5 dias de cultura.

Os FSH-R foram identificados nas células da granulosa (O'SHAUGHNESSY et al., 1996) e no oócito (MEDURI et al., 2002) a partir de folículos ovarianos primários (OKTAY et al., 1997). Apesar dos receptores serem encontrados nessas estruturas acredita-se que o hormônio possua um efeito indireto no desenvolvimento folicular por meio de fatores alocados por folículos maiores ou células do estroma ovariano (ESMAIELZADEH et al. 2013).

2.4 Esteroidogênese

Durante a foliculogênese, os andrógenos aromatizáveis (androstenediona e testosterona) produzidos no ovário são sintetizados pelas células da teca sob ação do hormônio luteinizante (LH) em um processo chamado esteroidogênese (MURAYAMA et al., 2012), que tem como resultado final a conversão de andrógenos em estrógenos (estrone e estradiol) (TANIGUCHI et al., 2007).

Uma das sinalizações que determina o início da biossíntese dos hormônios esteróides envolve a proteína aguda reguladora da esteroidogênese (StAR), que facilita a translocação do colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna (STOCCO et al., 2008). Em seguida ocorre a conversão do colesterol em pregnenolona pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol intramitocondrial, comumente conhecida como CYP11A1 (SHIH et al., 2011) (Fig. 3).

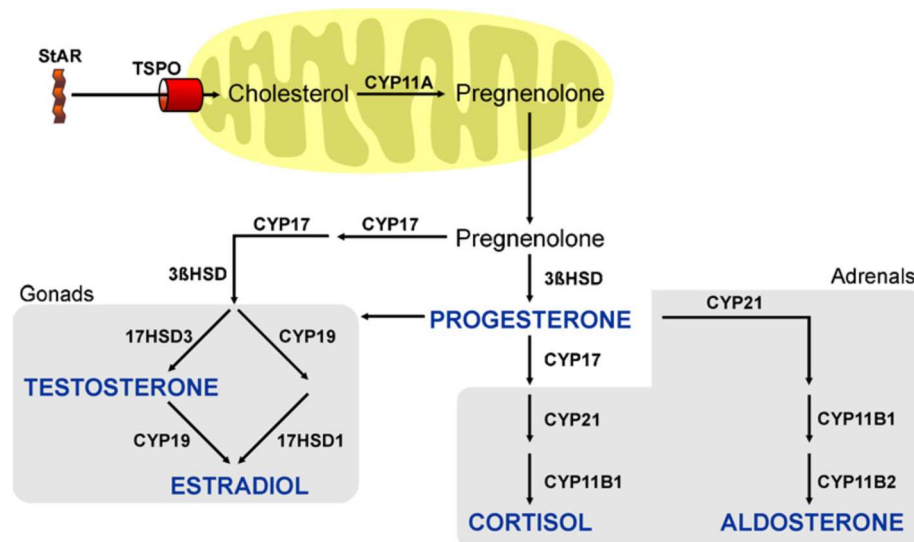


Figura 3 - Biossíntese de esteróides: O colesterol, precursor de todos os esteróides, é entregue na membrana mitocondrial interna por STAR e TSPO, onde é clivado em pregnenolona. A pregnenolona difunde-se livremente das mitocôndrias e é usada para a biossíntese de testosterona e estradiol nas gônadas. (Fonte: MARTINEZ-ARGUELLES & PAPADOPOULOS, 2010)

Em ruminantes, a dehidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona são sintetizadas a partir da pregnenolona pelo citocromo 17 α -hidroxilase / C17-20 liase citocromo P450 (CYP17A1), que é primariamente expresso em células da teca interna (DUGGABATTI et al., 2006; LIMA et al., 2015) e 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) (SAHMI et al., 2004). Após as reações de peroxidação e epoxidação, a androstenediona pode ser reduzida pela 17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD) à testosterona, e estes dois últimos esteróides são finalmente convertidos em estrona e estradiol, respectivamente, através de uma aromatização catalisada pela aromatase A1 do citocromo P450 (CYP19A1), que é expressa principalmente em células da granulosa (DUGGABATTI et al., 2006; PADMANABHAN et al., 2014; LIMA et al., 2015).

Fukuda et al. (2009) mostraram que o LH estimula a expressão do RNA mensageiro (mRNA) do CYP17 e a produção de andrógenos em células da teca de bovinos através da ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). O FSH também pode ativar a via PI3K e uma interação delicada tem sido demonstrada entre cAMP / proteína quinase. Além disso, Silva

et al. (2000) relataram que, em doses fisiológicas, FSH e insulina estimulam a secreção de mRNA de CYP19 e estradiol predominantemente através da sinalização da 3', 5' ciclo adenosina monofosfato (cAMP).

Durante o estágio de recrutamento folicular, o mRNA do gene CYP19 é mais expresso em folículos dominantes em relação aos folículos subordinados (ZIELAK et al., 2007; 2008). Sendo assim o CYP19 está relacionado ao crescimento e desenvolvimento folicular onde quanto maior o diâmetro maior a produção de estradiol (ZIELAK-STECIWKO et al., 2016).

A insulina também desempenha um papel importante nas células. Estudos *in vitro* utilizando células tecais de suíno, bovinos e ovinos demonstraram que a insulina promove proliferação celular dependente da dose e aumento da produção de esteróides, e aumentou a expressão de genes que codificam STAR, CYP11A1 e CYP17, promovendo a esteroidogênese (SMITH et al. 2005). Em caprinos, Chaves et al., (2012) determinaram que a suplementação de insulina no meio de cultivo, na concentração de 10 ng/mL associado com FSH, resultou em níveis significativamente aumentados de mRNA do CYP19A1.

2.5 Atresia folicular

Muitos folículos em desenvolvimento morrem de uma forma natural denominada atresia, que pode ocorrer pela via degenerativa e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 2008). A atresia por degeneração é decorrente de isquemia, em que a falha no fornecimento de oxigênio e nutrientes para o ovário, provoca a morte celular. Já a atresia por apoptose é um processo de morte celular individual e ativo, caracterizado pela fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (RACHID et al., 2000). Os fatores que regulam o processo de morte celular estão relacionados ao balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose, determinando a continuidade do crescimento folicular ou atresia (HSU; HSUEH, 2000). Muitas proteínas, como as pertencentes à família linfoma de células B 2 (Bcl-2) (Bcl-2; Bax), participam da cascata de eventos que culmina na ativação da caspase 3, sendo esta, a promotora do processo apoptótico (YUAN et al., 2005). Estas proteínas estão envolvidas na indução e execução do desencadeamento da morte das células ovarianas (SABBATINI et al., 1995).

Um dos pontos iniciais de atresia folicular ocorreria nas CG, o qual pode ser ativada pelo processo da apoptose (HUGHES; GOROSPE, 1991). Características típicas de células apoptóticas são encolhimento celular, formação de membrana plasmática, condensação e fragmentação da cromatina nuclear, fragmentação de DNA e segmentação da célula em corpos

apoptóticos o qual são fagocitados por macrófagos ou extrusados na cavidade do corpo (KERR et. al, 1972; ARENDS et. al., 1990; HSUEH et al., 1994).

2.6 Manipulação e Cultivo de Folículos Ovarianos

O córtex ovariano de mamíferos contém uma reserva de folículos primordiais que estão quiescentes, aproximadamente 80-90% de todos os folículos estão nesta fase (PENG et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2011) e alguns fatores parácrinos atuam nessas células, permitindo o retorno do desenvolvimento. Neste contexto, o cultivo *in vitro* permite estabelecer os efeitos dos hormônios e fatores de crescimento sobre o desenvolvimento dos folículos pré-antrais de ruminantes (WILLIAMS, 1990). Entre as biotecnias utilizadas para determinar o desenvolvimento folicular está a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) que fundamenta-se em dois objetivos principais: 1) resgatar ou isolar os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) a partir dos ovários, antes que eles se tornem atrésicos e 2) cultivar os FOPA e, conseqüentemente, os oócitos imaturos neles inclusos, até o estágio de maturação, prevenindo-os da atresia (FIGUEIREDO et al., 1999)

O cultivo de folículos ovarianos pode ser realizado *in situ* ou isoladamente. No *in situ*, são cultivados fragmentos do córtex ovariano, onde encontra-se os folículos (BRUNO et al., 2006) e no isolado, os folículos são isolados a partir de fragmentos do córtex ovariano (VANACKER et al 2011; BRITO et al., 2014). O cultivo *in situ* tem como vantagem preservar a integridade tridimensional dos foliculos, através da presença das células do estroma, assemelhando-se às condições *in vivo* (ARAUJO et al., 2013).

Embora sistemas de cultura que usam peças corticais ovarianas para apoiar a ativação e desenvolvimento do folículo até o estágio do folículo secundário tenham sido estabelecidos (WANDJI et al., 1996; TELFER et al., 2008), o desenvolvimento para o estágio antral não é fisicamente possível dentro destes fragmentos de tecido, exigindo assim, a necessidade de isolar os folículos secundários do ambiente estromal (REF).

A matriz extra-celular (ECM) desempenha vários papéis no desenvolvimento celular em muitos sistemas, como o ovário no cultivo *in situ*. A ECM influencia uma variedade de processos celulares, incluindo morfologia celular, agregação e comunicação, proliferação, sobrevivência e esteroidogênese. Além disso fornece suporte estrutural para a formação e maturação do folículo, a ECM atua como um reservatório para sinais parácrinos e endócrinos dentro do ovário e permite ou restringe seu acesso a células dentro do folículo (WOODRUFF et al., 2007).

2.7 Insulina

A insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans e mantém os níveis normais de glicose no sangue, facilitando a captação celular de glicose, regulando o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e promovendo a divisão e crescimento celular através de seus efeitos mitogênicos (WILCOX et al., 2005). Este hormônio ainda está relacionado a regulação celular, crescimento e desenvolvimento em uma ampla variedade de tecidos, incluindo o fígado, músculo, cartilagem, glândulas mamárias (SASAKI et al., 2002) e na regulação da atividade ovariana (PONCHIROLLI, 2003).

A insulina desempenha vários efeitos sobre a reprodução dos animais domésticos, em bovinos foi observado que estimula a esteroidogênese, maturação do oócito e desenvolvimento embrionário (YASEEN et al., 2001). A sua associação com alguns fatores de crescimento com o KL e LIF, permitiu o desenvolvimento de folículos primordiais para folículos primários (PARROTT; SKINNER, 1999; NILSSON et al., 2001), além disso foi observado em camundongos que a insulina diminui a expressão gênica de fatores que induzem a apoptose sobre estresse oxidativo (SHEN et al., 2012).

Os receptores de insulina (IR) pertencem a uma família de receptores com atividade intracelular de tirosina-quinase (CARVALHEIRA et al., 2002). Estes receptores foram localizados no ovário (EL-ROEIY et al., 1994) nas células estromais (PORETSKY et al., 1984), células da granulosa e na teca dos folículos em desenvolvimento (HERNANDEZ et al., 1992; EL-ROEIY et al., 1993). O gene para o receptor de insulina está localizado em uma curta região do cromossomo 19 (SEINO et al., 1990).

A ligação da insulina à subunidade α , do IR, permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando à alteração conformacional e fosforilação do substrato dos receptores de insulina (IRS-1/-2), que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (LAWRENCE et al., 2007). Uma vez fosforilado, o IRS-1/-2 interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de fosforilação e defosforilação (CHEATHAM; KAHN, 1996). Em adição à ativação da PI3K, a proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) também é fosforilada após a ligação da insulina ao seu receptor (CHEATHAM; KAHN, 1996; WHITE et al., 1996). A ativação do MAPK é responsável pelos efeitos no crescimento promovidos pela insulina (LAWRENCE et al., 2007) (Fig.4).

Alguns estudos demonstram o efeito da insulina no CIV de folículos ovarianos, isolados ou *in situ*, em diversas espécies: Em bovinos (ROSSETO et al., 2016), caprinos (CHAVES et al. 2011) e equinos (AGUIAR et al., 2016), a concentração de 10 ng/mL permitiu o aumento

viabilidade e sobrevivência no CIV em folículos pré-antrais. Com relação ao crescimento de folículos pré-antrais, foi determinado que a mesma concentração (10 ng/mL) atua induzindo a formação de antro na espécie bovina, após 13 dias de cultivo, (MCLAUGHLIN et al., 2010; ITOH et al., 2002) e em ovinos, a insulina permitiu o desenvolvimento embrionário (ARUNAKUMARI et al., 2010).

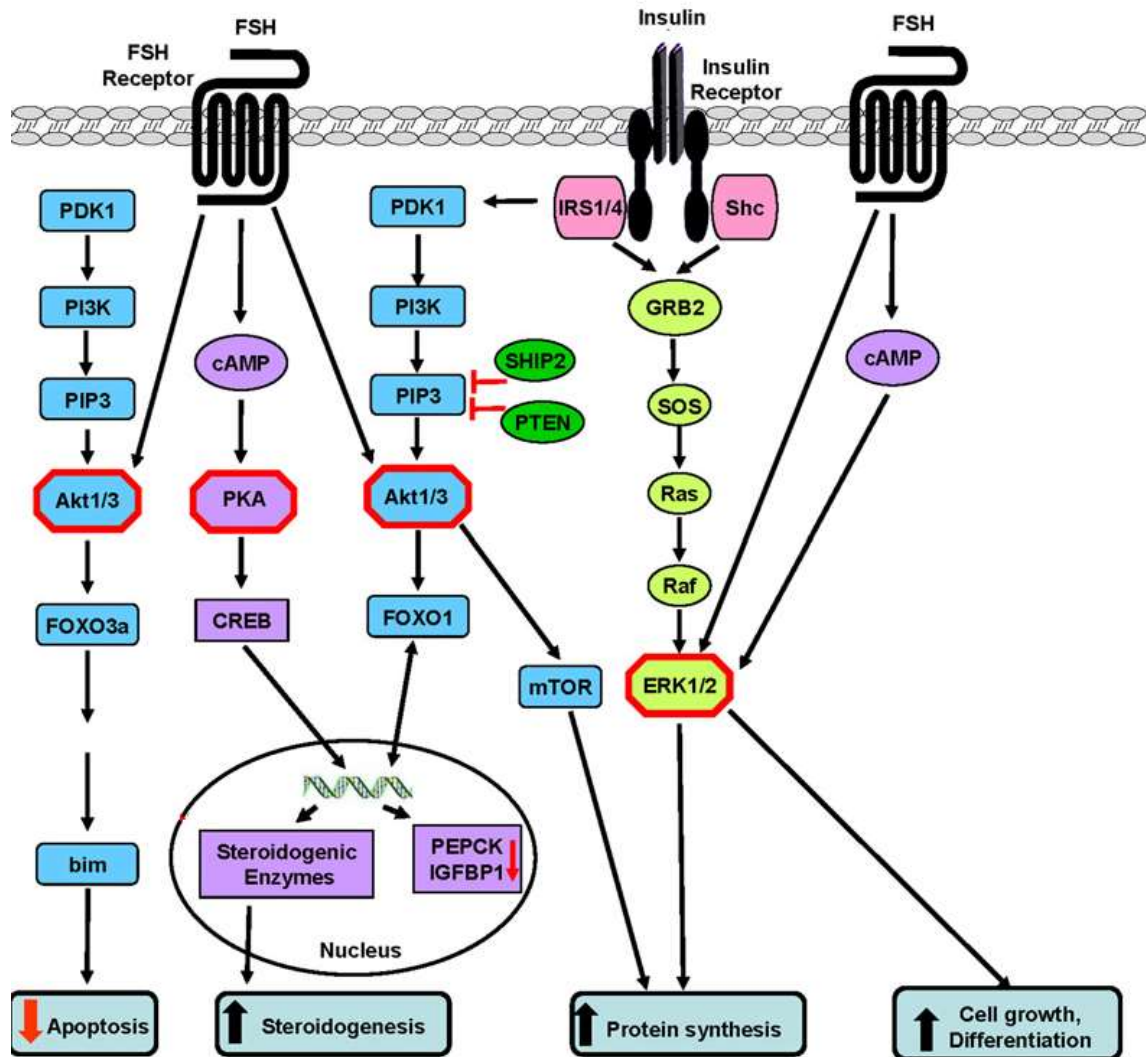


Figura 4 - Via de sinalização da insulina: Ligação da insulina e do FSH aos seus receptores regulando a apoptose, esteroidogênese, síntese proteica e crescimento celular. (Fonte: Dupont & Scaramuzzi, 2016, com modificações).

Em altas concentrações, a insulina parece ter um efeito tóxico nas células foliculares. Esta hipótese foi apoiada por estudos recentes que relataram que um meio de cultura básico contendo 10 mg/mL de insulina, não foi capaz de manter a integridade ultraestrutural e viabilidade dos folículos pré-antrais caprinos durante os estágios iniciais da foliculogênese (CHAVES et al., 2010). Este efeito pode estar relacionado com a resistência, manifestada ao

nível celular, por meio de defeitos pós-receptor na sinalização da insulina. Os possíveis mecanismos incluem regulação negativa, deficiência ou polimorfismos genéticos da fosforilação da tirosina do receptor de insulina, e dos substratos formados após a ligação da insulina ao seu receptor ou ainda podem envolver anormalidades da função do transportador de glicose 4 (GLUT 4) (WHEATCROFT et al., 2003).

A insulina age sinergicamente com FSH para promover a diferenciação e proliferação de células da granulosa, além disso, esta interação de hormônios estimula a esteroidogênese (DULEBA et al., 1997). Em bovino, o cultivo de células da granulosa com insulina e FSH aumentou os estímulos para a produção do mRNA para CYP19A1 (SILVA et al., 2000) e, em caprinos, a interação permitiu a ativação, desenvolvimento folicular e aumento da viabilidade (CHAVES et al., 2012). A partir destes estudos é possível supor que a associação da insulina e FSH pode estimular o desenvolvimento folicular na espécie ovina no CIV de fragmentos do córtex ovariano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do hormônio insulina sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de insulina no cultivo de folículos pré-antrais ovinos inclusos no tecido ovariano, tendo como parâmetros a ativação, morfologia e o diâmetro folicular e identificação do antígeno de proliferação celular (PCNA).

Investigar o efeito da insulina, na presença ou ausência de FSH no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos inclusos em tecido ovariano, sobre a ativação, morfologia, proliferação celular e a expressão de genes relacionados à esteroidogênese (*CYP17* e *CYP19*) e apoptose (*Caspase 3*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os produtos químicos e reagentes utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), salvo indicação em contrário.

4.2 Desenho experimental

O fluxo das análises do efeito hormonal sobre o folículo permitiu separar o experimento em: experimento 1 e experimento 2.

4.2.1 Experimento 1: Determinação das concentrações de insulina no cultivo *In Vitro* (CIV) dos folículos inclusos no córtex ovariano

Para a determinação das concentrações, o meio base foi suplementado com insulina, derivada de pâncreas bovino, em seis diferentes concentrações (0, 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 ng/mL), com base em estudos que objetivaram avaliar o efeito das concentrações de insulina no CIV de folículos nas espécies equinas (AGUIAR et al., 2016), bovina (ROSSETO, et al., 2016), caprina (CHAVES et al., 2011; DIPAZ-BERROCAL et al., 2017) e de embriões na espécie ovina (LUNARD et al., 2012). Para o experimento foram utilizados 12 ovários, sendo 7 fragmentos retirados de cada ovário (n= 84 fragmentos), onde cada fragmento do mesmo ovário foi cultivado para cada concentração testada. Após o cultivo os folículos foram submetidos à análise morfológica e avaliação *in situ* do desenvolvimento folicular.

4.2.2 Experimento 2: Avaliação da associação da insulina com FSH no CIV dos folículos inclusos no córtex ovariano.

Neste experimento, as concentrações de insulina com melhor resultado no primeiro experimento (1, 10 e 100 ng/mL de insulina) foram novamente utilizadas associadas ou não com FSH (Folltropin[®], Tecnopec, Brasil), na concentração fixa de 50 ng/ mL, de acordo com estudos prévios realizados na espécie ovina (ESMAIELZADEH et al., 2013) (Tab. 1).

Para o cultivo, foram utilizados 15 ovários, sendo retirados 8 fragmentos de cada ovário (n= 120 fragmentos), que foram cultivados nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 ng/mL associadas ou não ao FSH (Tab. 1).

Tabela 1- Descrição dos grupos para o cultivo do fragmento folicular com suplementação de diferentes concentrações de insulina associado ou não com FSH.

Grupo	Conc. Insulina [ng/mL]	FSH [50ng/mL]
CC	0	Ausente
IN1	1	Ausente
IN10	10	Ausente
IN100	100	Ausente
IN1FSH	1	Presente
IN10FSH	10	Presente
IN100FSH	100	Presente

CC: Grupo cultivado; IN: Insulina; FSH: Hormônio foliculo estimulante.

Após o cultivo, nove fragmentos do córtex ovariano de cada concentração da associação de insulina com FSH (72 fragmentos), foram submetidos à análise morfológica e avaliação *in situ* do desenvolvimento folicular e proliferação celular por imunohistoquímica. Seis fragmentos cultivados de cada associação de insulina com FSH (48 fragmentos) foram usados para a extração e análise de expressão gênica do mRNA dos genes promotor da apoptose (*caspase 3*) e da esteroidogênese (*CYP-17 e CYP-19*).

4.3 Coleta dos ovários

Os ovários (n= 27 ovários) de ovelhas adultas, não prenhes, independente do estágio do ciclo estral, foram obtidos em abatedouros comerciais do estado de Pernambuco. Imediatamente após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70%, seguido por duas lavagens em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 20 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES). Após a lavagem, cada par de ovário foi adicionado a tubos contendo 20 mL de meio de MEM-HEPES suplementado com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e transportados ao laboratório em caixas isotérmicas à 4 °C, nas duas horas seguintes ao abate. Todos os produtos químicos e reagentes utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), salvo indicação em contrário.

4.4 Cultura in vitro de tecido ovariano

No laboratório, foram retirados os ligamentos e tecido adiposo dos ovários e obtidos sete fragmentos (tamanhos de 3 x 3 x 2 mm) do córtex ovariano de cada par dos ovários utilizando lâminas de bisturi.

Após a fragmentação, um dos fragmentos obtidos foram fixado em formalina tamponada a 10% para posterior processamento avaliação da morfologia folicular (grupo controle não cultivado - CNC), enquanto os outros, seis fragmentos, foram submetidos ao CIV.

Os fragmentos ovarianos foram cultivados individualmente em placas de cultura de 24 poços contendo 1 mL de MEM suplementado com 0,23 mM de piruvato, glutamina (1x-GlutaMAX™-gibco), 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), solução de antibiótico-antimicótico (1x), sendo o meio de cultura denominado de α -MEM⁺.

Todos os tecidos foram cultivados durante 8 dias a 39°C com 5% de CO₂, sendo o meio de cultivo totalmente substituído por um meio fresco a cada 2 dias.

4.5 Análise morfológica e avaliação in situ do desenvolvimento folicular

Para avaliar a morfologia e desenvolvimento folicular os fragmentos foram submetidos a análise histológica de rotina. Resumidamente, os fragmentos fixados em formalina tamponada a 10%, foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificadas com xileno, e incluídos em cera de parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados com micrótomo em espessura de 5 μ m, os cortes foram montados em lâminas, corados com Hematoxilina-Eosina, e examinados em microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) sob aumento de 400X.

Para a análise do percentual de ativação, os folículos foram classificados em folículo primordial e folículo em desenvolvimento (transição, primário e secundário). Os folículos primordiais foram caracterizados pela presença de oócito esférico ou ovoide, completamente rodeado por uma camada simples de células da granulosa achatadas ou pavimentosas. Já os folículos em desenvolvimento, incluíram os em transição (com pelo menos uma célula da granulosa com o formato cúbico), primários (com uma única camada de células da granulosa de morfologia cúbica em torno do oócito) e os secundários (com oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica) (BERTOLDO et al., 2014).

Os folículos foram ainda classificados como normais, quando os oócitos encontravam-se intactos circundados por células da granulosa, bem organizadas, em uma ou mais camadas, sem núcleo picnótico, ou folículos degenerados que foram definidos quando apresentaram

oócito com núcleo picnótico, retração citoplasmática e/ou células da granulosa desorganizadas (SILVA et al., 2004).

Para avaliar o crescimento, os diâmetros do folículo foram medidos em micrômetro (μm), sendo calculados a partir da média de duas medições perpendiculares (horizontal e vertical) (JIMENEZ et al., 2016), usando um programa computacional de análise de imagens - Image J (Fiji 1.46) (FERREIRA; RASBAND, 2012). A análise foi realizada em todos os folículos identificados nas lâminas.

4.6 Avaliação imunohistoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) dos folículos e córtex ovariano.

Para análise de proliferação nuclear foram utilizados 3 fragmentos parafinados ($5\mu\text{m}$), para cada associação de insulina e FSH, do córtex ovariano de diferentes ovários.

As secções do córtex ovariano foram desparafinadas com xilol e hidratadas com etanol. Os cortes foram incubados durante a noite a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ com anti-PCNA na diluição 1:100 (PC10-sc56-mouse monoclonal- IgG_{2a}, Santa Cruz Biotechnology, Brasil) e posteriormente incubados com histofaine, sendo revelado com substrato cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). As secções foram posteriormente contrastadas com hematoxilina de Harris. Uma vez montadas, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) sob aumento de 400 e 1000X para análise das imagens.

As avaliações da expressão do PCNA presentes no córtex e dos folículos ovarianos foram realizadas através de quantificações por pixels utilizando o programa GIMP 2.8.

4.7 Quantificação da expressão gênica por PCR real time (qPCR)

4.1.1 Extração do RNA e síntese do cDNA

O RNA total foi extraído de cada fragmento do córtex ovariano após cultivo com insulina associada ou não ao FSH. Para a extração foi utilizado o TRI Reagent® (Sigma, St. Louis, EUA) segundo instruções do fabricante. Resumidamente, os fragmentos foram homogeneizados em 1 mL de TRI Reagent® e adicionados 200 μl de clorofórmio; após a separação da fase aquosa, o RNA foi precipitado em isopropanol e lavado em etanol a 75% (v/v), e eluído com 40 μL de água isenta de nucleasse. Para eliminar a contaminação do DNA genômico todas as amostras de RNA foram tratadas com RNase-Free DNase (RQ1, Promega, Madison, EUA). O RNA total foi quantificado na absorvância a 260 nm utilizando o espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences Chicago, Illinois, Estados Unidos). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1 μg de RNA total de cada amostra,

e o kit de transcrição reversa Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, EUA) segundo instruções do fabricante.

4.6.2 Expressão Gênica

As expressões para o mRNA dos genes relacionados à apoptose (*Caspase 3*) e à esterodogênese (*CYP19*, *CYP17*), anteriormente descrita por Oliveira et al. (2017), foram avaliados a partir da amplificação de segmentos dos genes com os oligonucleotídeos iniciadores relacionados na Tab. 2. A similaridade dos oligonucleotídeos para a espécie ovina foram analisadas no banco de dados do NCBI (BLAST-National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). As reações para a quantificação relativa (qPCR) foram realizadas com o kit de amplificação GoTaq® qPCR Master Mix, em termociclador (Rotor-Gene Q da Qiagen®). As reações foram realizadas em duplicadas com controle negativo para identificar reações inespecíficas.

Em cada reação foram utilizados 2,0 µL do cDNA, 7,5 µL GoTaq® qPCR Master Mix (2x), 0,5 µL de primer sense e anti-sense (10 pM) e 4,5 µL de H₂O Milli Q, totalizando um volume final de 15 µL. Os seguintes ciclos foram empregados: temperatura inicial de 95°C por 2 min (ativação da enzima), 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos (captação da fluorescência). As condições do Melting foram: temperatura rampa de 60 a 95°C, com incremento de 0,5°C/5segundos.

O gene de referência utilizado para normalizar as expressões dos genes foi o ubiquitina (UBQ), previamente descrito por Frota et al. (2011). Para determinação da expressão dos genes foi utilizado a análise de quantificação relativa calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para análise da expressão gênica pela qPCR.

Gene	Iniciadores (5' - 3')	Referência (NCBI)
Caspase 3	F: 5' AAGCCATGGTGAAGAAGGAA3' R: 5' TGTCGTCCTCAAGA3'	XM_027962551.1
CYP-17	F: 5' ACTGAATGCCTTTGCCCTGT3' R: 5' CTGATTATGTTGGTGACCGCC3'	XM_012102863.2
CYP-19	F: 5' CATCCTCAATACCAGGTCCCA3' R: 5' GGTTTCCTCTCCACATACCCA3'	NM_001123000.1
Ubiquitina	F: 5' GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT3' R: 5' ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT3	GI_57163956

4.7 Análise estatística

As análises morfométricas dos folículos (diâmetro folicular), expressão gênica e intensidade de imunomarcção de PCNA foram submetidas ao teste de Kolmogorov – Smirnov e, quando os dados não foram considerados dentro da normalidade, os valores foram transformados em logarítmo natural ou raiz quadrada e então procedeu-se a análise de variância (ANOVA), seguidas de comparações entre as médias, pelo teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls (GraphPad.Prism; versão 5.0; 2007). O diâmetro folicular foi apresentado em média \pm erro padrão da média. Resultados de ativação folicular (primordial/desenvolvimento) e morfologia (normal/degenerado) foram apresentados em percentuais e submetidos ao teste exato de Fischer. Valores foram considerados significativos quando ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: Determinação das concentrações de insulina no cultivo *in vitro* (CIV) dos folículos inclusos no córtex ovariano.

A porcentagem de folículos ativados e folículos normais no tecido não cultivados ou nos tecidos cultivados nas diferentes condições de cultura estão apresentados na (Tab.3). Após 8 dias de cultivo. Em todas as condições de cultura, a porcentagem de folículos ativados foi significativamente aumentada ($P < 0,05$), quando comparado ao controle não cultivado. A adição de insulina nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ng/mL, aos tecidos, afetaram a porcentagem de folículos ativados, quando comparados aos tecidos cultivados apenas em α -MEM (Tabela 3, $P < 0,05$). Entretanto, a porcentagem de folículos ativados não diferiu ($P > 0,05$) entre o grupo suplementado com 10.000 de insulina e o grupo sem suplementação (0 ng/mL). Os maiores percentuais de ativação foram observados quando os tecidos foram cultivados nas concentrações de 1 e 100 ng/mL do hormônio ($P < 0,05$) (Tab.3).

Tabela 3. Percentual de folículos ativados e com a morfologia preservada após cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com diferentes concentrações de insulina.

Grupo (ng/mL)	Nº de Folículos	% Ativados	% Normais
CNC	223	47,53*	68,16*
0	187	70,05a	83,96a
1	289	86,51de	91,35b
10	135	80,74bcd	91,85b
100	130	91,54e	90,0ab
1.000	152	82,89cd	88,82ab
10.000	141	78,72abc	87,94ab

ab: Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa entre as concentrações ($P < 0,05$); *Diferença significativa com todos os tratamentos; CNC: Controle não Cultivado.

A porcentagem de folículos morfológicamente normais foi significativamente maior ($P < 0,05$; Fig. 5) para os tecidos cultivados em 1 e 10 ng/mL de insulina comparado aos tecidos cultivados apenas em α -MEM⁺. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada comparada as outras concentrações de insulina (100, 1.000 e 10.000 ng/mL) (Tab. 3).

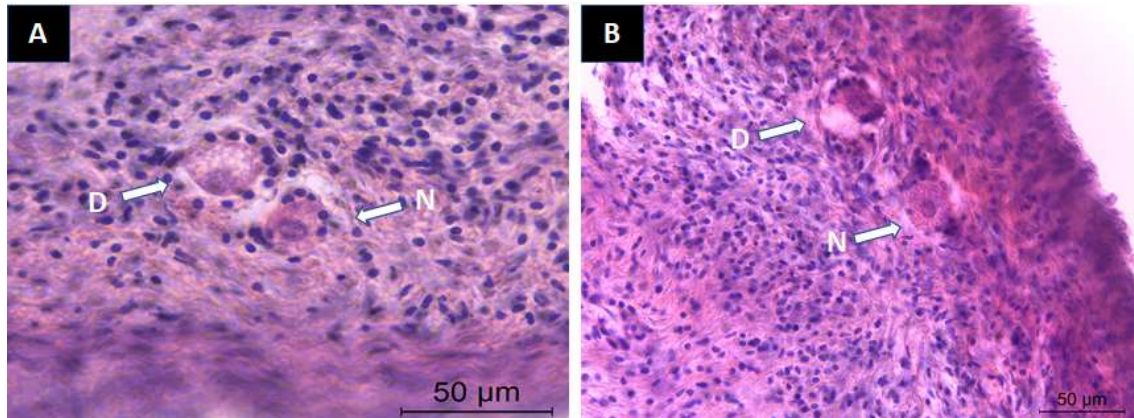


Figura 5- Análise histológica de fragmentos ovarianos ovinos corados com hematoxilina e eosina, após 8 dias de cultivo com insulina. Imagem (A) e (B). Folículo degenerado (D), folículo normal (N).

Os diâmetros foliculares foram mensurados e estão apresentados na figura 6. Quando comparado com os tecidos cultivados apenas em α -MEM⁺, nenhuma diferença significativa no diâmetro de folículos unilaminares, isto é folículos primordiais, transição e primário, foi observado quando os tecidos foram cultivados por 8 dias em todos os meios testados ($P > 0,05$), exceto quando os tecidos foram cultivados com 10.000 ng/mL de insulina. Nesta concentração de insulina (10.000 ng/mL), houve uma redução significativa no diâmetro folicular quando comparado aos tecidos cultivados apenas em α -MEM⁺ e ⁺ e nas categorias em transição e primário na concentração 1 ng/mL ($P < 0,05$). Quando comparado entre as diferentes concentrações de insulina após 8 dias, o diâmetro folicular (folículo transição e primário) foram maiores quando os tecidos foram cultivados em 1 e 1.000 ng/mL ($P < 0,05$) do que quando cultivados na concentração de 10.000 ng/mL; entretanto, não houve diferença entre os folículos cultivados em 1, 10, 100 ou 1.000 ng/mL ($P > 0,05$) foi observada a diminuição do diâmetro folicular ($P < 0,05$). Quando os fragmentos foram submetidos com a suplementação do hormônio na concentração de 10 μ g/mL foi observado a diminuição do diâmetro folicular ($P < 0,05$), quando comparado com as categorias primordial, transição e primário do grupo cultivado sem insulina (0 μ g/mL), com categorias transição e primário do grupo 0,001 μ g/mL, categoria primário do grupo 0,1 μ g/mL e as categorias transição e primário do grupo 1 μ g/mL de insulina (Fig.6).

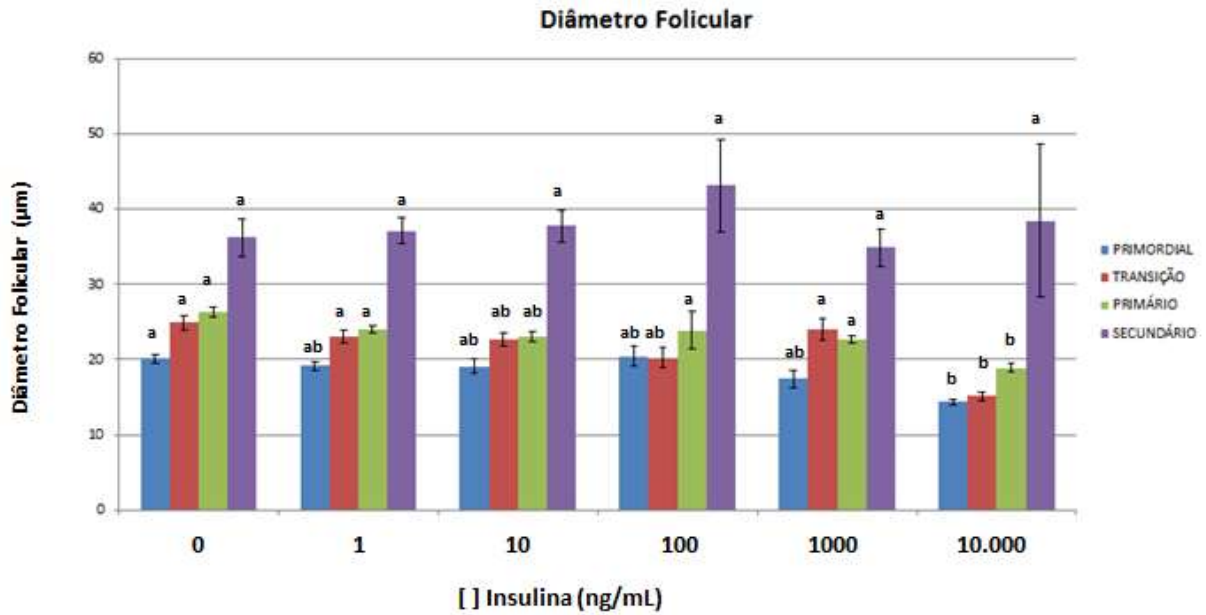


Figura 6. Diâmetro médio dos folículos de acordo com a categoria, após 8 dias de cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com diferentes concentrações de insulina.

a,b: Diferença significava entre as mesmas categorias foliculares nas diferentes concentrações de insulina com $P < 0,05$.

5.2 Experimento 2: Avaliação da associação da insulina com FSH no CIV dos folículos inclusos no córtex ovariano.

A porcentagem de folículos ativados e morfológicamente normais dos tecidos cultivados e não cultivados estão apresentados na (Tab. 4). Após 8 dias de cultivo com as concentrações de insulina (1, 10 e 100 ng/mL) associado com ou não com FSH, apresentaram uma maior ativação ($P < 0,05$) nos grupos IN10, IN1FSH, IN10FSH e IN100FSH.

Do mesmo modo, a porcentagem de folículos morfológicamente normais foi significativamente maior na concentração de 10 ng/mL com e sem FSH (IN10 e IN10FSH) ($P < 0,05$) quando comparado aos outros grupos cultivados (Tab.4). Com relação ao crescimento folicular e do oócito, avaliados através da medição do diâmetro, foi observado que não houve diferença significativa entre as associações dos hormônios ($P > 0,05$) sobre os folículos primordiais, transição, primário e secundário.

Tabela 4 - Percentual de folículos ativado e com a morfologia preservada após cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com diferentes concentrações de insulina associada com FSH.

Grupos	Nº de folículos	% Normais	% ativados
CNC	150	83,33*	84*
CC	106	78,30 a	75 a
IN 1	112	77,68 a	78,8 a
IN 10	184	93,48 b	90,8 b
IN 100	91	81,32 a	79,1 a
IN 1 FSH	88	81,82 a	92 b
IN 10 FSH	122	95,90 b	90,2 b
IN 100 FSH	100	76,00 a	96 b

a,b: Nas colunas representa diferença significativa entre as concentrações ($P < 0,05$); *****Diferença significativa com todos os tratamentos; **CNC:** Controle não Cultivado.

A imunorreatividade para PCNA foi observada no oócito de folículos em todos os estágios de desenvolvimento (primordial, transição, primário e secundário; Fig. 8 A-F), em todos os grupos experimentais. Entretanto, a marcação nas células da granulosa foi observada apenas no grupo não cultivado (CNC) (Fig. 8A). A análise do pixel para marcação do PCNA no córtex ovariano demonstrou que os grupos IN1FSH, IN10FSH e IN100FSH apresentaram maior taxa de pixel para análise por imunohistoquímica, para determinação a localização do PCNA, permitiu identificar que o antígeno de proliferação estava presente no oócito em todos os grupos IN1FSH, IN10FSH e IN100FSH apresentaram maior taxa de pixel para imunorreação positiva para PCNA quando comparado aos tratamentos cultivados ($P < 0,05$) (Graf. 8).

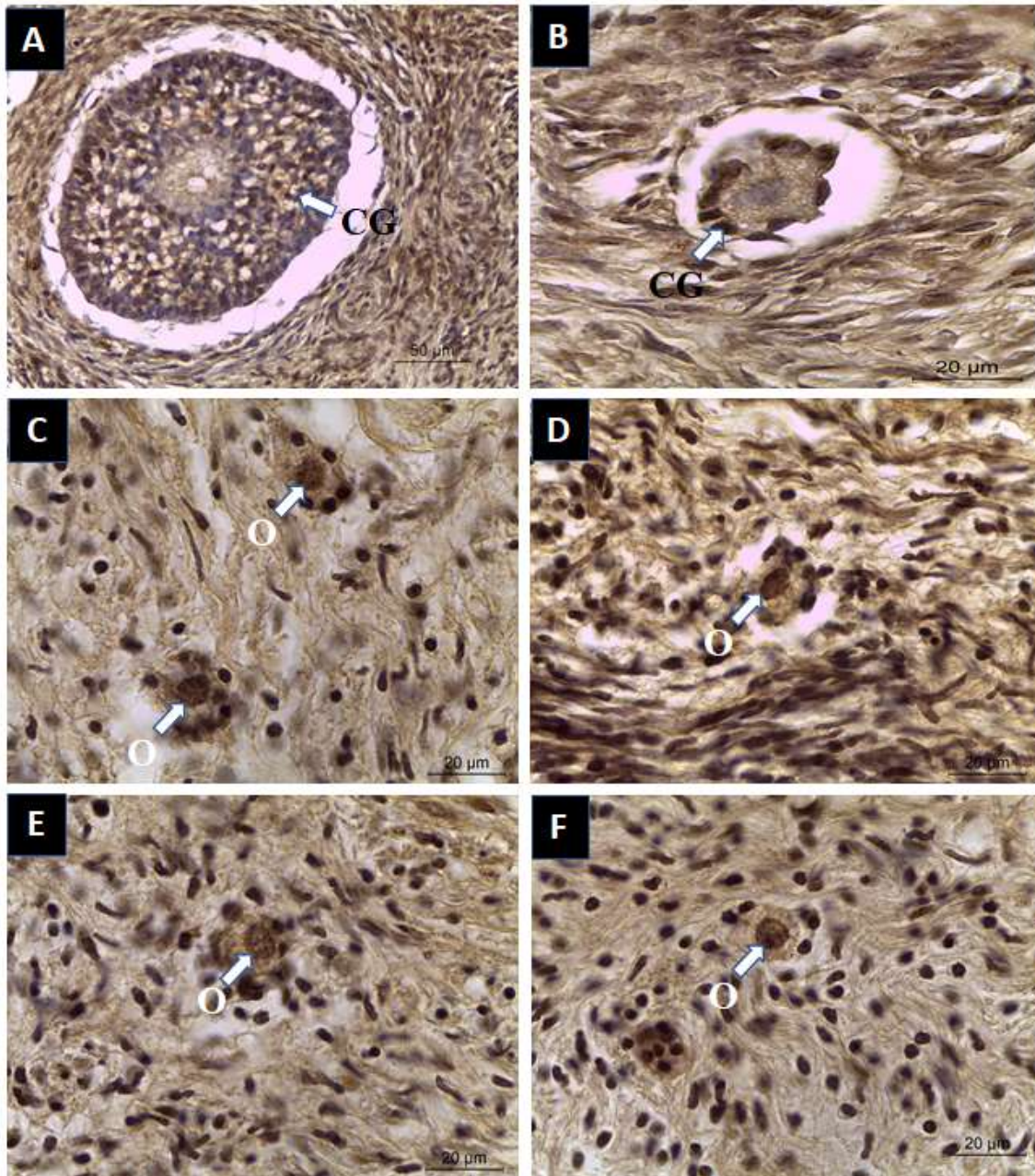


Figura 7 - Marcação do antígeno de proliferação celular (PCNA) por imunohistoquímica; Controle não cultivado (A e B), tratamento insulina (C e D), tratamentos insulina + FSH (E e F). Marcação positiva; célula da granulosa (CG), oócito (O). Imagem A (400X); imagem B, C, D, E, F (1000X).

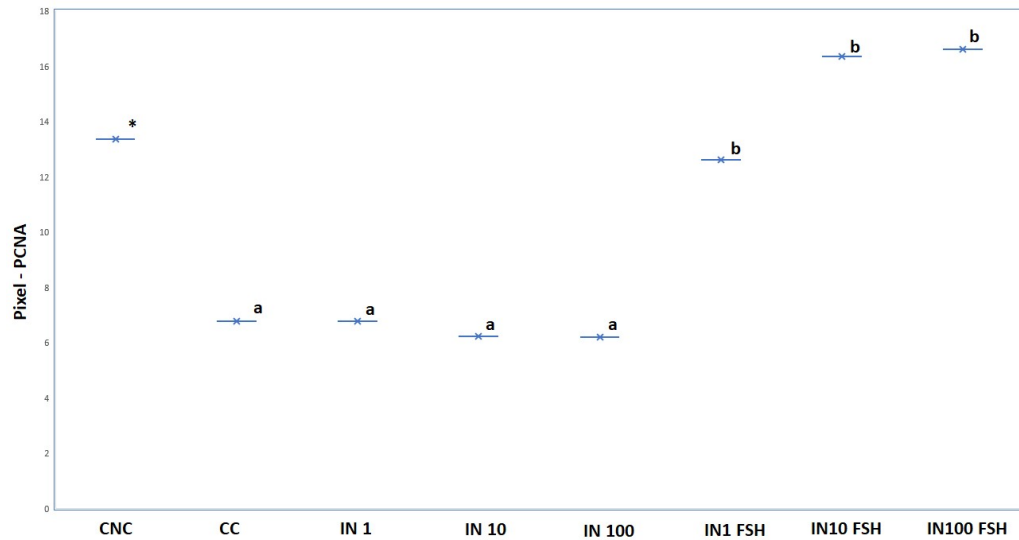


Figura 8 - Detecção do pixel da marcação do PCNA no cortex folicular, após cultivo de fragmentos ovarianos de ovelhas com as associações de insulina com FSH.

a,b: No gráfico representa diferença significativa entre as concentrações ($P < 0,05$); *Diferença significativa com todos os tratamentos; CNC: Controle não Cultivado.

A análise da quantificação relativa para determinação dos níveis de expressão do mRNA para os genes *caspase 3*, *CYP17* e *CYP19* demonstrou que foram evidenciadas a expressão dos genes em estudo (Fig. 9). Os grupos IN10, IN100, IN10FSH e IN100FSH apresentaram menor expressão do mRNA do gene *caspase 3* com relação ao grupo IN1FSH ($P < 0,05$), entretanto entre os outros grupos não foram identificadas diferenças significativas ($P > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os genes *CYP17* e *CYP19* nos grupos analisados ($P > 0,05$). O mRNA para o gene da *caspase 3* no grupo CNC apresentam baixos níveis de expressão o qual impossibilitou a sua análise.

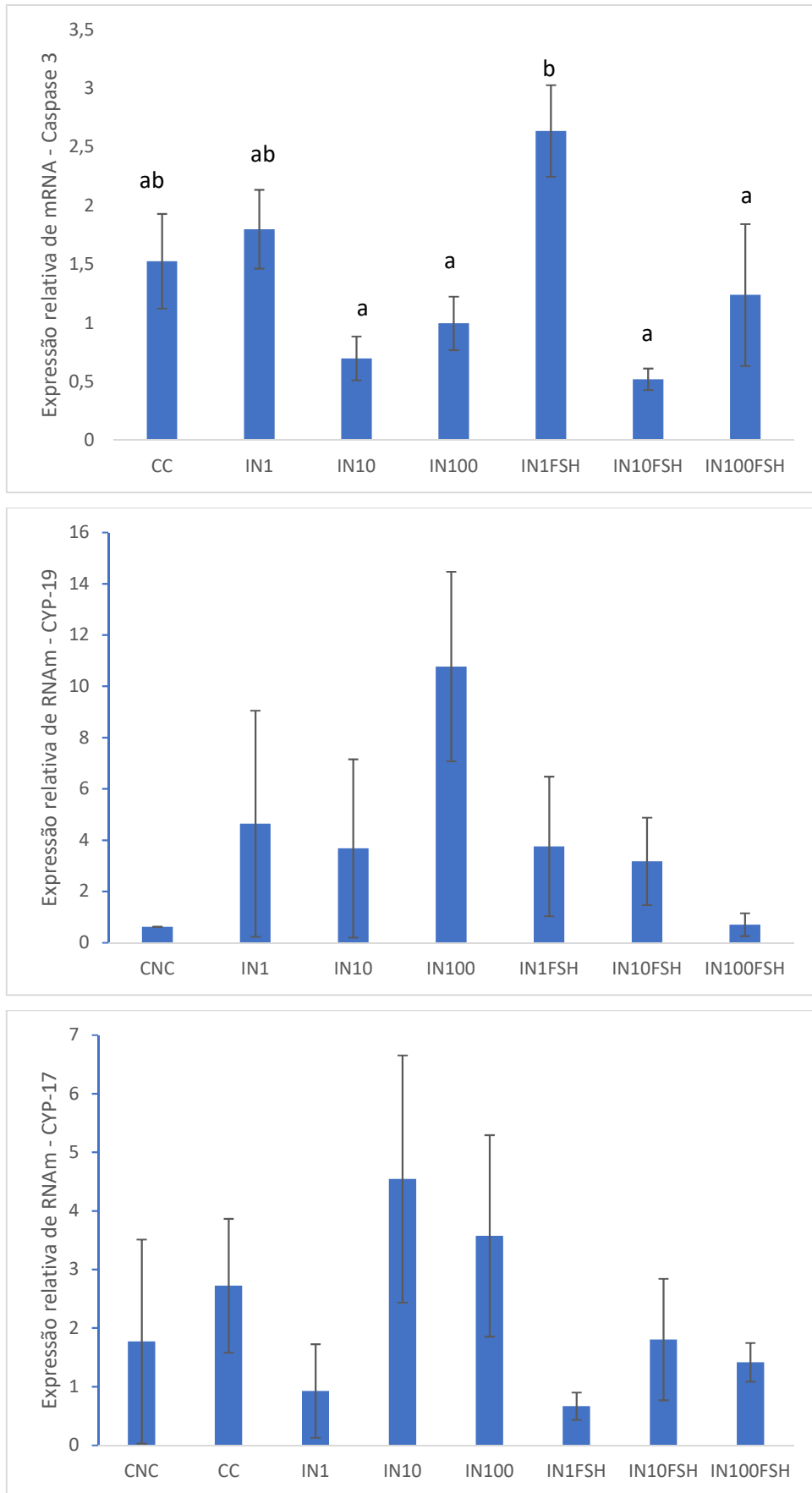


Figura 9 - Quantificação relativa do mRNA para os genes da caspase-3, CYP-19 e CYP-17 no fragmento do córtex ovariano após cultivo com insulina associada ou não ao FSH

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a insulina afeta o desenvolvimento de folículos ovarianos cultivados *in vitro* na espécie ovina, especialmente sobre a ativação e morfologia dos folículos após os 8 dias de CIV dos fragmentos ovarianos. Este é um dado importante porque até agora curvas de concentração e sua associação com o FSH ainda não havia sido demonstrado.

Em nosso estudo a insulina sozinha permitiu a ativação dos folículos primordiais no CIV, poucas substâncias estudadas demonstraram esta capacidade, especialmente em meio isento de gonadotrofinas, soro fetal bovino e de outros fatores fundamentais ao processo do desenvolvimento folicular (CORTVRINDT et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2011; LUZ et al., 2012). Ao comparar o meio base de cultivo utilizado em nosso estudo (α -MEM⁺) aos meios de cultivo que determinaram a influência da insulina sobre o crescimento nas outras espécies, não suplementamos com componentes como FSH, selênio, transferrina, ácido ascórbico e hipoxantina, os quais associados com a insulina poderiam regular o crescimento folicular (CECCONI et al., 1999; DURLEJ et al., 2008; SARAIVA et al., 2008; ROSSETO et al., 2009; MONDAL et al., 2015).

A insulina tem sido implicada na ativação de folículos ovarianos primordiais através da sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), estimulada pela ligação da insulina ao seu receptor, esta via ao ser ativada permite a formação de substratos que atuam sobre o crescimento, diferenciação celular, diminuição da apoptose e aumento da síntese proteica (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016), com isso, sugerimos que a sinalização da via PI3K esteja relacionado aos resultados deste estudo. Entretanto, há a necessidade da realização de novos experimentos para elucidar os mecanismos pelos quais a insulina influencia o desenvolvimento folicular na espécie ovina.

O menor diâmetro folicular observado nas categorias iniciais do desenvolvimento folicular (primordial, transição e primário) no grupo suplementado com 10.000 ng/mL quando comparado às outras concentrações, bem como a ativação folicular deste grupo não ter sido diferente do grupo sem suplementação de insulina, sugere que a insulina em altas concentrações, no CIV de folículos ovarianos na espécie ovina, não promove a ativação e inibe o crescimento inicial dos folículos. Este efeito hiperinsulínico já foi demonstrado por Chaves et al. (2011), que determinaram que a suplementação de insulina no cultivo de folículos pré-antrais isolados da espécie caprina, na concentração de 10.000 ng/mL, diminui a taxa de formação do antro e a sobrevivência folicular. Também Dipaz-Berrocala et al. (2017) observaram que o cultivo de folículos caprinos inclusos no córtex ovariano com baixa

concentração de insulina (10 ng/mL) comparado com altas concentrações (10.000 ng/mL) permitiu um maior percentual de folículos normais.

O efeito sobre o crescimento e ativação que a alta concentração de insulina promove, no CIV de folículos da espécie ovina, pode estar relacionado ao bloqueio da via PI3K, uma vez que níveis elevados do hormônio podem regular negativamente esta via pela hiperestimulação da fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) afetando com isso o crescimento e diferenciação celular (WIJESEKARA et al., 2005; SLEEMAN et al., 2005). Apesar dos efeitos que a alta concentração de insulina promoveu nos folículos, o hormônio preservou a morfologia folicular, após o CIV, em todas as concentrações que os fragmentos ovarianos foram submetidos.

No primeiro experimento, o maior percentual de folículos normais nos grupos submetidos ao cultivo com baixas concentrações de insulina (1 e 10 ng/mL), em relação ao grupo sem suplementação, e a não diferença dos outros grupos, indica que o hormônio contribuiu para a manutenção da morfologia folicular após os oito dias de CIV. Da mesma forma, nas espécies bovina (ROSSETO et al., 2016) e equina (AGUIAR et al., 2016), a insulina permitiu a sobrevivência de folículos pré-antrais após o CIV, obtendo os melhores resultados na concentração de 10 ng/mL, em ambas as espécies.

O destaque das concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL de insulina, no primeiro experimento com relação a ativação e morfologia, permitiu estudar a associação destas concentrações de insulina com FSH no segundo experimento. A partir dos resultados dos cultivos com as associações observou-se que o FSH potencializou o efeito da insulina, em todas as concentrações, sobre a ativação dos folículos primordiais. Chaves et. al., (2012) demonstraram que a associação de insulina a 10 ng/mL com FSH (IN10FSH) permitiu o desenvolvimento e sobrevivência folicular e maiores níveis de CYP19 em folículos isolados de caprinos. A concentração de insulina referente ao grupo IN1 apresentou o mesmo percentual de ativação de todas as associações das concentrações de insulina e FSH (IN1FSH, IN10FSH e IN100 FSH).

A suplementação da insulina sozinha ou associada ao FSH, após os oito dias de cultivo, não possuiu efeito de promover o aumento do diâmetro folicular, podendo-se admitir que o hormônio sozinho não tem ação direta na promoção do crescimento folicular na espécie ovina, nas condições dos experimentos. O mecanismo pelo qual a concentração do hormônio atua, sobre o crescimento no CIV, parece ser espécie específica. Em caprinos esta ação foi observada na concentração de 10 ng/mL de insulina associada ao FSH (CHAVES et al., 2012), na mesma espécie Dipaz-Berrocala et. al. (2017) demonstraram que a insulina nas concentrações de 10 e 10.000 ng/mL associada ou não há fatores de crescimento não apresentaram diferença no

diâmetro folicular. Contudo, na espécie bovina, nas concentrações de 5 e 10 ng/mL (ROSSETO et.al., 2016) e na equina, na concentração de 10 ng/mL (AGUIAR et al., 2016), foi observada esta ação.

Estudos prévios demonstraram que o FSH na concentração de 50 ng/mL no cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano ovino (ESMAIELZADEH et al. 2013) e a associação de insulina com FSH no CIV de folículos isolados em caprinos (CHAVES et al., 2012), promoveram o aumento do diâmetro folicular e do oócito. No entanto em nossos experimentos, estes efeitos dos hormônios sobre o folículo não foram observados.

O antígeno do PCNA não foi identificado nas células da granulosa em nenhum dos tratamentos do segundo experimento, no entanto, no grupo controle não cultivado (CNC), no qual o fragmento do córtex representaria as condições fisiológicas da ovelha no momento da coleta, foram observadas marcações positivas nestas células. Este resultado indica que as condições fisiológicas nas quais os folículos se encontram, possuem fatores que podem promover a proliferação nuclear das células da unidade folicular (OKTAY et al., 2000). O cultivo com todas as associações de insulina e FSH resultou em uma maior percentagem de células marcadas para PCNA na matriz extra folicular, o que, de uma maneira indireta, poderia representar a influência destas células sobre o desenvolvimento e a preservação da morfologia folicular.

Apesar dos oócitos de folículos em transição e primário cultivados com a insulina sozinha ou associada com FSH apresentarem marcação positiva para o PCNA, parece que este evento não está relacionado à sua função de crescimento e atividade de ciclo celular (WANDJI et al., 1996), pois os tratamentos não permitiram o crescimento folicular nem proliferação da granulosa, mas sim a identificação e reparo de danos ao DNA (DOWNEY et al., 1990) durante a sua síntese na fase S (BRAVO; BRAVO 1987; TAN et al., 1987). Dipaz-Berrocalá et al. (2017) identificaram que o cultivo do córtex ovariano da espécie caprina suplementado com insulina, nas concentrações de 10 e 10.000 ng/mL, associado ou não com fatores de crescimento, também resultou em marcações do PCNA no oócito mas não nas células da granulosa. Após avaliação dos resultados das análises histológicas e da imunohistoquímica pode-se supor que a insulina, na espécie ovina, permite uma modificação na morfologia das células da granulosa, do formato pavimentoso para cúbico, sem afetar o desenvolvimento folicular por não permitir a identificação do PCNA nessas células.

Apesar dos resultados da expressão do mRNA do gene promotor da apoptose (*caspase 3*) demonstrar que a diferença está relacionado aos grupos IN10, IN100, IN10FSH e IN100FSH com relação a IN1FSH, parece haver uma tendência da insulina na concentração de 10 ng/mL com e sem FSH (IN10 e IN10 FSH) sobre os níveis baixos do mRNA para a *caspase 3*. Quanto menor os níveis da caspase nos tecidos, menor será os efeitos da degeneração dos folículos por apoptose (HUSSEIN, 2005). Estudos prévios demonstraram que há uma regulação da insulina e FSH sobre a morte celular por estimular a sinalização da via PI3K/AKT (FAN et al., 2008). Estes efeitos foram demonstrados, no CIV, sobre a manutenção da morfologia e viabilidade folicular em diversas espécies; em caprinos (associada com FSH - CHAVES et al, 2012; e associado com fatores de crescimento DIPAZ-BERROCAL et al., 2017), bovinos (ROSSETO et al., 2013) e equinos (AGUIAR et al., 2016).

Ao quantificarmos os genes da esteroidogênese, observamos uma grande variação na expressão do mRNA para CYP17 e CYP19, impossibilitando determinar seus níveis em relação aos tratamentos hormonais. Esta variação está relacionado a variação da classe folicular presente nos tecidos cultivados e não cultivados o que permitiria expressar níveis diferentes de mRNA. Apesar disso, é possível estabelecer que há uma atividade inicial na produção de esteroides. Chaves et al. (2012) demonstraram que a associação de insulina com FSH no CIV de folículos pré-antrais isolados de caprino, aumentou os níveis de mRNA para o gene CYP19.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitiram concluir que a suplementação de insulina no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de ovelhas, sozinha ou associada com FSH atua de forma dose-dependente na ativação folicular, preservando a morfologia, mas sem alterar o diâmetro folicular. Em alta concentração (10.000 ng/mL), a insulina possui efeito inibitório sobre o crescimento inicial dos folículos. Conclui-se, ainda, que a insulina pode reduzir a expressão de genes relacionados com a apoptose (*caspase 3*), quando em concentrações intermediárias (10 e 100 ng/mL) e especialmente associadas ao FSH.

8 REFERÊNCIAS

AFSHAR, A.; NASR-ESFAHANI, M.H. Role of Follicle Stimulating Hormone in the Survival, Activation and Further Growth of *in vitro* Cultured Sheep Primordial Follicles Iranian. **Journal of Applied Animal Science**, v.3, n.4, p. 785-790, 2013.

AGUIAR, F.L.N.; LUNARDI, F.O.; LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.P.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CIBIN, F.W.S.; RODRIGUES, A.P.R.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. Insulin improves *in vitro* survival of equine preantral follicles enclosed in ovarian tissue and reduces reactive oxygen species production after culture. **Theriogenology**, v. 85, p. 1063–1069, 2016.

ANDRADE, E. R.; ADDOX-HYTTEL, P.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SILVA, J. R. V.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Ultrastructure of Sheep Primordial Follicles Cultured in the Presence of Indol Acetic Acid, EGF, and FSH. **Veterinary Medicine International**, Article ID 670987, 7 pages, 2011.

ARAÚJO, V.R. **Estudo dos fatores que afetam a eficiencia do cultivo *in vitro* de foliculos pre-antrais caprinos e bovinos: efeito do regime de troca, meios de cultivo de base e suplementos**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Programa de Pos-graduacao em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Ceará. 290f. 2013.

ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G.; WYLLIE, A.H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **Am J Pathology**. n.136, p. 593–608, 1990.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, n.5, p. 884-94, 2010.

BERTOLDO, M. J.; DUFFARD, N.; BERNARD, J.; FRAPSAUCE, C.; CALAIS, L.; RICO, C.; MERMILLOD, P.; LOCATELLI, Y. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n.3–4, p. 124–134, 2014.

BRAVO, R.; MCDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin roliferating cell nuclear antigen during the cell-cycle-association with DNA-replication sites. **The Journal of Cell Biology**. v. 105, n. 4, p. 1549-1554, 1987.

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 & Development**. v.81, n.7, p. 636-645, 2014.

BRUNO J.B. **Utilizacao de soro no cultivo *in vitro* de foliculos pre-antrais caprinos**. Dissertacao (Mestrado em Ciencias Veterinarias), Programa de Pos-graduacao em Ciencias Veterinarias, Universidade Estadual do Ceará. Ceará. 66f., 2006.

CARSON, R.S.; FINDLAY, J.K.; CLARKE, I.J.; BURGER, H.G. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of avarian follicles. **Biology Reproduction**, v. 24, p.105–113, 1981.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n.4, p. 419-425, 2002.

CAVALCANTE, A.Y.P. ; GOUVEIA, B.B.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.G.; SANTOS, L.P.; GONÇALVES, R.J.S.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T. Kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue. **Zygote**, v.24 , ed. 4, p. 578-582, 2016.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**. v. 60, n.3, p. 594–601,1999.

CELESTINO, J.J.H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R. N. MARTINS,F. S.; ALMEIDA, A. P.; CUNHA, R. M.S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V. BAO; S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-State Level of Kit Ligand mRNA in Goat Ovaries and the Role of Kit Ligand in Preantral Follicle Survival and Growth In Vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 231–40, 2010.

CELESTINO, J.J.H.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; LIMA, L.F.; NAME, K.P.O.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Reproductive Sciences** v.16, p.239–46, 2009.

CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.; FAUSTINO, L.R.; OLIVEIRA, K.P.; CAMPELLO, C.C.; LOPES, C.A. et al. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. **Cell and Tissue Research**, v. 346, p. 451–6, 2011.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; RODRIGUES, G.Q.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; LOPES, C.A.P.; ALMEIDA, A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MOURA, A.A.A.; LOBO, C.H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The Effects of Insulin and Follicle-Simulating Hormone (FSH) During In Vitro Development of Ovarian Goat Preantral Follicles and the Relative mRNA Expressionfor Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 69, p. 1–11, 2012.

CHAVES, R.N.; LIMA-VERDE, I.B.; CELESTINO, J.J.H.; DUARTE, A.B.G; ALVES, A.M.C.V.; MATOS, M.H.T. et al., Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology** , v. 39, n.4, p. 249–58, 2010.

CHEATHAM, B.; KAHN, C.R. The biochemistry of insulin action.. In: LeRoith D., Taylor S.I. & Olefsky J.M. Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text. **Philadelphia: Lippincott-Raven**, p. 139-147, 1996.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. **Human Reproduction**. v. 12, n. 4, p.759-768, 1997.

D.M. MAGALHÃES, D.D.; FERNANDES, V.R.; ARAUJO, A.P.; ALMEIDA, M.H.T.; MATOS; J.R. FIGUEIRED, DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p. 35–79, 1991.

DANIEL, B.; MARTINEZ-ARGUELLES, A.B.C., Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. **Steroids Journal**, v. 75, p. 467–476, 2010.

DIPAZ-BERROCAL, D.J.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO, D.D.; CELESTINO, J.J.H.; LEIVA-REVILLA, J.; ALVESA, B.G.; ALVESA, K.A.; SANTOS, R.R., CIBIND, F.W.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Refining insulin concentrations in culture medium containing growth factors BMP15 and GDF9: An in vitro study of the effects on follicle development of goats. **Animal Reproduction Science**, v. 185, p. 118–127, 2017.

DOWNEY, K.M.; TAN, C.K.; SO, A.G. DNA polymerase delta: a second eukaryotic DNA replicase. **Bioessays**, v. 12, n.5, p. 231–236, 1990.

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

DUGGABATTI, R.; JANARDHAN, K.; SINGH, J.; SINGH, B.; BARRETT, D.M.W.; DAVIES, K.L.; BAGU, E.T.; RAWLINGS, N.C., Patterns of expression of steroidogenic enzymes during the first wave of the ovine estrous cycle as compared to the preovulatory follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 345–352, 2006.

DULEBA, A.J.; SPACZYNSKI, R. Z.; OLIVE, D.L.; BEHRMAN, H.R. Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. **Biology of Reproduction**; v. 56, n.5, p. 891–897, 1997.

DUPONT, J.; SCARAMUZZI, R.J.; REVERCHON, M. The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. **Animal**, v.8, n.7, p. 1031-44, 2014.

DURLEJ, M.; DUDA, M.; KNAPCZYK, K.; SŁOMCZYŃSKA, M. Effects of transferrin on aromatase activity in porcine granulosa cells in vitro. **Folia Histochem Cytobiol.** v. 46, n. 4, p.423-8, 2008.

EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; LEROITH, D.; ROBERTS JR.; C.T.; YEN, S.S. Expression of insulin-like growth factor (IGF-1 and IGF-II) and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 77, p. 1411–1418, 1993.

EL-ROEIY, A. CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; SHIMASAKI, S.; LING, N.; LE ROITH, D. ROBERTS JR.; YEN, S.S., Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF binding proteins 1–6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 78, p. 1488–1496, 1994.

FAN, H.Y.; LIU, Z.; CAHILL, N; RICHARDS, J.S. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. **Molecular Endocrinology**. v. 22, n. 9, p. 2128–2140, 2008.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. Image. **J. User Guide IJ 1. 46r**. Reviewed by Michael Schmid September/October 2012.

FIGUEIREDO, JR; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES PBD,

FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca. p.303-327, São Paulo, 2008

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**, v.9, n. 1, p. 11-25, 1999.

FIGUEIREDO, JR; CELESTINO, JJH; FAUSTINO, LR; RODRIGUES, APR Cultura in vitro de folículos pré-antrais caprinos: avanços, limitações e perspectivas. **Small Ruminant Research**, v.98, p.192-195, 2011.

FROTA, I.M.; LEITAO, C.C.F; COSTA, J.J.N.; BRITO, I.R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. **Zygote**, v.19, n.1, p.71-83, 2011.

FUKUDA, S.; ORISAKA, M.; TAJIMA, K.; HATTORI, K.; KOTSUJI, F. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAPkinase in bovine theca cells. **Journal of Ovarian Research**, v. 2, n.17, 2009.

HASHIMOTO, S.; OHSUMI, K.; TSUJI, Y. ; HARAUMA, N.; MIYATA, Y. ; FUKUDA, U.M. ; HOSOI, Y.; IRITANI, U.M.; MORIMOTO, Y. Growing porcine oocyte–granulosa cell complexes acquired meiotic competence during in vitro culture. **Journal of Reproduction and Development**, v.53, n.2, p. 379–84, 2007.

HERNANDEZ, E.R.; HURUITZ, A.; VERA, A.; PELLICER, A.; ADASHI, E.Y.; LEROITH, D. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 74, p. 419-425, 1992.

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

HSUEH, A.J.W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, n. 15, p. 707–724, 1994.

HUGHES RM, GOROSPE WG. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**. n. 129, p. 2415–2422, 1991.

HUET, C.; MONGET, P.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1025–1034, 1997.

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

JUENGEL, J.L.; QUIRKE, L.D.; TISDALL, D.J.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; MCNATTY, K.P. Gene expression in abnormal ovarian structures of ewes homozygous for the Inverdale prolificacy gene. **Biology of Reproduction**, v.62, p. 1467–1478, 2000.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. n. 26, p. 239–57, 1972.

KEZELE, P.R.; NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 192, p. 37-43, 2002.

LAWRENCE, M.C.; MCKERN, N.M.; WARD, C.W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, p. 699–705, 2007.

LEE, W.; YOON, S.; YOON, T.; CHA, K.; LEE, S.; SHIMASAKI, S.; LEE, S.; LEE, K. Effects of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on Primordial Follicular Growth in the Mouse Ovary. **Molecular reproduction and development**, v.69, p.159–163, 2004.

LI, J.; KAWAMURAB, K.; CHENG, Y.; LIU, S.; KLEIN, C.; LIU, S.; DUANC, E.K.; HSUEH, A.J.W. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.10, p. 10280-10284, 2010.

LIMA-VERDE, I.B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.472-482, 2011.

LIMA, G.N.; MAGANHIN, C.C.; SIMÕES, R.S.; BARACAT, M.C.; SASSO, G.R.; FUCHS, L.F.; SIMÕES, MDE, J.; BARACAT, E.C.; SOARES JÚNIOR, J.M. Steroidogenesis-related gene expression in the rat ovary exposed to melatonin supplementation. **Clinics**, v. 70, n. 2, 144–151, 2015.

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

LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJOBERG, J.; TUURI, T. The effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, v.6, n. 8, p. 694-698, 2000.

LUNARDI, F.O.; ARAÚJO, V.R.; FAUSTINO, L.R.; CARVALHO, A.A.; GONÇALVES, R.F.B.; BASS, C.S. et al. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2-3, p. 121–30, 2012.

LUZ, V. B.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, T. F. P.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; ALMEIDA, A. P.; CAMPELLO, C. C.; FELTRIN, C.; BERTOLINI, M.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J. R. Eight-Cell Parthenotes Originated From In Vitro Grown Sheep Preantral Follicles. **Reproductive Sciences**. v. 19, n. 11, p. 1219-1225, 2012.

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**, v.33, n.4, p.171-182, Oct./Dez. 2009.

MATOS, M.H.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.; MAIA, 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 vi-ability in vitro. **Zygote**, v.15, n.2, p. 173-182, 2007.

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

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

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

MCNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUNDY, T., FIDLER, A.E., QUIRKE, L., O'CONNELL, A., SMITH, P., GROOME, N., TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. **The Journal of Reproduction & Infertility**, S. 1, p. 54:3-16, 1999.

MEDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M.-A.; COMBETTES, L., GRANET, P., VANNIER, B., LOOSFELT, H., MIGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 2266-76, 2002.

MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, o maestro do fork de replicação. **Célula**, v.129, n. 4, p. 665-79, 2007.

MONDAL, S.; MOR, A.; REDDY, I.J.; NANDI, S.; PARAMESWARAGUPTA, P. Effect of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) and Insulin Transferrin Selenium (ITS) on *In Vitro* Maturation, Fertilization and Embryo Development in Sheep. **Brazilian Archives of biology and Technology**. v. 58, n. 4, p. 521-525, 2015.

MURAYAMA, C.; MIYAZAKI, H.; MIYAMOTO, A.; SHIMIZU, T. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 350, n.1, p. 1-9, 2012.

NILSSON, E.; PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.175, p. 123–130, 2001.

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

O'SHAUGHNESSY, P.J.; DUDLEY, K.; RAJAPAKSHA, W.R. Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.125, p. 169- 175, 1996.

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

PADMANABHAN, V.; SALVETTI, N.R.; MATILLER, V.; ORTEGA, H.H. Developmental programming: prenatal steroid excess disrupts key members of intraovarian steroidogenic pathway in sheep. *Endocrinology*, v.155, p. 3649–3660, 2014.

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

PENG, X.; YANG, M.; WANG, L.; TONG, C.; GUO Z. Cultura *in vitro* de tecido cortical ovariano de cordeiros ovinos em meio de cultura sequencial. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.27, p. 247-257, 2010.

PICTON, H.M.; TSONIS, C.G.; MC NEILLY, A.S. FSH causes a time dependent stimulation of preovulatory follicular growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Journal of Endocrinology*, v.126, p. 297–307, 1990.

PONCHIROLI, C.B. **Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular.** In: SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, São Paulo, p. 12, 2003.

PORETSKY, L.; SMITH, D.; SEIBEL, M.; PAZIANOS, A.; MOSES, A.C.; FLIER, J.S. Specific insulin binding sites in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 59, p. 809-811, 1984.

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

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

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F.S. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 37, n. 2, p. 112–3, 2009.

ROSSETTO, R.; SARAIVA, M.V.A.; BERNUCI, M.P.; SILVA, G.M.; BRITO, I.R.; ALVES, A.M.C.V.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Impact of insulin concentration and mode of FSH addition on the in vitro survival and development of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**. v.86, n. 4, p. 1137–1145, 2016.

SABBATINI, P.; LIN, J.; LEVINE, A. J.; WHITE, E. Essential role for p53-mediated transcription in E1A induced apoptosis. **Genes & Development**, v.9, p.2184–2192, 1995.

SAHMI, M.; NICOLA, E.S.; SILVA, J.M.; PRICE, C.A.; Expression of 17beta- and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**

SAMOTO, T.; MARUO, T.; LADINES-LLAVE, C.; MATSUO, H.; DEGUCHI, J.; BARNEA, E.; MOCHIZUKI, M. Insulin receptor expression in the follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression, and atresia. **Endocrine Journal**, v. 40, p.715-726, 1993.

SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SILVA, G.M.; PORFIRIO, E.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial ovarian follicle development. **Small Ruminant Research**. v.78, n. 1-3, p.87-95, 2008.

SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 423–433, 2002.

SEINO, S., SEINO, M., BELL, G.I. Human insulin-receptor gene. **Diabetes**. v.39, n. 2, p. 129-133, 1990.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryo-biology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, n.1, p. 59–72, 2000.

SHEN, M.; LIN, F.; ZHANG, J.; TANG, Y.; CHEN, W.K.; LIU, H. Involvement of the up-regulated FoxO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 25727–40, 2012.

SHIH, M.C.M.; CHIU, Y.N.; HU, M.C.; GUO, I.C.; CHUNG, B.C. Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 336, p.80–84, 2011.

SHIMIZU, T.; MURAYAMAA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA, C, TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.143–52, 2008.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Effect of FSH on steroid secretion and Messenger ribonucleic acid encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v.62, p.186–191, 2000.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Effect of FSH on steroid secretion and Messenger ribonucleic acid encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n.5, p. 186–191, 2000.

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

SLEEMAN, M.W.; WORTLEY, K.E.; LAI, K.M.; GOWEN, L.C.; KINTNER, J.; KLINE, W.O.; GARCIA, K.; STITT, T.N.; YANCOPOULOS, G.D.; WIEGAND, S.J.; GLASS, D.J. Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. **Nature Medicine**. v. 11, n. 2, p. 199–205, 2005.

SMITH, J.T. et al. Differential regulation of kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. **Endocrinology**, v.146, n.7, p.2976-2984, 2005.

SOMCHIT-ASSAVACHEEP, A.; CAMPBELL, B.K.; KHALID, M.; KENDALL, N.R.; SCARAMUZZI, R.J. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*) on folliculogenesis, the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid and the follicular levels of P450 aromatase and IRS-1, -2 and -4. **Reproduction**, v. 145, n. 4, p. 319-33, 2013.

STOCCO, C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. **Steroids**, v.73, p.473-487, 2008.

SUN, L.L.; SUN, Z.Y.; ZHANG, P.; ZHAI, X.W.; TANG, J.; PAN, Q.J. et al. Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system. **Reproductive Biomedicine**. v. 20, p. 11–25, 2010.

TAL, B.R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **R. Braw-Tal / Molecular and Cellular Endocrinology**, v.187, p. 11–18, 2002.

TAN, C.K.; SULLIVAN, K.; LI, X.Y.; TAN, E.M.; DOWNEY, K.M.; SO, A.G. Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA - polymerase delta. **Nucleic Acids Research**, v.15, n. 22, p. 9299-9308, 1987.

TANIGUCHI, F.; COUSE, J.F.; RODRIGUEZ, K.F.; EMMEN, J.M.A.; POIRIER, D.; KORACH, K.S. Estrogen receptor- α mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17 α 1 (cytochrome P450, steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase) expression. **FASEB Journal**, v.21, n.2, p. 586-595, 2007.

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

VANACKER, J.; CAMBONI, A.; DATH, C.; LANGENDONCKT, A.V.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J.; AMORIM C.A. Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: protocol for application in a clinical setting. **Fertility Preservation**, v. 96, n. 2, p. 379-383, 2011.

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

WHEATCROFT, S.B.; WILLIAMS, I.L.; SHAH, A.M.; KEARNEY, M.T. Pathophysiological Implications of Insulin Resistance in Vascular Endothelial Function. **Diabetic Medicine**. v. 20, n.4, p. 255–68, 2003.

WHITE, M.F.; LEROITH, D.; TAYLOR, S.I.; OLEFSKY, J.M. The role of IRS-1 during insulin signaling. **Diabetes Mellitus**. p. 154-160, 1996.

WIJESKARA, N.; KONRAD, D.; EWEIDA, M.; JEFFERIES, C.; LIADIS, N.; GIACCA, A.; CRACKOWER, M.; SUZUKI, A.; MAK, T.W.; KAHN, C.R. et al. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. **Molecular and Cellular Biology**. v. 25, n.3, p. 1135–1145, 2005.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 2, p. 19–39, 2005.

WILLIAMS, G.L. Suckling as regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.68, p.831-852, 1990.

WILLIS, D.; MASON, H.; GILLING-SMITH, C.; FRANKS, S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 302–309, 1996.

WOODRUFF, T.K.; SHEA, L. D. The Role of the Extracellular Matrix in Ovarian Follicle Development. **Reproductive Sciences**, v. 14, s.8, p. 6–10, 2007.

YASEEN, M.A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulinlike growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGFIR/ IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction**, v.122, p.601–10, 2001.

YOUNG, J.M.; MCNEILY, A.S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v.14, p.489–505, 2010.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.L.M.R.; DEWULF, J.; VAN ZEVEEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v 63, p. 2147-2163, 2005.

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

ZIELAK-STECIWKOA, A. E.; EVANS, A. C. Genomic portrait of ovarian follicle growth regulation in cattle. **Reproductive Biology**, v.16, p. 197–202, 2016.

ZIELAK, A.E.; CANTY, M.J.; FORDE, N.; COUSSENS, P.M.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; IRLANDA, J.J.; EVANS, A.C. Differential expression of genes for transcription factors in theca and granulosa cells following selection of a dominant follicle in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n.5, p. 904–14, 2008.

ZIELAK, A.E.; FORDE, N.; PARK, S.D.; DOOHAN, F.; COUSSENS, P.M.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. Identification of novel genes associated with dominant follicle development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 8, p. 967–75, 2007.