



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

SANDRA SILVA DUARTE

**EFEITO DE FATORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN SITU* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E APOPTOSE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
OVINOS**

RECIFE

2017

SANDRA SILVA DUARTE

**EFEITO DE FATORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *IN SITU* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E APOPTOSE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
OVINOS**

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor (a) em Ciência Veterinária.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Aurea Wischral

Co-orientador: Dr. André Mariano Batista

RECIFE

2017

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

D812e Duarte, Sandra Silva
Efeito de fatores de crescimento no cultivo *in situ* sobre o desenvolvimento e apoptose de folículos pré-antrais ovinos / Sandra Silva Duarte. - 2017.
100 f. : il.

Orientadora: Aurea Wischral.
Coorientador: André Mariano Batista.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Apoptose 2. Gene 3. Ovelha 4. *In situ* I. Wischral, Aurea, orient. II. Batista, André Mariano, coorient. III. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE FATORES DE CRESCIMENTO NO CULTIVO *in situ* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E APOPTOSE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS**

Tese de Doutorado elaborada por

SANDRA SILVA DUARTE

Aprovada em 13/03/2017

BANCA EXAMINADORA

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

Prof Dr. ALVARO AGUIAR COELHO TEIXEIRA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. GUSTAVO FERRER CARNEIRO
Departamento de Medicina Veterinária da UAG/UFRPE

Prof. Dr. LKAKAJSJD IRUFUA DE AJAJPCPE
Faculdade de Medicina Veterinária da UFLA

Prof Dr. ANDRÉ MARIANO BATISTA
Co-orientador-Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Profª. Dra. ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO
Faculdade de Medicina Veterinária da IBGM/IBS-UNIBRA

*As pessoas responsáveis pelo meu sucesso,
minha família, meus amigos,
e meu namorado
Dedico.*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,

Mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,

Não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido força e determinação para que essa caminhada fosse possível;

Aos meus pais, Theones e Ruth, minha irmã Sheila, minhas avós Severina e Suzana, meu avô Francisco (*in memoriam*), e a toda minha família, pelo amor e apoio a mim oferecidos, pois eu não seria capaz de realizar mais esta conquista se não fosse por vocês.

Ao meu namorado Marcus, que me deu apoio nesta importante fase da minha vida, obrigada pelo amor, amizade e paciência.

A todos meus amigos, que independente da distância, posso sempre contar, e que me dão força e segurança para seguir em frente perante as dificuldades.

A minha orientadora, Aurea Wischral, por ser minha “mãe” acadêmica, e me proporcionar todos os ensinamentos, os quais foram indispensáveis durante todo o doutorado.

Ao meu co-orientador, André Mariano Batista, pelos seus ensinamentos, esclarecimentos, atenção e paciência. Sem você seria muito mais difícil chegar até aqui.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária que através de sua equipe de funcionários, professores, secretários e coordenadores, muito contribuíram para minha formação profissional.

À CAPES pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, indispensável para a realização desse trabalho.

Aos componentes e colaboradores do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada-FAMA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, especialmente meus amigos/irmãos Diogo Farias e Suzana Nunes, pelo auxílio na execução do experimento, além do apoio, ensinamentos e companheirismo diário.

À todos os componentes do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, coordenado pelos professores Álvaro Teixeira e Valéria Teixeira. Que abriram com todo carinho as portas do seu laboratório nos oferecendo uma grande ajuda em todo o experimento, e em especial a Carol, Cintia e Aline, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

E a todos, que direta ou indiretamente, independente da função, grau de parentesco e/ ou instrução contribuíram neste percurso e que não foram supracitadas, terão sempre meu reconhecimento e estarão em meus pensamentos. O meu muito obrigada.

RESUMO

A manipulação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais é uma das principais ferramentas utilizadas atualmente para estudos da foliculogênese inicial e resgate de oócitos primários, para cultivá-los *in vitro* até a maturação. O objetivo deste trabalho foi estudar um sistema de cultivo eficiente para a etapa do desenvolvimento folicular pré-antral, utilizando IGF-1, EGF e FSH. Foi realizado o cultivo *in situ* de fragmentos de córtex ovariano de ovinos, cultivados por oito dias em α MEM+ adicionado de IGF-1, FSH e EGF, isolados e/ou associados. Amostras foram analisadas por histologia clássica e imuno-histoquímica (TUNEL), foram mensurados os diâmetros foliculares e os folículos classificados em primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários), em normais/anormais e com ou sem apoptose. As expressões relativas de RNAm dos genes relacionados à apoptose, Bcl2, Bax e Caspases 3 e 9, nos fragmentos ovarianos, foram avaliadas pela técnica de PCR em tempo real. O cultivo com diferentes concentrações de IGF-1, demonstrou que 50 ng/mL proporcionou maior ativação do crescimento dos folículos, comparados às outras concentrações ($P < 0,05$). O IGF-1 associado ao FSH melhorou a ativação folicular, a normalidade dos folículos e reduziu a apoptose folicular ($P < 0,05$). A expressão relativa da Caspase 9 foi reduzida ($P < 0,05$) nos cultivos contendo IGF-1, associado ou não ao FSH, porém não foi observada diferença para os outros genes ($P > 0,05$). Da mesma forma a associação de IGF-1 ao EGF com ou sem adição de FSH foi eficiente para melhoria do cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de ovelhas por 8 dias, seja na qualidade morfológica, quanto na redução da apoptose ($P < 0,05$). Conclui-se que 50 ng/mL de IGF-1 é a concentração mais eficaz para o desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados inclusos no tecido ovariano ovino, pelo período de 8 dias. A associação de IGF-1 ao EGF ou ao FSH são eficientes para melhorar o desenvolvimento dos folículos e reduzir os níveis de apoptose nestas condições de cultivo, favorecendo o equilíbrio entre os fatores apoptóticos estudados.

Palavras-chave: cultivo *in situ*, apoptose, gene, ovelha.

ABSTRACT

The manipulation and culture of oocytes included in ovarian preantral follicles is one of the main tools currently used for studies of the initial folliculogenesis and rescue of primary oocytes, to cultivate them in vitro until maturation. The objective of this research was to study an efficient culture system for this stage of follicles, using IGF-1, EGF and FSH. Ovarian cortex fragments from sheep, were cultured in situ for eight days in α MEM+ added with IGF-1, FSH and EGF, isolated and/or associated. Samples were analyzed by classical histology and immunohistochemistry (TUNEL), in order to measure follicular diameters and classify follicles as primordial and developing (primary and secondary), normal / abnormal and with or without apoptosis. The relative mRNA expressions of the apoptosis-related genes, Bcl2, Bax and Caspases 3 and 9 in the ovarian fragments were evaluated by the real-time PCR technique. The culture with different concentrations of IGF-1, demonstrated that 50 ng/mL provided greater activation of follicle growth, compared to the other concentrations ($P < 0.05$). FSH-associated IGF-1 improved follicular activation, normality, and reduced apoptosis ($P < 0.05$). The relative expression of Caspase 9 was reduced ($P < 0.05$) in cultures containing IGF-1, associated or not to FSH, but no difference was observed for the other genes ($P > 0.05$). Likewise, the association of IGF-1 to EGF with or without FSH addition was efficient for improving the in vitro culture of ovarian sheep fragments for 8 days, either in morphological quality or in the reduction of apoptosis ($P < 0.05$). It is concluded that 50 ng/ml of IGF-1 is the most effective concentration for the development of cultured preantral follicles included in ovary ovarian tissue, for 8 days. The association of IGF-1 to EGF or FSH is efficient to improve the development of follicles and reduce the levels of apoptosis in these culture conditions, favoring the balance between the studied apoptotic factors.

Key words: in situ culture, apoptosis, gene, sheep.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1- Ilustração do aspecto morfológico do ovário contendo folículos em maturação, nas fases folicular, ovulação e luteínica. Fonte: Adaptado de Raff; Levitzky (2012).....18

Figura 2- Imagem ilustrativa da organização e estrutura dos folículos presentes no ovário. Notar a sequência evolutiva desde os folículos primordiais até a formação da cavidade antral e ovulação. Fonte: adaptada de Georges et al., (2014).....20

Figura 3. Classificação das caspases nos mamíferos e respectiva representação do domínio efetor de morte (DED) e do domínio de ativação e recrutamento (CARD). L e C correspondem às subunidades longa e curta, existentes em todas as caspases. Fonte: adaptado de Jin e El-Deiry, (2005).....25

Figura 4. Métodos para detecção da apoptose. A apoptose pode incluir ativação das caspases, fragmentação do DNA, assim como alterações na membrana plasmática e nas mitocôndrias, alterações citomorfológicas, entre outras, podendo ser avaliada por vários métodos em culturas celulares ou biópsias teciduais. Fonte: adaptado de Schulze-Osthoff, (2008).....26

Capítulo 1

Figura 1. (A) Representação de folículos normais; (B) Representação de folículos anormais.....46

Figura 2. Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento cultivados em α -MEM⁺ ou α -MEM⁺ suplementado com 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de IGF-1 durante 8 dias.....46

Figura 3. Percentual de folículos pré-antrais ovinos normais cultivados com diferentes concentrações de IGF-1.....47

Figura 4. Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento cultivados *in situ* com IGF-1 (50 ng/mL) e FSH (50 ng/mL).....48

Figura 5. – Percentual de folículos pré-antrais ovinos normais cultivados com IGF-1(50ng/mL) e FSH (50ng/mL).....49

Figura 6. . Imagens representativas da imuno-marcação, pela técnica de TUNEL, em fragmentos ovarianos cultivados *in situ*, durante 8 dias. As células TdT-positivas são representadas pela coloração marrom ilustrada pela seta: (A) α -MEM+, (B) α -MEM+ na presença de IGF-1/FSH.....50

Figura 7. Percentual de folículos pré-antrais positivos para apoptose pela técnica de TUNEL, após cultivo *in situ* durante 8 dias.....50

Figura 8. Expressão relativa do mRNA para o receptor de FSH, após cultivo *in situ* dos fragmentos de córtex ovariano de ovinos.....51

Figura 9. Expressão relativa do RNAm para os genes BAX (A); BCL2 (B); caspase 3 (C) e caspase 9 (D), após cultivo *in situ* dos fragmentos de córtex ovariano de ovinos.....52

Capítulo 2

Figura 1. Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento cultivados com IGF-1, EGF, e em associação IGF-1/EGF/FSH durante 8 dias.76

Figura 2. Percentual de folículos pré-antrais ovinos normais cultivados com diferentes concentrações de IGF-1.....77

Figura 3. Imagens representativas da coloração pela técnica de TUNEL, em fragmentos ovarianos cultivados durante 8 dias; As células TdT-positivas são representadas pela

coloração marrom indicada pela seta vermelha. (A) α -MEM+. (B) α -MEM+ associado a IGF-1/EGF/FSH.....77

Figura 4. Percentual de folículos pré-antrais positivos pela técnica de TUNEL, após cultivo *in situ* durante 8 dias.....78

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de cada gene e código de acesso do gene no GenBank.....45

Tabela 2 – Média \pm desvio-padrão da média do diâmetro folicular de folículos pré-antrais ovinos cultivados com diferentes concentrações de IGF-1.....47

Tabela 3 – Média \pm desvio-padrão da média do diâmetro de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ* com IGF-1(50ng/mL) e FSH (50ng/mL).....49

Capítulo 2

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão da média do diâmetro de folículos pré-antrais ovinos cultivados com IGF-1, EGF ou IGF-1/EGF/FSH, por 8 dias.....76

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1.O ovário mamífero	18
2.2.Oogênese.....	18
2.3.Foliculogênese e características dos folículos ovarianos.....	19
2.4.Atresia folicular.....	21
2.4.1. Atresia por degeneração.....	21
2.4.2 Atresia por apoptose.....	22
2.4.2.1 Família Bcl-2.....	22
2.4.2.2 Caspases.....	24
2.4.2.3. Métodos para detecção da apoptose.....	25
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré- antrais.....	27
2.6.Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>	28
2.6.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	29
2.6.2 Fator de Crescimento Semelhante a Insulina I (IGF-1).....	30
2.6.3 Fator de Crescimento Epidermal (EGF).....	31
2.7. Técnicas para análise da sobrevivência e do desenvolvimento folicular após o cultivo <i>in vitro</i>	33
2.7.1. Histologia	33
2.7.2.Imuno-histoquímica.....	33
2.7.3. Biologia Molecular.....	34

3. OBJETIVO GERAL.....	35
3.1. Objetivos específicos.....	35
4. CAPÍTULO 1.....	34
5. CAPÍTULO 2.....	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

O ovário é um órgão que fornece um ambiente adequado para a produção de várias substâncias, como fatores de crescimento e hormônios, além de liberar os gametas femininos para o processo de reprodução dos animais (JOHNSON, 2003; APOLONI et al., 2016). Porém, apesar do grande número de folículos presentes nos ovários, cerca de 99,9% não chega à ovocitação por sofrer um processo de atresia durante seu crescimento e maturação (MARKSTROM et al., 2002). Embora esse processo leve a perda de vários folículos, isto é um evento crucial para a manutenção da homeostase dos ovários de mamíferos, o qual assegura a ciclicidade animal (AMSTERDAM et al., 2003).

O processo de apoptose é uma forma de morte celular programada onde podem ser observadas alterações morfológicas em consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos geneticamente regulados (SARASTE; PULKKI, 2000). Esse processo é mediado por mecanismos ativos de fatores intrínsecos e extrínsecos (JOHSTONE et al., 2002), tais como estresse oxidativo, ativação de genes promotores da apoptose, danos ao DNA, citocinas, proteínas de revestimento viral, ou retirada de fatores de crescimento celular (JOHNSON, 2003).

Os folículos ovarianos sofrem o processo de atresia em todas as fases de desenvolvimento devido a apoptose ou necrose (CHEN et al., 2005). Em folículos pré-antrais, a atresia é mais comumente observada no oócito. No entanto, durante as fases avançadas de desenvolvimento, isto ocorre tanto no oócito como nas células da granulosa (SILVA et al., 2002). Várias substâncias podem influenciar a decisão de morte celular durante os diferentes estágios foliculares, como fatores endócrinos (Folículo Hormônio Estimulante - FSH e Hormônio Luteinizante - LH) e fatores parácrinos (Kit Ligand - KL, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 - IGF-1, o Fator de Crescimento Epidérmico - EGF, Fator de Crescimento de Fibroblastos-2 - FGF-2, Fator de Crescimento Endotelial Vascular - VEGF, e ativina).

Além disso, existem vários fatores pró-apoptóticos (proteína X associada ao Bcl-2 (Bax), receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose (FAS), proteína citoplasmática de peso molecular 53kDa (p53) e cisteíno proteases de ácido aspártico (caspases)) e anti-apoptóticos (Linfoma 2 de célula B de leucemia linfóide crônica (Bcl-2) e survivina) (FUJINO et al., 2008; PRU et al., 2009).

Diversos trabalhos vêm tentando desenvolver um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade, bem como promover o crescimento de folículo ovariano pré-antral (FOPA), uma vez que o cultivo dessa classe folicular resultaria no fornecimento de milhares de oócitos viáveis, aumentando o rendimento da produção *in vitro* (PIV) (RODRIGUES, 2010). Apesar dos estudos já realizados com cultivo *in vitro* de FOPA, poucos foram realizados na espécie ovina (ARUNAKUMARI et al, 2007, LUZ et al., 2012), já em caprinos, o cultivo de folículos pré-antrais e antrais tem sido largamente estudado e demonstrado a viabilidade do sistema *in vitro* para produção de oócitos viáveis (RODRIGUES et al., 2010, DUARTE et al. 2012, MAGALHÃES et al., 2012).

Estudos já demonstraram que o cultivo de folículos é influenciado pelo tipo de meio e os suplementos utilizados, incluindo fatores de crescimento e hormônios, que podem estimular o crescimento *in vitro* ou desencadear a morte celular (RODRIGUES et al., 2010). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento e a apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*, com suplementação de fatores de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ovário mamífero

O ovário de vertebrados é constituído pelas regiões cortical e medular. A região cortical contém folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento dependendo da fase do ciclo estral, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos (Figura 1). A região medular é localizada na porção mais interna do ovário, com exceção dos equídeos, sendo constituída por tecido conjuntivo (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo I e II), nervos e sistemas vasculares responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O ovário desempenha uma função endócrina, responsável pela produção e liberação de hormônios esteroides e diversos peptídeos e uma função exócrina ou gametogênica, responsável pela produção e liberação de oócitos (HAFEZ, 2004), a qual é exercida pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991; GUERREIRO et al., 2015).

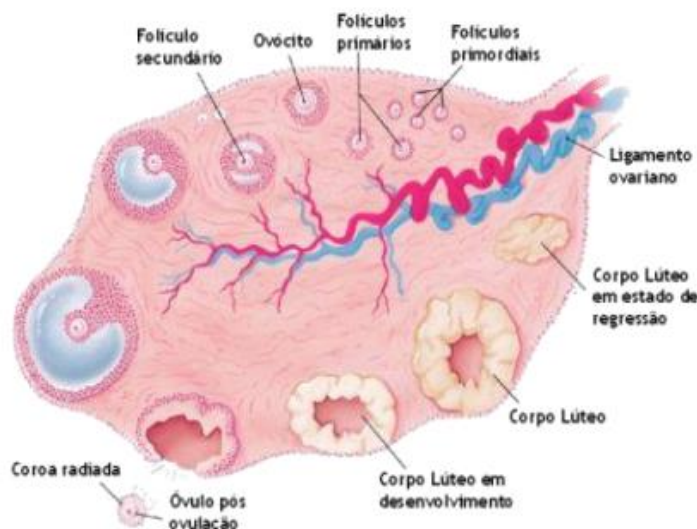


Figura 1. Ilustração do aspecto morfológico do ovário contendo folículos em maturação, nas fases foliculares, ovulação e luteínica. Fonte: Adaptado de Raff; Levitzky (2012)

2.2 Oogênese

A oogênese é um conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) da fêmea até a fecundação. Inicia-se antes do nascimento e somente alguns ovócitos conseguem completar seu desenvolvimento meses ou anos mais tarde, ou seja, quando o animal atinge a puberdade e após a fecundação (FIGUEIREDO et al., 2008).

Durante o início do desenvolvimento embrionário, ocorre a migração das CGP do saco vitelínico para a região das gônadas primitivas (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Em seguida, as CGP multiplicam-se e transformam-se em ovogônias, as quais possuem uma alta atividade mitótica e transcricional (EPPIG et al., 2004). Então, ocorre a replicação do DNA das ovogônias, tornando-se oócitos primários. Estes começam a primeira divisão meiótica, passando pelos estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno e paquíteno), permanecendo no estágio de dictióteno ou vesícula germinativa até a puberdade (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Neste período, o pico do Hormônio Luteinizante (LH) induz o oócito a retomar a meiose e então, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, liberação do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário. Inicia-se a seguir a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozoide, quando então, completa a meiose e libera o segundo corpúsculo polar, formando o óvulo (SILVA et al., 2004).

2.3 Foliculogênese

Ao processo de formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos dá-se o nome de foliculogênese. Este processo inicia-se ainda na vida intra-uterina, na maioria das espécies, com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

O folículo é considerado a unidade morfofuncional do ovário, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito, além de produzir hormônios e peptídeos (CELESTINO et al., 2009). O folículo é composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais) e, durante a foliculogênese, sua morfologia é alterada uma vez que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se diferenciam (FIGUEIRDO et al., 2008).

Os folículos podem ser classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios) (Figura 2). Os folículos primordiais representam a grande maioria dos folículos presentes no ovário (95%) e encontram-se quiescentes (FORTUNE et al., 2003, KIM, 2012).

Tais folículos contêm um oócito circundado por uma única camada de células da pré-granulosa com morfologia pavimentosa. A transição do estágio primordial para primário pode ser prolongada e folículos com células da granulosa de morfologia pavimentosa e cúbica são frequentemente observados, sendo classificados por alguns autores como folículos de transição (FORTUNE et al., 2003).

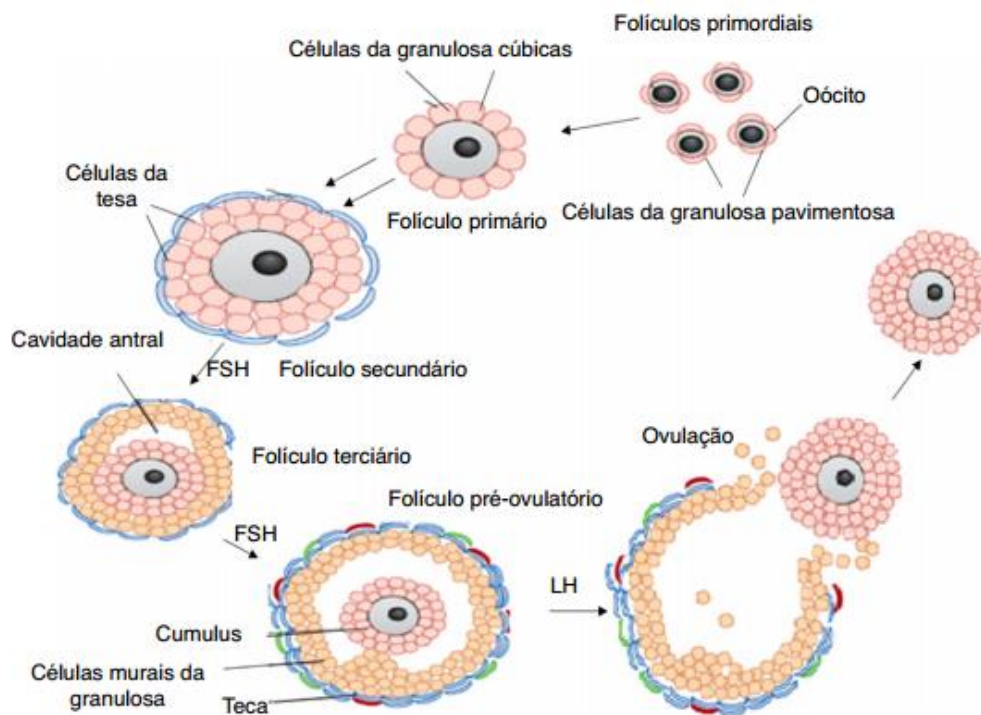


Figura 2 – Imagem ilustrativa da organização e estrutura dos folículos presentes no ovário. Notar a seqüência evolutiva desde os folículos primordiais até a formação da cavidade antral e ovulação. Fonte: adaptada de Georges et al., (2014).

Os folículos primários, por sua vez, contêm uma única camada de células da granulosa com morfologia cúbica circundando o oócito e, a partir desse estágio, o oócito passa a manter um estreito contato com essas células mediado por endocitose, acredita-se dessa forma que as trocas de nutrientes entre oócito com as células da granulosa ocorra por pinocitose (FIGUEIREDO et al., 2008).

Com o crescimento dos folículos primários, ocorre a proliferação das células da granulosa e o crescimento do oócito, sendo formados os folículos secundários. Tais

folículos são caracterizados por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas ao redor do oócito (FIGUEIREDO et al., 2008).

O desenvolvimento desses folículos, inicia-se a formação da zona pelúcida, bem como a formação das células da teca interna e externa a partir do estroma intersticial (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). É importante salientar que as proteínas para formação da zona pelúcida começam a ser sintetizadas a partir do início do crescimento dos folículos primordiais, mas tornam-se claramente visíveis em folículos secundários (MATOS et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008).

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados antrais. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005; SILVA et al., 2016)..

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005; SILVA et al., 2016).

2.4 Atresia folicular

Os folículos ovarianos pré-antrais representam 90% da população folicular (dos quais 95% são folículos primordiais) e são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (FIGUEIREDO, 1995). Entretanto, a grande maioria dos folículos ovarianos pré-antrais (99,9%) não chegam até a ovulação, pois sofrem um processo conhecido por atresia folicular, fazendo com que o desenvolvimento de folículo pré-ovulatório, a partir de um folículo primordial, seja um evento biológico raro (FIGUEIREDO, 1995).

Vários são os fatores que podem influenciar o processo de atresia, como idade, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, hormônios, nutrição e isquemia (CELESTINO et al., 2009). E processo de atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (CELESTINO et al., 2009).

2.4.1 Atresia folicular por degeneração

A degeneração é considerada uma forma não programada de morte celular e é iniciada devido a algum estímulo circunstancial resultando na rápida quebra da homeostasia celular. Geralmente, a degeneração é iniciada por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência de níveis de ATP, trauma, levando a danos irreversíveis na célula (MAO et al., 2004). Alguns trabalhos têm sugerido que além dessas causas, mecanismos “ativos” como uma sobrecarga de Na⁺, acúmulo de Ca²⁺ e mudanças na permeabilidade da mitocôndria podem também participar e levar ao processo necrótico (MAO et al., 2004).

Em condições *in vitro*, especialmente durante a conservação, ocorre alteração no fornecimento de oxigênio e nutrientes para o ovário. Nesta situação, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular por degeneração (BAR-JOSEPH et al., 2010).

2.4.2 Atresia folicular por apoptose

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um evento geneticamente determinado, ou seja, depende do balanço de genes pró e anti-apoptóticos, e é observada nos folículos ovarianos durante toda a vida, incluindo a fase pré-natal. Sendo geralmente mediada por mecanismos intrínsecos, podendo também ser influenciada por fatores extrínsecos (CELESTINO et al., 2009).

Dentre os fatores que podem levar a apoptose destacam-se o estresse oxidativo, irradiação, danos no DNA, citocinas, proteínas virais, deficiência de fatores de sobrevivência da célula e ativação de genes promotores de apoptose (CELESTINO et al., 2009; SILVA et al., 2016).

Os eventos de morte celular ocorrem pela via intrínseca ou mitocondrial em sua grande maioria (GREEN E KROEMER, 2004). Sendo a cascata de sinalização da apoptose por essa via, geralmente ativada por proteínas pró-apoptóticas da família da Bcl-2 (HENGARTNER, 2000).

O início, execução e regulação da apoptose envolvem vários fatores bioquímicos e as caspases possuem um papel central como sinalizador da apoptose. Elas são membros da família de proteinases cisteínicas com especificidade para ligações peptídicas envolvendo o aspartato. São expressas como pró-enzimas e são

proteoliticamente processadas para a sua forma ativa após estímulo apoptótico (STRASSER et al., 2000).

2.4.2.1 Família Bcl-2

As proteínas da família Bcl-2 se envolvem em uma rede complexa de interações heterodiméricas que coletivamente fazem decisões de vida e morte para a célula (VOLKMANN et al., 2014). Os membros da família anti-apoptótica (por exemplo, Bcl-2 e linfoma de células B – isoforma longa- Bcl-XL) protegem a célula contra estímulos apoptóticos, enquanto proteínas pró-apoptóticas (Proteína X associada ao Bcl2- Bax e proteína pró-apoptótica -Bak - uma ou outra é necessária para apoptose) matam ativamente a célula induzindo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (VOLKMANN et al., 2014). Suas funções são reguladas por uma terceira classe de membros da família Bcl-2, ao domínio de homologia 3 ao Bcl-2 (BH3) (GAVATHIOTIS et al., 2010).

Já está bem estabelecido que as proteínas da família Bcl-2 são os reguladores centrais da via mitocondrial intrínseca de células apoptóticas. Embora muitos tipos de estresse possam induzir apoptose através de diversas vias de sinalização, esses sinais geralmente convergem na membrana externa mitocondrial, onde o destino das células é finalmente decidido (VOLKMANN et al., 2014).

As proteínas da família BCL-2 podem ter funções em locais não mitocondriais (por exemplo, o retículo endoplasmático). No entanto, talvez os papéis mais proeminentes dessas proteínas sejam promover ou inibir a permeabilização da membrana externa mitocondrial, regulando a via mitocondrial para a apoptose (CHIPUK E GREEN, 2008; LEBER et al., 2010; MARTINOU E YOULE, 2011).

A permeabilização da membrana externa mitocondrial induzida por Bax e Bak permite que as proteínas citotóxicas escapem do espaço intermembranar mitocondrial para o citoplasma, levando à ativação da caspase e à apoptose. Essa permeabilização também leva a disfunção mitocondrial progressiva, que causa depleção de energia e morte celular, mesmo quando as caspases são inativas. Isso significa que as células podem se recuperar desta situação apenas em circunstâncias excepcionais (FERRER et al., 2012; VOLKMANN et al., 2014).

Mesmo nos casos em que a apoptose é iniciada pela ligação de receptores de morte, através da via extrínseca, os sinais geralmente requerem amplificação pela via

mitocondrial. Assim, a permeabilização da membrana externa mitocondrial é frequentemente o evento decisivo que precede a morte celular (VOLKMANN et al., 2014).

É sabido que a Bcl2 interage com a Bax impedindo a sua oligomerização e, assim, bloqueando a apoptose (YOULE E STRASSER, 2008). E que a função e ação da proteína Bax são reduzidas na presença da proteína Bcl-2 pela formação do heterodímero Bax-Bcl-2, portanto, é de extrema importância a análise da razão Bcl-2/Bax, uma vez que se a presença de Bcl-2 for elevada em relação à Bax, a formação de heterodímeros pode estar aumentada, impedindo que a Bax atue estimulando indução a apoptose (CATZ E JOHN, 2003; REED, 2002).

2.4.2.2 Caspases

Já foram identificadas 14 diferentes caspases em mamíferos (BOATRIGHT E SALVENSEN, 2003). Basicamente, as caspases são constituídas por um segmento N-terminal, também designado por pró-domínio (longo nas caspases iniciadoras-p20 e curto nas caspases efetoras-p10) e por duas subunidades, uma longa e uma curta, que possuem as sequências que participam no domínio catalítico (SAMBADÉ, 2005).

De acordo com a sua estrutura (Figura 3) e o seu papel na apoptose, as caspases podem ser classificadas em:

Caspases iniciadoras da apoptose: caspases que possuem pró-domínios longos, encontrando-se envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Incluem as que pertencem ao domínio efetor de morte (DED), caspases -8 e -10, e as caspases do domínio de ativação e recrutamento (CARD), caspases -2 e -9 que vão mediar a interação na direção das moléculas adaptadoras (SAMBADÉ, 2005).

Caspases efetoras/executoras da apoptose: incluem as caspases -3, -6 e -7, constituindo caspases que possuem pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis por darem continuidade ao processo apoptótico através da clivagem de substratos celulares, após ativação por parte das caspases iniciadoras (RUPNARAIN et al., 2004; JIN E EL-DEIRY, 2005).

Caspases inflamatórias: incluem as caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13 e -14, encontrando-se envolvidas na inflamação e a sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida (BOATRIGHT E SALVENSEN, 2003).

Uma vez ativadas, as caspases efetoras clivam aproximadamente cerca de 400 substratos, incluindo proteínas envolvidas na estrutura do citoplasma, proteínas reguladoras dos sinais de transdução e transcrição, componentes controladores do ciclo celular e proteínas envolvidas na replicação e reparação do DNA (FISHER et al., 2003).

Para muitos dos substratos identificados, as consequências funcionais da sua clivagem são desconhecidas e têm sido simplesmente inferidas nas suas normais funções. Em outros casos, a proteólise de determinados componentes pode ser associada a alterações morfológicas discretas (FISHER et al., 2003).

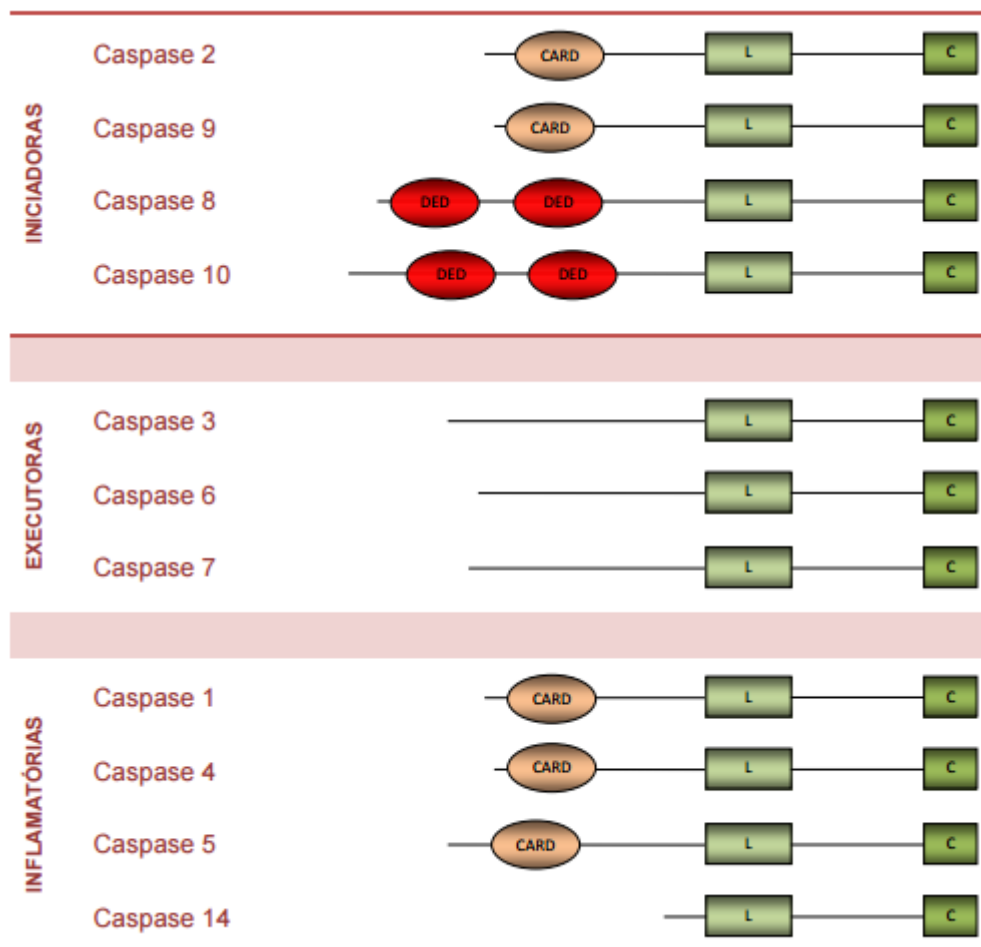


Figura 3. Classificação das caspases nos mamíferos e respectiva representação do domínio efetor de morte (DED) e do domínio de ativação e recrutamento (CARD). L e C correspondem às subunidades longa e curta, existentes em todas as caspases. Fonte: adaptado de Jin e El-Deiry, (2005).

2.4.2.3 Métodos para detecção da apoptose

Uma vez que a apoptose ocorre através de uma cascata muito bem regulada de eventos, existem muitas possibilidades para medir a atividade destes reguladores ou as consequências funcionais da sua ação. Um grande número de ensaios para detecção e contagem de células apoptóticas tem sido desenvolvidos, no entanto, todos eles apresentam as suas vantagens e desvantagens (OTSUKI et al., 2003; SCHULZE-OSTHOFF, 2008) (Figura 4).

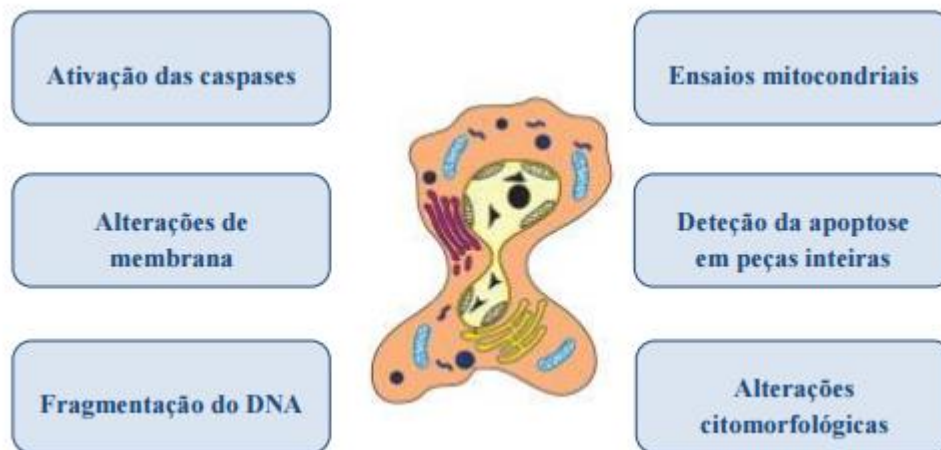


Figura 4. Métodos para detecção da apoptose. A apoptose pode incluir ativação das caspases, fragmentação do DNA, assim como alterações na membrana plasmática e nas mitocôndrias, alterações citomorfológicas, entre outras, podendo ser avaliada por vários métodos em culturas celulares ou biópsias teciduais. Fonte: adaptado de Schulze-Osthoff, (2008).

Por exemplo, determinadas características da apoptose podem surgir apenas transitoriamente, enquanto outras podem sobrepor-se parcialmente com a necrose. Mais ainda, alguns métodos podem ser mais adequados para culturas celulares mas inapropriados para detectar apoptose em secções de tecidos. Por este motivo, a escolha dos métodos de detecção de apoptose em células, tecidos ou órgãos deve ser sempre bem estudada, avaliando-se de forma prévia as vantagens e os inconvenientes associados a cada método (OTSUKI et al., 2003).

Das várias técnicas disponíveis para detecção da apoptose em tecidos, muitos investigadores recomendam o método TUNEL, o qual se baseia na marcação de produtos endonucleossômicos resultantes da fragmentação do DNA (TAYLOR et al., 2008). Outros métodos histoquímicos também disponíveis incluem a detecção do

citocromo c, libertado da mitocôndria, ou a detecção das proteínas pró- e anti-apoptóticas, Bax e Bcl-2, envolvidas nos mecanismos intrínsecos da apoptose. A marcação de produtos específicos resultantes da clivagem de proteínas alvo das caspases, tem sido considerada uma abordagem relevante (TAYLOR et al., 2008).

2.5 Cultivo *in vitro* de folículos pré antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma técnica que vem sendo largamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes fases do desenvolvimento folicular, a fim de mimetizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário durante a foliculogênese (ovário artificial) (FORTUNE, 2003). Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados são dependentes do tipo de meio, sistema de cultivo utilizado e da espécie animal empregada para os estudos (FORTUNE, 2003; APOLONI, et al., 2016).

Diferentes sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos visando estudar os fatores que controlam a foliculogênese, bem como promover o crescimento e a maturação oocitária associados com a multiplicação e diferenciação das células da granulosa (FORTUNE, 2003).

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (FORTUNE, 2003). O'Brien et al. (2003) obtiveram grande sucesso com a ativação de folículos primordiais *in vitro* e este modelo tem sido utilizado por diferentes grupos de pesquisadores.

Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível utilizar este modelo. Para estes animais, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos primários caprinos (SILVA et al., 2004), bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), babuínos (WANDJI et al., 1997) e humanos (HOVATTA et al., 1997). Este tipo de cultivo tem a vantagem de manter o contato celular e facilitar a perfusão do meio para o tecido ovariano (APOLONI et al., 2016).

Apesar do cultivo *in situ* proporcionar a manutenção da integridade tridimensional dos folículos e a interação destes com células do estroma, o cultivo de

folículos isolados é atualmente o mais utilizado, já que permite o monitoramento individual dos folículos durante todo o período de cultivo (ABIR et al., 2006; SILVA et al., 2016).

Com relação aos avanços obtidos com o cultivo folicular, foi verificada a formação de antro após o cultivo *in vitro* de folículos secundários de bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), ovinos (CECCONI et al., 1999) e caprinos (SILVA et al., 2009).

Para suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO et al., 1994). Os melhores resultados do cultivo folicular foram obtidos em roedores, sendo observada a obtenção de crias viáveis a partir do cultivo de oócitos provenientes de folículos pré-antrais de camundongas, nos quais o oócito adquiriu competência para maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário. Tal crescimento foi obtido através de dois sistemas de cultivo: (1) cultivo de ovários inteiros para obtenção da transição de folículo primordial para primário e (2) isolamento e posterior cultivo de folículos primários e secundários (SILVA et al., 2009; CELESTINO et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2012).

Para melhor compreender o papel de hormônios e fatores de crescimento em ovários mamíferos, além do cultivo *in vitro*, é importante quantificar e identificar o local de produção de cada substância envolvida nas diferentes etapas do desenvolvimento folicular. Atualmente diferentes técnicas podem ser empregadas para análise da expressão de proteínas e receptores envolvidos na foliculogênese antes e depois do cultivo, constituindo um importante instrumento de estudo da foliculogênese (SILVA et al., 2016).

2.6 Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular *in vitro*

O estabelecimento de um meio de cultivo ideal é outro ponto crucial para o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente (FIGUEIREDO et al., 2008). Inúmeros estudos *in vitro* têm demonstrado que diferentes fatores podem influenciar o crescimento dos FOPA e subsequente maturação oocitária, como o uso de meios de cultivo simples (MAO et al., 2002) ou complexos (MAO et al., 2004), contendo suplementos (METOKI et al., 2008), hormônios (FORTUNE, 2003) e fatores parácrinos e autócrinos (GUTIERREZ et al., 2000).

Além disso, outra preocupação, por parte dos pesquisadores que visam o desenvolvimento de FOPA *in vitro*, é a adição ao meio de cultivo de substâncias que controlem a formação de radicais livres produzidos durante as reações metabólicas normais (APOLONI et al., 2016).

Assim, diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, tanto de animais de laboratórios como animais domésticos (vacas, cabras e ovelhas). Substâncias como soro fetal, FSH, 17 β -estradiol, EGF, FGF, ativina, insulina e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) são largamente utilizadas (FIGUEIREDO et al., 2008; SILVA et al., 2016).

2.6.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Especificamente no ovário, o mecanismo de ação do FSH é mediado por receptores FSH-R, localizados no oócito (MÉDURI et al., 2002), bem como nas células da granulosa (GUDERMANN; NÜRNBERG; SCHULTZ, 1995). Após a ligação do FSH com seu receptor, inicia-se uma cascata de reações intracelulares que pode suscitar diversas respostas celulares (HUNZICKER-DUNN; MAIZELS, 2006), tais como a proliferação celular, síntese de hormônios esteróides, bem como a expressão de diversos fatores de crescimento (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Já está bem estabelecida a importância do FSH para o desenvolvimento de folículos ovarianos avançados, isto é, na fase antral (YU et al., 2003). No entanto, estudos têm demonstrado que o FSH, também exerce um papel significativo no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (FORTUNE, 2003). Durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos, a adição de FSH ao meio de cultivo, além de aumentar o diâmetro folicular (HULSHOF et al., 1995) e os níveis de progesterona e estradiol (WANDJI et al., 1996), melhorou as taxas de sobrevivência folicular.

Nesta mesma espécie, Gutierrez et al. (2000), observaram que o FSH promoveu o crescimento de folículos secundários e aumentou as taxas de formação de antro após 28 dias de cultivo. Em caprinos, a adição de FSH ao meio de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano foi responsável pela preservação da viabilidade folicular, aumento do diâmetro folicular, bem como pela manutenção da integridade ultraestrutural dos folículos após sete dias de cultivo (MATOS et al., 2007).

Em outro estudo, foram avaliados os efeitos do pFSH (Stimufol[®] versus Folltropin[®]) sobre a sobrevivência e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais

caprinos cultivados também por 7 dias. Os resultados mostraram que as preparações de FSH afetaram de diferentes formas os folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. O Folltropin[®] foi mais eficiente em promover o crescimento folicular (MAGALHÃES et al., 2009).

2.6.2 Fator de crescimento semelhante a insulina- 1 (IGF-1)

O IGF-1 é um peptídeo com 70 aminoácidos e massa molecular de 7649 kDa (LARON, 2001) . Este fator pertence ao sistema IGF que é composto pelos ligantes IGF-I e IGF-II, pelos receptores do tipo I e II (IGFR-I e IGFR-II) e pelas seis proteínas de ligação de IGF (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, e -6) (RUBIN E BASERGA, 1995). A regulação da ação do sistema IGF é bastante complexa e envolve as IGFBPs, incluindo a IGFBP2, IGFBP4 e IGFBP5, bem como as PAPPAs (proteína plasmática A associada à gravidez). As PAPPAs são proteases que atuam nas IGFBPs (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009), promovendo sua quebra e liberando o IGF-I bioativo (SPICER, 2004).

A biodisponibilidade do IGF é regulada pela família das IGFBPs, as quais se ligam ao IGF-1 e -2 com alta afinidade, inibindo ou potencializando a ação dos mesmos. As IGFBPs (de 1 a 6) estão presentes em todos os fluídos biológicos (GENC et AL., 2011) e podem inibir a ação do IGF por sequestro desde que sua afinidade com IGF seja proporcional ao do receptor 1 (MONGET et al., 2002)

O IGF-1 está relacionado a sobrevivência celular, protegendo as células da apoptose. A principal via anti-apoptótica ativada pelo IGF-1 é a fosfatidilinositol 3-4-5-trifosfato (PI3K) / proteinase quinase B (Akt) (BRUNET et al., 1999). A importância desta proteína Akt foi comprovada em estudos onde a ausência desta molécula inibiu o efeito anti-apoptótico do IGF-1, sendo a apoptose celular induzida tanto pelo fator de necrose tumoral (TNF) quanto pelo receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose (Fas ligante) (BOLDIN et al.,1996; MUZIO et al., 1996). Além disso, o IGF-1 inibe a ação de proteínas pró-apoptóticas como a caspase-1 (JUNG et al., 1996), Bax (MANI et al., 2010) e Bak (CHENG et al., 2013).

Outras vias anti-apoptóticas ativadas pelo IGF-1 vêm sendo sugeridas, como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a ativação da proteína serina/ treonina quinase 1 (Raf-1) (SETO-YOUNG et al., 2011). A MAPK é translocada para o núcleo

e ativa os genes que iniciam a progressão do ciclo celular e/ou sobrevivência (KHOKHLATCHEV et al., 1998).

O sistema formado pelos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) e IGFbps exercem importantes funções no controle do desenvolvimento folicular e atresia em animais domésticos (MONGET et al., 2002). O IGF aumenta a proliferação de células da granulosa, a esteroidogênese e o crescimento do oócito (SILVA et al., 2008; LUZ et al., 2015). Além disso, ambos receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (LEITÃO et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2012).

As IGFbps atuam na regulação do desenvolvimento folicular, onde seus níveis se alteram no decorrer da foliculogênese, modulando a ação dos IGFs e, as ações das gonadotrofinas (MONGET et al., 1989).

Após a ovulação, o sistema IGF pode estar envolvido na manutenção e na regressão do corpo lúteo. Estudos demonstraram um efeito regulatório do LH sobre a expressão do mRNA que codifica o IGF-1 em corpo lúteo de ovinos (HASTIE; HARESIGN, 2006). A proteína e o mRNA para IGF-1 são expressos em todas as categorias foliculares, mas as células da granulosa e da teca de folículos antrais são as principais responsáveis pela produção de IGF-1 nesta categoria folicular, na espécie caprina (SILVA et al., 2007).

O meio de cultivo acrescido de IGF-1 (100 ng/mL), mantém a sobrevivência dos oócitos e estimula o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos (MAGALHÃES et al., 2012). Ainda nesta espécie, o IGF-1 estimula o crescimento de oócitos de folículos pré-antrais, tendo sua ação reforçada pelo fator de crescimento epidermal (EGF) (ZHOU; ZHANG, 2005).

Em equinos, o aumento dos níveis de IGF-1 está associado ao aumento da esteroidogênese em folículos em desenvolvimento (SOUZA et al., 2002). Pesquisas demonstraram que a adição de IGF-1 ao meio de cultivo de grandes folículos secundários promove o aumento da incidência de dominância folicular e ovulação em caprinos (GINTHER et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2012).

2.6.3 Fator de crescimento epidermal (EGF)

Os fatores de crescimento, pertencentes à família EGF, que participam do controle da foliculogênese são: o próprio EGF, o fator de crescimento transformante- α I

(TGF- α I), o fator ligante de heparina semelhante ao EGF (HB-EGF), a anfiregulina, a betacelulina e a epiregulina (PENG et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

O EGF é uma proteína de 6 kDa que tem sido demonstrada no oócito e em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais suínos, enquanto que o RNAm para EGF tem sido demonstrado, nesta espécie, em ovócitos e células da granulosa de folículos antrais (LEITÃO et al., 2009). Estudos demonstraram que o EGF é expresso em todos os estádios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo e no epitélio da superfície ovariana de caprinos (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2006; CELESTINO et al., 2011).

A ação do EGF nos folículos ovarianos é mediada por um receptor presente na membrana celular, ErbB1, que pertence à superfamília ErbB. Este receptor de EGF (EGF-R) funciona como receptor de, pelo menos, seis diferentes membros da família EGF: o próprio EGF, TGF- α , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina e epiregulina (RIESE, et al., 1998).

O RNAm e a proteína para o EGF-R têm sido identificados em oócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais de caprinos (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2006), suínos (SINGH; RUTLEDGE; ARMSTRONG, 1995) e humanos (QU et al., 2000). Todas essas evidências sugerem que o EGF exerce um papel central no controle da atividade ovariana em mamífero (CHUNG E GE, 2012).

O EGF também reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* (LEITÃO et al. 2009). Além disso, o EGF tem estimulado a maturação oocitária em folículos antrais ovinos (GULER et al., 2000), a expansão das células do cúmulus em camundongos (PARROTT et al., 1994). Por outro lado, experimentos *in vivo* sugerem um possível papel do EGF na indução de atresia (LEITÃO et al. 2009).

O efeito do EGF na indução de atresia em condições fisiológicas é questionável, pois um efeito antiapoptótico do EGF tem sido demonstrado durante o cultivo de células da granulosa de folículos pré-ovulatórios de ratas (TILLY et al., 1992). Além disso, o EGF pode atuar localmente no ovário controlando a ação de FSH e LH, pois alguns estudos mostraram que o EGF inibe a produção de receptores de LH (HASTIE; HARESIGN, 2006) e aumenta a expressão de receptores de FSH (LUCIANO et al., 1994)

2.7 Técnicas para análise da sobrevivência e do desenvolvimento folicular após o cultivo *in vitro*

2.7.1 Histologia

A histologia é uma técnica importante para avaliação do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, pois além de permitir uma análise quantitativa, permite ainda verificar a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, podendo analisar os diferentes estádios foliculares, além de analisar a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa (CELESTINO et al., 2011).

Essa técnica pode ser realizada tanto em folículos isolados, como naqueles inclusos em fragmentos de córtex ovariano, e na análise do cultivo *in vitro* de FOPA, permite a avaliação da morfologia citoplasmática celular e nuclear do oócito e alteração no número e na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, por ocasião da ativação folicular (MATOS et al., 2007).

Além disso, alguns autores demonstraram que a histologia pode ainda, sem a mesma precisão, mostrar resultados de morfologia folicular equivalentes aos obtidos nas análises sob microscópio eletrônico (ROSSETTO et al., 2009; CELESTINO et al., 2011; CHAVES et al., 2011). A histologia pode ainda ser utilizada para avaliar morte celular devido à necrose, por meio da visualização da presença de vacúolos (MARTINEZ-MADRID et al., 2004)..

2.7.2 Imuno-histoquímica

Desde a sua introdução, na década de 40, que os métodos imuno-histoquímicos se desenvolveram de forma notável, constituindo atualmente uma ferramenta importante em muitos laboratórios veterinários, sendo amplamente utilizados como uma técnica complementar de diagnóstico (ex. elucidação de diagnósticos diferenciais que não são determináveis pela técnica convencional de hematoxilina-eosina) ou para fins de investigação científica (BRANDTZAEG, 1998; RAMOS-VARA, 2005).

As bases da imuno-histoquímica (IHQ) suportam três grandes doutrinas científicas interligadas entre si: imunologia, histologia e química. O principal conceito que sustenta a IHQ é a detecção de constituintes teciduais (antígenos), recorrendo ao uso de anticorpos específicos (Ac). Assim que ocorre uma ligação antígeno-anticorpo

(Ag-Ac), esta pode ser demonstrada através de uma reação histoquímica colorimétrica visível por microscopia de luz ou através de fluorocromos em observação de microscopia de fluorescência sob luz ultra-violeta (BRANDTZAEG, 1998; RAMOS-VARA, 2005; MATOS ET AL., 2010).

Inicialmente, métodos simples e diretos produziam resultados rápidos, contudo demonstrando uma baixa sensibilidade. Atualmente, existem métodos extremamente sensíveis, capazes de detectar simultaneamente um ou vários antígenos. Outros avanços significativos englobam técnicas de recuperação antigénica que permitem, através do calor, minimizar os efeitos deletérios da fixação, aumentando significativamente o número de antígenos detectáveis em tecidos fixados (RAMOS-VARA, 2005).

2.7.3 Biologia Molecular

O estudo da expressão gênica (análise de proteínas, DNA, mRNA) de diversas substâncias (ligantes e seus receptores) auxilia a compreensão do papel de hormônios e fatores de crescimento em cada fase do desenvolvimento folicular, uma vez que possibilita identificar a localização e o quanto cada uma das substâncias presentes no ovário estão sendo produzidas (ZAMORANO et al. 1996).

Muitas atuações das células foliculares ovarianas relacionadas à sobrevivência, ao crescimento e à diferenciação, são refletidas na alteração dos padrões da expressão gênica. Desta forma, a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos é fundamental para qualquer investigação das funções foliculares (ZAMORANO et al. 1996).

Seu conjunto de técnicas fundamenta-se principalmente no estudo das interações entre os vários mecanismos celulares, partindo da relação entre o DNA, o RNA e a síntese de proteínas, e o modo como essas interações são reguladas. A técnica mais utilizada para quantificar a expressão de mRNA é a RT-PCR em tempo real (Reação em Cadeia de Polimerase-Transcriptase Reversa em tempo real) (CELESTINO, 2011).

Através da técnica de qPCR e da RT-PCR convencional, tem sido possível identificar diferentes substâncias, como hormônios e fatores de crescimento, presentes em folículos ovarianos caprinos (CELESTINO et al., 2011; FROTA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento e a apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*, com suplementação de fatores de crescimento.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento, morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais cultivados com e sem suplementação dos fatores de crescimento IGF-1 e EGF, e da gonadotrofina FSH.
- Avaliar a expressão dos genes Bcl-2, Bax, caspase3, caspase 9 e receptor de FSH (FSH-R) no fragmento de tecido ovariano após cultivo.
- Avaliar características de apoptose por imuno-histoquímica após cultivo *in situ* de fragmentos ovarianos.

CAPÍTULO 1

Avaliação do IGF-1 e FSH no crescimento e apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*

[Effect of IGF-1 and FSH on growth and apoptosis of ovine pre-antral follicles *in situ* cultured]

S.S. Duarte^{1*}, S. S. N. Rocha¹, D. M. F. Silva¹, A. M. Batista¹, M. A. S. Medeiros³, C. G. D'Assunção², C.G.M. Ferreira², A.A.C.Teixeira², V. W. Texeira², M. Adrião², A. Wischral¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco;

²Departamento de Morfologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

³Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco

*e-mail: sandrinhamargi@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e sua associação com o FSH sobre a ativação, morfologia, diâmetro e apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*. Foram utilizados ovários ovinos obtidos em abatedouro. No experimento 1, foi realizado o cultivo *in situ* de fragmentos de córtex ovariano durante oito dias (39 °C e 5% CO₂) em 1 mL α-MEM+ suplementado com IGF-1 nas concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL. No experimento 2, foi selecionada a melhor concentração de IGF-1 do experimento 1 (50 ng/mL) que foi acrescida ou não de 50 ng/mL de hormônio folículo estimulante (FSH). Os fragmentos foram analisados por histologia clássica (Experimentos 1 e 2) e imunohistoquímica e qPCR (Experimento 2). Morfologicamente, os folículos foram classificados em primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários), bem como em normais ou atresícos. Além disso, os diâmetros foliculares também foram avaliados. No experimento 2, ainda foi avaliado o percentual de apoptose pela técnica TUNEL e a expressão do mRNA para caspases 3 e 9, Bax, Bcl-2 e FSH-R. Os resultados mostraram que 50 ng/mL foi a concentração mais eficaz de IGF-1, aumentando a ativação folicular. Esta concentração de IGF-1 associada ao FSH resultou em menor índice de apoptose folicular. Assim, conclui-se que 50 ng/mL de IGF-1 melhora o desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados inclusos no tecido ovariano ovino, pelo período de 8 dias. E a associação de IGF-1 e FSH é eficiente para reduzir os níveis de apoptose folicular nestas condições de cultivo, favorecendo o equilíbrio entre a expressão relativa dos genes Bax, Bcl-2 e Caspase 3, e uma diminuição na expressão relativa da Caspase 9 nos tratamentos contendo IGF-1.

Palavras-chave: crescimento folicular, oócito, ovelha.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its association with FSH on the activation, morphology, diameter and apoptosis of ovine preantral follicles grown in situ. Sheep ovary obtained from a slaughterhouse were used. In experiment 1, in situ culture of ovarian cortex fragments was performed for 8 days (39 ° C and 5% CO₂) in 1 mL α -MEM + supplemented with IGF-1 at the concentrations of 0, 10, 25, 50, 75 and 100 ng / ml. In Experiment 2, the best concentration of IGF-1 from Experiment 1 (50 ng / mL) was selected which was or was not increased by 50 ng / mL follicle stimulating hormone (FSH). The fragments were analyzed by classical histology (Experiments 1 and 2) and immunohistochemistry and qPCR (Experiment 2). Morphologically, the follicles were classified into primordial and developing (primary and secondary) as well as normal or atresic. In addition, follicular diameters were also evaluated. In the experiment 2, the percentage of apoptosis by the TUNEL technique and the mRNA expression for caspases 3 and 9, BAX, BCL2 and FSH-R were also evaluated. The results showed that 50 ng / mL was the most effective concentration of IGF-1, increasing follicular activation. This FSH-associated IGF-1 concentration resulted in a lower rate of follicular apoptosis. Thus, it is concluded that 50 ng / ml of IGF-1 improves the development of cultured preantral follicles included in ovary ovarian tissue, for a period of 8 days. And the association of IGF-1 and FSH is efficient in reducing the levels of follicular apoptosis in these culture conditions, favoring the balance between the relative expression of the BAX, BCL2 and Caspase 3 genes, and a decrease in the relative expression of Caspase 9 in the treatments Containing IGF-1.

Key words: follicular growth, oocyte, sheep.

Introdução

Os ovários de mamíferos têm milhões de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) que são fonte de futuros gametas maduros em animais adultos. Porém, somente após seu crescimento, os folículos produzem um oócito fertilizável que é capaz de sustentar o desenvolvimento do embrião (Capacchietti et al., 2003).

A maioria dos folículos pré-antrais sofrem apoptose durante o desenvolvimento e, dentre os fatores que podem levar à apoptose, destacam-se o estresse oxidativo, a irradiação, danos ao DNA, citocinas, proteínas virais, ativação de genes promotores de apoptose e a deficiência de fatores de sobrevivência da célula (Celestino et al., 2009; Van Cruchten e Van Den Broeck, 2002).

O envolvimento de vários hormônios e fatores de crescimento na regulação do desenvolvimento e sobrevivência de folículos pré-antrais, durante o cultivo *in vitro*, vem sendo bastante demonstrado (Silva et al., 2016). Dentre esses fatores, destacam-se o hormônio folículo estimulante (FSH) e o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), os quais exercem papel bem definido no controle e na regulação da foliculogênese em diversas espécies (Tisdall et al., 1995; Armstrong et al., 2000; Magalhães-Padilha et al., 2012; Dubey et al., 2015).

Membros da família IGF desempenham papel fundamental tanto no desenvolvimento de folículos pré-antrais à pré-ovulatórios, como no processo de atresia folicular (Zhao et al., 2001; Hastie et al., 2006). Em ovelhas, o RNAm para todos os componentes do sistema IGF, foram demonstrados em folículos viáveis e atrésicos, sugerindo importante papel para o IGF na foliculogênese desta espécie (Hastie et al., 2006; Muñoz-Gutierrez et al., 2005). Além disso, tem sido relatado que a adição do IGF-1 ao meio de cultivo *in situ*, suporta o desenvolvimento de folículos pré-antrais isolados em ovinos (Arunakumari et al., 2010).

Por outro lado, informações limitadas estão disponíveis sobre o impacto do IGF-1, isoladamente ou em associação ao FSH, sobre o crescimento e morte celular em folículos pré-antrais de ovinos cultivados *in situ*. A compreensão dos complexos mecanismos, exercidos por fatores de crescimento, na regulação do desenvolvimento e sobrevivência de folículos pré-antrais poderá fornecer informações importantes para o desenvolvimento de adequado sistema de cultivo para folículos pré-antrais, além de disponibilizar ferramentas essenciais para a multiplicação e conservação de material genético em ovinos.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) e sua associação com o FSH, sobre a sobrevivência, desenvolvimento folicular, crescimento e apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

Químicos e 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.

Coleta do tecido ovariano

Tecidos cortical ovariano foram obtidos a partir de ovários de ovelhas adultas, sem raça definida, independente do estágio do ciclo estral, coletados em abatedouro comercial. Os ovários (n = 60), foram lavados em álcool 70%, seguidos por duas lavagens em Meio Essencial Mínimo alfa (α -MEM) acrescido com 20 mM de HEPES, 100 μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina e transportados ao laboratório em caixas isotérmicas à 4 °C, nas duas horas seguintes ao abate.

No laboratório, os ovários coletados foram separados de todo o tecido de gordura e ligamentos, cortados ao meio, e então a medula, grandes folículos antrais e corpos lúteos foram removidos. Em seguida, o córtex ovariano foi dividido em 4 fragmentos por ovário. Um fragmento foi imediatamente fixado em formalina tamponada a 10% para estudos histológicos clássicos (controle fresco). Os demais fragmentos foram selecionados para cultivo.

Cultivo *in situ*

Fragmentos de tecido ovariano foram transferidos para placas de cultura de 24 poços e cultivados individualmente em 1 mL de meio de cultura base α -MEM suplementado com ITS (insulina 10 μ g/mL, transferrina 5,5 μ g/mL, e selênio 5,0 ng/mL), 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 250 ng/mL de anfotericina B (UNIANF[®],

Brasil) e 1 ng/mL gentamicina, a partir de agora chamado de α -MEM⁺. Os tecidos foram cultivados durante 8 dias a 39 °C com 5% de CO₂. A cada 2 dias, o meio de cultura foi totalmente substituído com meio fresco.

No *Experimento 1*, o α -MEM⁺ foi suplementado com diferentes concentrações de IGF-1 recombinante humano (0, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL). Este experimento foi repetido 3 vezes. Parâmetros como normalidade, ativação e diâmetro folicular foram avaliados.

No *Experimento 2*, os fragmentos foram cultivados em α -MEM⁺ suplementado com a concentração de IGF-1 que promoveu a maior taxa de ativação e viabilidade no experimento 1, associado ou não de 50 ng/mL de pFSH (Folltropin[®], Tecnopec, Brasil). Esta concentração de FSH, foi escolhida com base em estudos prévios em caprinos (Magalhães et al., 2009). Sendo os grupos analisados: grupo 1: CT (controle fresco); grupo 2: α -MEM⁺ (meio base suplementado); grupo 3: IGF-1 (α -MEM⁺ adicionado de 50 ng/mL de IGF-1); grupo 4: FSH (α -MEM⁺ adicionado de 50 ng/ml de pFSH), e grupo 5: IGF-1/pFSH (α -MEM⁺ adicionado de 50 ng/ml de IGF-1 e 50 ng/ml pFSH). Este experimento foi repetido 5 vezes utilizando ovários de animais diferentes. Parâmetros como normalidade, ativação, diâmetro e expressão de genes relacionados à apoptose, e marcação da apoptose pela técnica TUNEL foram avaliados.

Análise histológica e avaliação do crescimento *in situ*

Para avaliar a morfologia folicular após 8 dias de cultivo, cada fragmento de cultura foi fixado em formalina tamponada a 10% para estudos histológicos. Após a fixação, os fragmentos de tecido foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificados com xileno, e incluídos em cera de parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados com micrótomo em espessura de 5 μ m, montados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina. Os cortes histológicos foram examinados em microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) sob aumento de 400X.

Para a análise do desenvolvimento dos folículos pré-antrais, os folículos foram definidos como folículo primordial e folículos em desenvolvimento. 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 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, e folículos degenerados que foram definidos como apresentando oócito com núcleo picnótico, retração citoplasmática e/ou células da granulosa desorganizadas (Silva et al., 2004) (Figura 1).

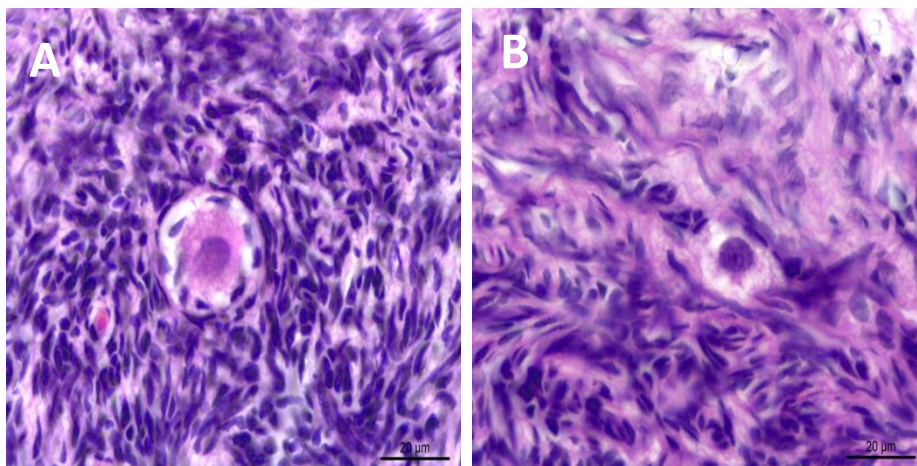


Figura 1. (A) Representação de um folículo normal; (B) Representação de um folículo anormal.

Os diâmetros de folículos morfologicamente normais foram registrados a partir das camadas externas dos folículos da camada de células da granulosa e mensurados pelo programa Image J/Fiji 1.46 (Ferreira; Rasband, 2012). Dois diâmetros perpendiculares foram registrados e a média dos valores foi analisada (Jimenez et al., 2016). Foram analisados 90 folículos por tratamento (*Experimento 1*) e 150 folículos por tratamento (*Experimento 2*).

Avaliação de apoptose (TUNEL)

Para detectar a apoptose pela fragmentação do DNA, cortes de ovários de cada grupo experimental do experimento 2, foram submetidos ao teste TUNEL (Terminal Deoxinucleotidil Transferase Uracil Nick End Labeling), utilizando o kit Apoptag Plus (Merck[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Secções seriadas de 5 µm foram montadas sobre lâminas silanizadas que foram secadas a 37°C por 12 horas, desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Posteriormente, foram incubadas em PBS (solução salina tamponada) por 5 minutos à

temperatura ambiente. Em seguida, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas, por 15 minutos. As lâminas foram então lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos à temperatura ambiente.

Após, os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão de equilíbrio por 60 minutos a 4 °C, seguido por incubação com TdT (transferase deoxitidil terminal) a 37 °C por 1 hora, em câmara úmida, na ausência de luz. Na etapa seguinte, foi aplicada a solução de parada (*stop*) por 10 minutos à temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anti-digoxigenina. As lâminas foram então enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) e contracolorados com hematoxilina. Após a coloração, as lâminas foram então lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz.

As avaliações foram realizadas em microscópio ótico (Leica DM 500) acoplado com câmara (Leica ICC50 HD) e software (LAS EZ 4.3). O índice apoptótico de proliferação celular foi determinado pela contagem de 30 folículos por lâmina, sendo 3 lâminas por tratamento, considerando positivos para o teste TUNEL os folículos com o oócito marcado e/ou mais de 50% das células da granulosa marcadas em marrom (Bertoldo et al., 2014).

Extração do RNA

O RNA total foi extraído, de cada fragmento de tecido ovariano, utilizando a técnica de trizol. Para cada amostra, foram adicionados 500 µL de TRI[®] Reagente, e deixado em repouso por 15 minutos, após o que foram adicionados 100 µL de clorofórmio (P.A) por 15 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (12.000 g/15 minutos), e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL. Ao sobrenadante coletado foi adicionado Isopropanol (1:1), e as amostras foram mantidas por 2 horas a -20 °C.

Após este período, as amostras foram centrifugadas (12.000 g por 15 minutos) e descartado cuidadosamente o sobrenadante. Ao sedimento foram adicionados 500 µL de etanol 70%, para retirar impurezas, e centrifugado na rotação máxima (5 minutos).

O sobrenadante foi novamente descartado e o microtubo deixado em repouso por 15 minutos. Em seguida foi adicionado água MilliQ para a eluição do RNA total. A confirmação da integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green II RNA (LGC[®] Biotecnologia), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado.

A concentração e pureza do RNA (razão A260:A280) foram verificadas utilizando um espectrofotômetro (Nano Vue Plus[®] - GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, o RNA foi convertido em DNA complementar (cDNA) utilizando transcrição reversa (ImProm-II Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI, EUA). Para a reação foram utilizados 2.500 ng de RNA total de cada amostra, 1 mL de Oligo (dT)¹⁵ e 1 mL de iniciador, incubados a 70 °C durante 5 minutos e 4 °C durante 5 minutos.

Após, foram adicionados 4 mL de tampão ImProm-II (5X), 2,4 mL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 mL de dNTP (0,5 mM), 1 mL de transcriptase reversa e água ultrapura completar o volume total de 20 mL. A reação foi realizada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C durante 60 minutos e a 70 °C, para inativar a enzima, durante 15 minutos.

O cDNA resultante foi medido em espectrofotômetro. As amostras foram padronizadas a 100 ng /mL e armazenadas a -80 °C até análise.

PCR real time (qPCR)

As amostras de cDNA foram submetidas à técnica de qPCR para estabelecer o nível de expressão do RNAm dos genes que codificam as proteínas relacionadas a apoptose, Bax (proteína X associada a Bcl2, pro-apoptótica), Bcl2 (leucemia / linfoma 2 de células B, antiapoptótico), caspases 3 e 9, além do receptor de FSH (FSH-R).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram construídos a partir de sequências depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 1). Para amplificação foi utilizado o protocolo QuantiFast[™] SYBR[®] Green PCR (QIAGEN, Dusseldorf, Alemanha), usando termociclador (Rotor-Gene Q[®] - QIAGEN, Dusseldorf, Alemanha). O tempo e temperatura da ciclagem foram os estabelecidos pelo fabricante e de acordo com a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores .

Todas as amostras foram testadas em duplicatas, incluindo um controle negativo (sem cDNA). A reação continha 1,5 mL de cDNA (100 ng / mL), 5,0 mL de SYBR Green (2x), 0,3 mL de oligonucleotídeos iniciadores diretos e inversos (10 pM) e H₂O, suficiente para o volume final de 10 mL. As condições de amplificação foram 5 minutos

a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C (desnaturação) e 30 segundos a 60 °C (anelamento e extensão). Para confirmar a presença de um único produto de PCR, a análise da curva de fusão foi realizada com aumento de 0,5 °C cada 5 segundos, de 60 °C a 95 °C. Os resultados de amplificação foram normalizados utilizando gene de referência ubiquitina. A quantificação relativa da expressão foi realizada pela técnica $2^{-\Delta\Delta C_t}$, de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de cada gene e código de acesso do gene no GenBank.

Produto	Sequência (5' → 3')	Acesso GenBank
BAX-ovis	F: CCTGGGATCTTGAAACTCTCCTT R: CTGAGCCAGGCTGAAATCAAAA	DQ323116.1
BCL2-ovis	F: GCCGAGTGAGCAGGAAGAC R: GTTAGCCAGTGCTTGCTGAGA	AY547260.1
Caspase 3-ovis	F: GCTCTTGAGAATCAACTCTGAGC R: CAGTGTTCTCCATGGATACTTTTT	XM_015104559.1
Caspase 9-ovis	F: TGCCGAACCTTGTCGCCTATT R: AGTCGTCAGGGGTAAAGTGC	XR_001435420.1
Receptor de FSH-ovis	F: GATTCGGAGACCTGGAGAAAAT R: GGTTGTTGGCCTTTTCAATTCTA	XM_015093783.1
Ubiquitina-capra	F: ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT R: GAAGATGGCCGCACTCTTGTGAT	XM_005693600.3

Abreviações: F= forward (direto); R= reverse (inverso)

Análise Estatística

As análises morfológicas de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários), as análises morfométricas (diâmetro folicular), e a expressão de genes relacionados à apoptose, foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguidas de comparações entre as médias, pelo teste de Tukey (versão 5.0; GraphPad.Prism; 2007).

Quando os dados não foram considerados dentro da normalidade pelo teste Kolmogorov – Smirnov, os valores foram transformados em logaritmo natural. As variáveis qualitativas de folículos pré-antrais normais e degenerados e de presença de

apoptose folicular pela imuno-histoquímica foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). A correlação entre as expressões relativas dos genes foi avaliada pelo teste de Pearson.

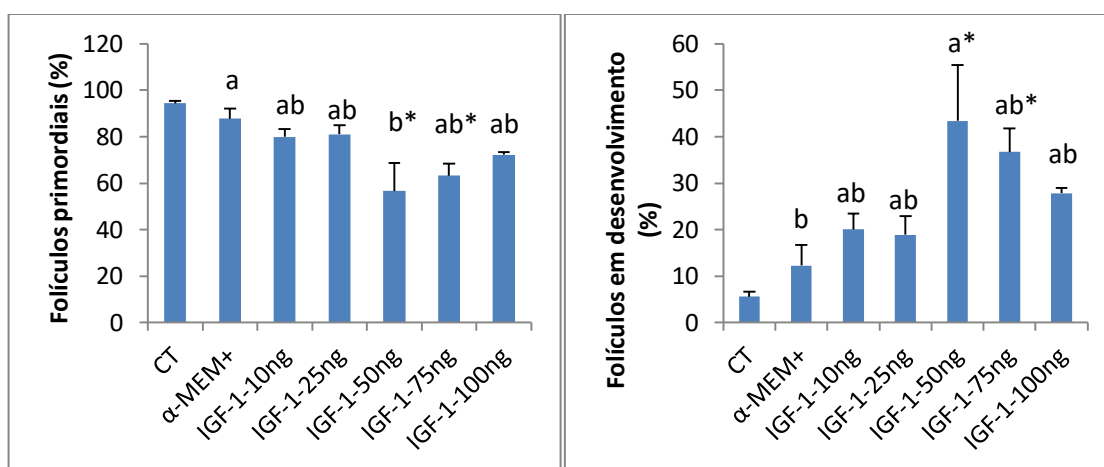
Os resultados de desenvolvimento folicular (primordial/desenvolvimento), morfologia (normal/degenerado) e apoptose (presente/ausente) são apresentados em percentuais, o diâmetro folicular e a expressão gênica foram apresentados em média \pm erro padrão da média. Valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1– Efeito de diferentes concentrações do IGF-1 sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais ovinos

Os dados avaliados mostraram que após 8 dias, o tratamento com 50 ng/mL de IGF-1 promoveu um aumento no número de folículos em desenvolvimento em relação ao controle fresco e ao α -MEM⁺, e o tratamento com 75 ng/mL, um aumento em relação ao controle fresco ($P < 0,05$). Ainda em relação ao número de folículos em desenvolvimento, a concentração de 50 ng/mL não divergiu dos demais tratamentos cultivados ($P < 0,05$) (Figura 2).

Figura 2– Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento cultivados em α -MEM⁺ ou α -MEM⁺ suplementado com 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de IGF-1 durante 8 dias.



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b} Letras minúsculas representam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Erro padrão.

Os diâmetros dos folículos nos diferentes tratamentos após 8 dias de cultivo são mostrados na Tabela 2. Não foi observada diferença significativa nos diâmetros dos folículos primordiais. Os folículos em desenvolvimento no cultivo acrescidos com as concentrações de IGF-1, apresentaram diâmetro folicular maior que os tratamentos sem IGF-1 ($P < 0,05$).

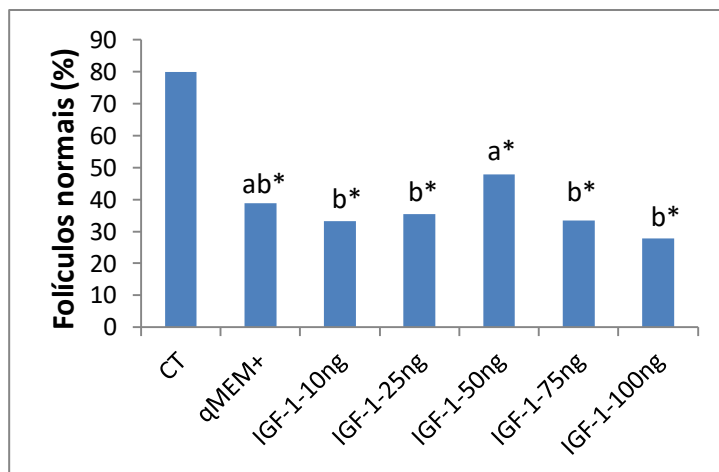
Tabela 2 – Média \pm desvio-padrão da média do diâmetro folicular de folículos pré-antrais ovinos cultivados com diferentes concentrações de IGF-1.

Tratamentos	Folículos Primordiais	Folículos em Desenvolvimento
	(μm)	(μm)
CT	17,6 \pm 1,3	26,0 \pm 1,8
α -MEM ⁺	17,8 \pm 1,6 ^a	24,6 \pm 2,1 ^b
IGF-1-10ng	15,0 \pm 1,1 ^a	46,9 \pm 7,6 ^{a*}
IGF-1-25ng	16,3 \pm 0,5 ^a	52,2 \pm 9,3 ^{a*}
IGF-1-50ng	15,1 \pm 1,9 ^a	52,3 \pm 11,5 ^{a*}
IGF-1-75ng	16,1 \pm 1,5 ^a	57,6 \pm 1,2 ^{a*}
IGF-1-100ng	17,6 \pm 0,3 ^a	45,2 \pm 8,4 ^{a*}

* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b} Letras minúsculas sobscritas na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Quanto à morfologia dos folículos, o controle fresco obteve o maior percentual de folículos normais dentre todos os grupos, e o grupo 50 ng/mL apresentou maior percentual de folículos normais, quando comparado aos demais tratamentos cultivados, apenas não divergindo do α -MEM+ ($P < 0,05$) (Figura 3).

Figura 3 – Percentual de folículos pré-antrais ovinos normais cultivados com diferentes concentrações de IGF-1.

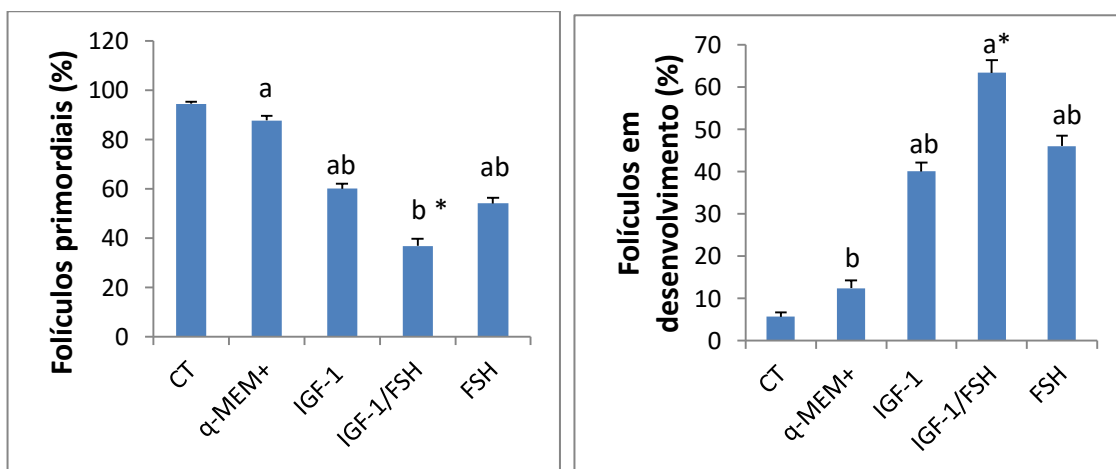


* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b} Letras minúsculas representam diferença significativa entre as colunas ($P < 0,05$).

Experimento 2– Efeito do IGF-1 associado ao FSH sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais ovinos

Quando observado o desenvolvimento folicular, os dados avaliados mostraram que após 8 dias, o tratamento contendo IGF-1 associado a FSH apresentou um menor percentual de folículos primordiais e um aumento no percentual de folículos em desenvolvimento em relação ao controle fresco e α -MEM+, não divergindo dos demais tratamentos cultivados ($P < 0,05$) (Figura 4).

Figura 4– Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento cultivados *in situ* com IGF-1 (50 ng/mL) e FSH (50 ng/mL).



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b} Letras minúsculas representam diferença significativa entre as colunas ($P < 0,05$).

Em relação ao diâmetro folicular, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) para os folículos primordiais (Tabela 3). Quando comparados os folículos em desenvolvimento, o diâmetro do grupo cultivado em α -MEM+ foi significativamente menor que os tratamentos com IGF-1 e com FSH ($P < 0,05$). Ainda em relação aos folículos em desenvolvimento, o grupo FSH teve o diâmetro menor que o grupo IGF-1, e o grupo IGF-1/FSH não teve diferença no diâmetro em relação aos grupos IGF-1 e FSH ($P < 0,05$). Comparando os diâmetros de folículos primordiais com os em desenvolvimento, todos os grupos apresentaram diferença significativa (Tabela 3).

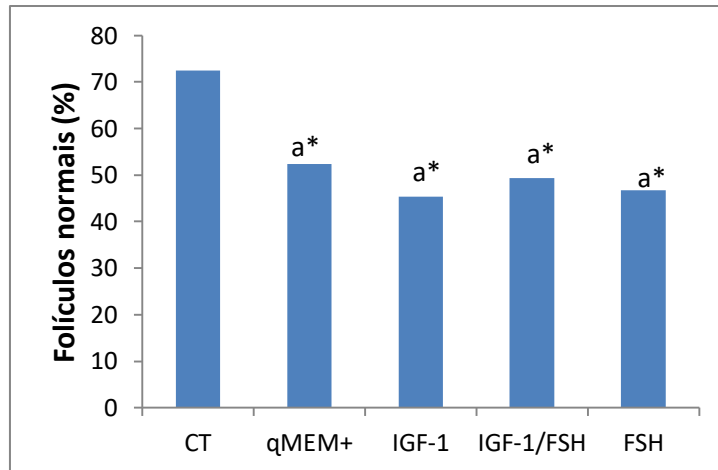
Tabela 3 – Média \pm desvio-padrão da média do diâmetro de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ* com IGF-1(50ng/mL) e FSH (50ng/mL).

Tratamentos	Folículos Primordiais (μm)	Folículos em Desenvolvimento (μm)
CT	17,6 \pm 1,3	26,0 \pm 1,8
α -MEM+	17,8 \pm 1,6a	24,6 \pm 2,1c
IGF-1	15,0 \pm 1,5a	47,8 \pm 9,1a*
IGF-1/FSH	14,8 \pm 1,8a	41,9 \pm 2,1ab*
FSH	17,2 \pm 1,6a	33,9 \pm 4,7b

* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$);

Em relação a avaliação de folículos normais (Figura 5). Foi observado que todos os tratamentos foram diferentes em relação ao grupo controle fresco, porém não divergiram entre si ($P < 0,05$).

Figura 5 – Percentual de folículos pré-antrais ovinos normais cultivados com IGF-1(50ng/mL) e FSH (50ng/mL).



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b} Letras minúsculas representam diferença significativa entre as colunas ($P < 0,05$).

A avaliação da apoptose pela imuno-histoquímica mostrou que todos os grupos obtiveram diferença em relação a marcação da apoptose nos folículos ovarianos ($P < 0,05$). Como pode ser observado na Figura 6, o grupo α -MEM⁺ obteve o maior marcação de apoptose folicular, seguido dos tratamentos com FSH, IGF-1, e posteriormente pelo grupo IGF-1/FSH. Sendo os grupo IGF-1/FSH o com menor número de folículos em apoptose entre os tratamentos avaliados ($P < 0,05$; Figura 6).

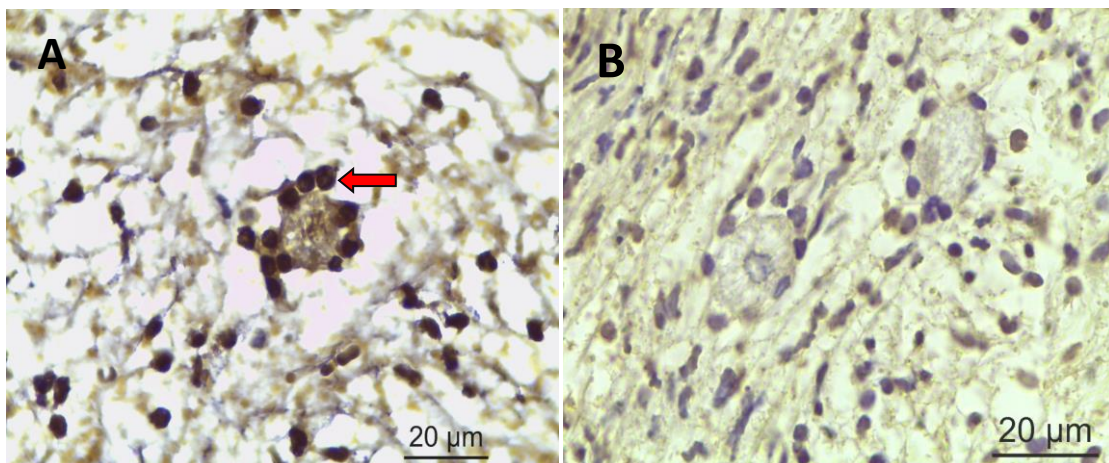
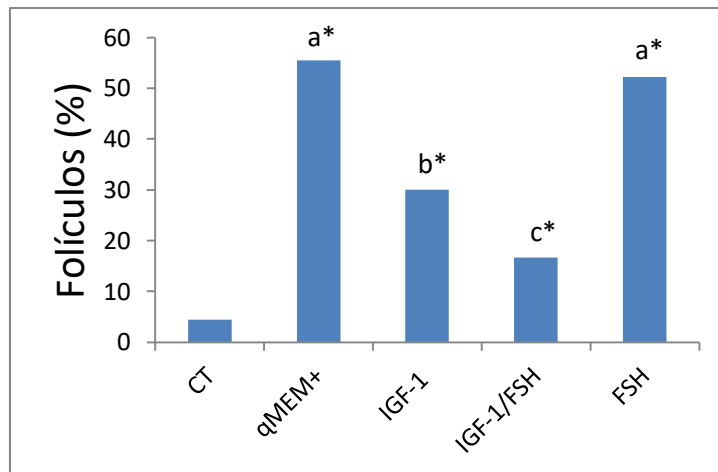


Figura 6. Imagens representativas da imuno-marcação, pela técnica de TUNEL, em fragmentos ovarianos cultivados *in situ*, durante 8 dias. As células TdT-positivas são representadas pela coloração marrom ilustrada pela seta: (A) α -MEM⁺, (B) α -MEM⁺ na presença de IGF-1/FSH.

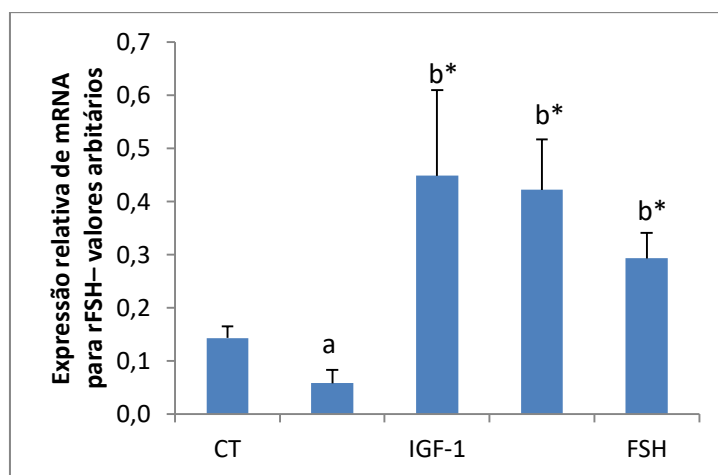
Figura 7 - Percentual de folículos pré-antrais positivos para apoptose pela técnica de TUNEL, após cultivo *in situ* durante 8 dias.



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT); ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Ao avaliar a expressão relativa do receptor do FSH (FSH-R), foi observada menor expressão do receptor no grupo α -MEM⁺ em relação aos demais tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8— Expressão relativa do mRNA para o receptor de FSH, após cultivo *in situ* dos fragmentos de córtex ovariano de ovinos.



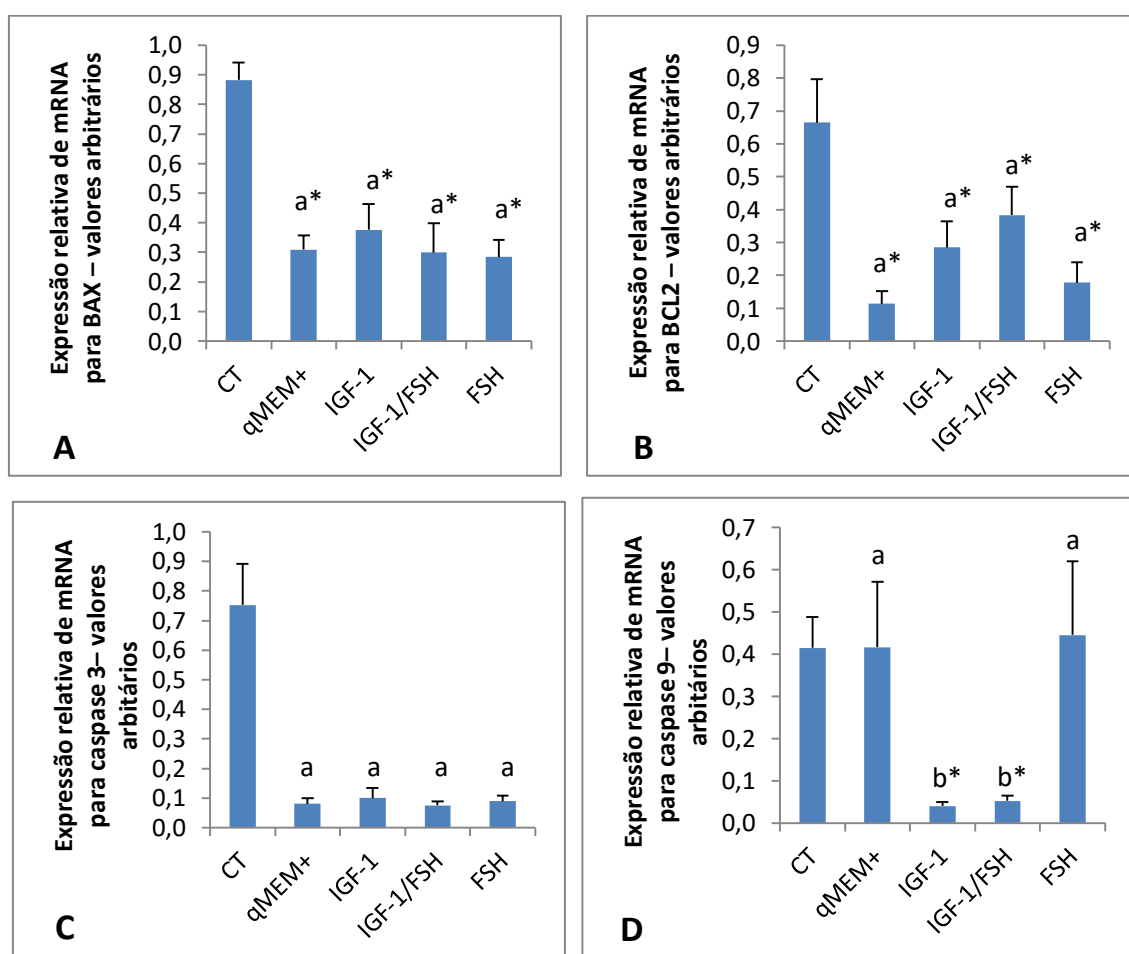
* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b} Letras minúsculas diferentes entre tratamentos representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Para a avaliação da expressão relativa dos genes BAX e BCL2, não foi demonstrada diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 9), podendo-se observar também correlação positiva ($P < 0,0001$; $r = 0,7129$) entre as expressões dos dois genes.

Em relação a avaliação da expressão relativa para caspase 3, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 9). Encontrando-se correlação positiva da caspase 3 com BAX ($P = 0,0006$; $r = 0,7126$) e BCL2 ($p = 0,0007$; $r = 0,6429$) neste experimento.

Já a expressão relativa da caspase 9, foi maior para os tratamentos α -MEM+ e FSH, tendo uma baixa expressão nos grupos IGF-1 e IGF-1/FSH ($P < 0,05$) (Figura 7).

Figura 9– Expressão relativa do RNAm para os genes Bax (A); Bcl-2 (B); caspase 3 (C) e caspase 9 (D), após cultivo *in situ* dos fragmentos de córtex ovariano de ovinos.



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT); ^{a,b} Letras minúsculas diferentes entre tratamentos representam diferença significativa ($P < 0,05$). (A) Bax; (B) Bcl-2; (C) Caspase 3 e (D) Caspase 9.

DISCUSSÃO

O IGF-1 em concentrações supra fisiológicas tem sido implicado em modificações do sistema regulatório da foliculogênese ovariana, permitindo a ativação e desenvolvimento de folículos pré-antrais, manutenção de grupos maiores de pequenos folículos antrais, recrutamento de mais folículos, e a seleção de dois ou mais folículos dominantes dentro de uma onda folicular (Silva et al., 2009).

No presente estudo, o tratamento com IGF-1, na concentração de 50 ng/mL, adicionado ao meio de cultivo, promoveu a ativação dos folículos primordiais, como observado pelo aumento no percentual de folículos em desenvolvimento após 8 dias de cultivo *in situ*. Além disso, o IGF-1 também aumentou o percentual de folículos normais, porém não afetou o diâmetro dos folículos.

Estudos prévios em ovinos, tem demonstrado que o IGF-1 promove, proliferação das células da granulosa de pequenos folículos (1-3 mm de diâmetro) (Monniaux et al., 1992), assim como aumento no diâmetro de folículos pré-antrais isolados, cultivados por seis dias em meio contendo 10 ng/ml de IGF-1 (Arunakumari et al., 2010). Os resultados obtidos neste experimento, corroboram com os achados de Martins et al. (2009), os quais observaram, que a utilização de IGF-1 na concentração de 50 ng/ml em meio de cultivo promoveu a manutenção da sobrevivência folicular, o crescimento e a transição de folículos em transição para primários, após 7 dias de cultivo de tecido ovariano caprino.

Entretanto, resultados controversos tem sido publicados em outras espécies. Em bovinos, Fortune et al. (2004) relataram que nenhuma das concentrações de IGF-1 testadas (1, 10 e 100 ng/mL) estimularam os folículos primordiais e primários durante o cultivo *in situ*. Além disso, Rossetto et al. (2013) mostraram que, a adição de 50 ng/mL de IGF-1 ao meio de cultura de folículos pré-antrais isolados de bovinos não teve nenhum efeito sobre a morfologia folicular e a formação do antro.

Em contraste, Jimenez et al. (2016), observaram que IGF-1 na concentração de 30 ng/mL promoveu aumento dos folículos em desenvolvimento, melhorou os percentuais de folículos morfológicamente normais, e aumentou os diâmetros médios folicular e oocitário, quando comparado às concentrações de 70 e 100 ng/mL de IGF-1.

Estes resultados aparentemente, podem ser explicados pelas diferenças fisiológicas entre as espécies estudadas, tamanho dos folículos, concentração e duração do tratamento e a presença/ausência de outros fatores de crescimento e soro no meio de cultivo, além do tipo de cultivo dos folículos *in situ* e isolados (Apoloni et al., 2016).

No presente trabalho, o cultivo foi realizado em meio livre de soro e sem qualquer outro fator de crescimento ou hormônios além do IGF-1. Entretanto, outros estudos como os de Magalhães-Padilha et al. (2012) adicionaram gonadotrofinas, outros fatores de crescimento ou hormônios, os quais podem ter interagido com o IGF-1 e afetado as vias de sinalização apresentando diferentes respostas em diferentes concentrações.

A interação entre fatores de crescimento e gonadotrofinas e seu papel na modulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação de células foliculares e oócitos, foi reportada em várias espécies animais, a saber, suínos (Mao et al., 2004), ovinos (Arunakumari et al., 2006) e bovinos (Thomas et al., 2007; Wandji et al., 1996). É sabido que o IGF-1 atua sinergicamente com FSH para aumentar a proliferação, esteroidogênese e atividade de células da granulosa cultivadas de ratos (Guidice et al., 1992).

Alguns estudos demonstraram também que a utilização de IGF-I em sinergia com FSH no meio de cultivo *in vitro* estimulou crescimento folicular pré-antral em camundongos (Liu et al., 1998), seres humanos (Louhio et al., 2000) e vacas (Gutierrez et al., 2000).

Neste estudo, a sinergia do IGF-1 e FSH comparada à ação dos fatores isolados, foi mais eficiente para a ativação folicular e crescimento, comparada aos tratamentos isolados. Estes resultados corroboram com os achados de Magalhães-Padilha et al. (2012) que mostraram pela primeira vez, a importância do FSH associado ao IGF-I, durante um período completo de cultivo a longo prazo (16 dias), sobre a foliculogênese precoce em cabras. Estes autores também mostraram que a associação dessas substâncias estimulou a ativação de folículos primordiais, bem como o desenvolvimento de folículos primários a secundários.

O IGF-1 atua em sinergia com FSH na indução do desenvolvimento das células da granulosa, pela regulação da expressão de receptores para FSH. Além disso, o FSH foi descrito como o hormônio que estimula o aumento dos receptores de IGF-1 durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa, sugerindo que alguns efeitos de FSH poderiam ser mediados via IGF-1 (Adashi et al., 1985; Silva et al., 2009).

A expressão do receptor de FSH foi severamente reduzida em folículos pré-antrais com ausência de IGF-1 em ratos, mas aparentemente restaurada a níveis normais após duas semanas de suplementação de IGF-1 exógeno (Zhou et al., 1997). O que foi observado neste experimento, visto que, os tratamentos contendo FSH, IGF-1 e IGF-

1/FSH aumentaram a expressão dos receptores de FSH, mostrando que o IGF-1 tem ação sobre a expressão do receptor do FSH em fragmento de córtex ovariano ovino.

Os resultados deste estudo, corroboram com os relatados por Brito et al. (2012), os quais, ao avaliarem o desenvolvimento de folículos secundários isolados de cabras em meio de cultura contendo IGF-1 (50 ng/ml) e / ou FSH (100 ng/ml), observaram aumento nos níveis de RNAm de IGF-1, IGFR-1 e FSHR nos folículos após seis dias de cultivo. Observaram ainda que a sinergia de IGF-1 e FSH aumentaram a expressão relativa quando comparado com o grupo com apenas FSH.

Ao avaliarem o efeito de IGF-1 (50 ng/mL) e FSH(50 ng/mL) sobre a expressão do m RNA do receptor de IGF-1 e do receptor de FSH em bovinos, Mani et al. (2010) observaram também que o tratamento com IGF-1 e FSH aumentou significativamente ($P > 0,05$) a expressão destes receptores.

A avaliação da apoptose através da técnica TUNEL permitiu observar menor número de folículos positivos para apoptose quando foi usada a associação de IGF-1 e FSH. Esse resultado foi semelhante ao obtido em suínos, com a utilização de IGF-I (50 ng/mL) que resultou no crescimento folicular, no estímulo da proliferação das células da granulosa e na prevenção da apoptose de folículos pré antrais cultivados por 4 dias na presença de soro e FSH (Guthrie et al., 1998).

Avaliando o cultivo de folículos pré-antrais isolados de búfalas, Sharma et al. (2010) observaram através da técnica TUNEL, que a adição de IGF-1 no cultivo contendo TGF- α (fator de crescimento de transformação alfa) + TGF- β 1 (fator de crescimento de transformação beta 1) reduziu significativamente o efeito apoptótico nos oócitos, indicando que o IGF-I além de melhorar o crescimento e sobrevivência de folículos cultivados, tem ação anti-apoptótica.

Neste estudo, os níveis de expressão relativa de Bax e Bcl-2 não divergiram entre os tratamentos cultivados, tendo apenas uma maior expressão de ambas no controle fresco ($P < 0,05$). Foi observado também uma correlação positiva entre a expressão de Bax e Bcl-2, o que sugere que a diminuição da apoptose nos tratamentos deve-se ao equilíbrio da expressão destes dois genes. Em geral, a proporção relativa de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax) parece determinar a resistência celular ao estímulo apoptótico (Ola et al., 2011).

Diferente dos achados do presente estudo, Araújo et al. (2015) ao analisarem os genes Bax e Bcl-2 em oócitos e células do cumulus de bovinos, observaram menor expressão de mRNA para Bcl-2 no grupo IGF-1 em oócitos em relação aos tratamentos

sem IGF-1. Mani et al. (2010) ao avaliarem os efeitos de IGF-1 e/ou FSH sobre a expressão de mRNA dos genes reguladores da apoptose, Bcl-2 e Bax, nas células da granulosa de folículos antrais de bovinos após 48 horas de cultivo, demonstraram que a expressão do mRNA para Bcl-22 não foi afetada pelo tratamento com IGF-1 ou FSH sozinho ou associados.

Ao avaliar a Caspase 3, não houve aumento da sua expressão relativa em nenhum tratamento cultivado, o que se explica pela expressão relativa de Bax e Bcl-2 terem supostamente evitado a ativação dessa caspase 3, visto que sua expressão teve correlação positiva tanto com BAX como com BCL2.

Neste trabalho, foi observada menor expressão relativa da Caspase 9 nos tratamentos com IGF-1 e IGF-1/FSH. O IGF-I super-regula a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xl, fosforila a pró-caspase-9 impedindo a sua ativação em caspase-9, potente agente apoptótico e impede a progressão da cascata das caspases agindo sobre a Caspase-3 (Parrizas, 1997).

CONCLUSÕES

Conclui-se que 50 ng/mL de IGF-1 melhora o desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados inclusos no tecido ovariano ovino, pelo período de 8 dias. A associação de IGF-1 e FSH foi eficiente para reduzir os níveis de apoptose folicular nestas condições de cultivo, favorecendo o equilíbrio entre a expressão relativa dos genes BAX, BCL2 e Caspase 3, e uma diminuição na expressão relativa da Caspase 9 nos tratamentos contendo IGF-1.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

Adashi, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal Reproduction Immunology**, v.39, p.13–19, 1998.

Amsterdam, A.; Sasson R., Keren-Tal I.; Aharoni D.; et al. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p.1355-1362, 2003.

Apolloni, J.B.; ALVES, B.G.; Figueiredo, J.R. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.44,p. 1369,2016.

Araujo, M.S.; Guastali, M. D.; Castilho, A. C. S.; Landim-Alvarenga, L. 182 effects of igf-1 or igf-1-longr3 on cellular and molecular aspects of cumulus-oocyte complexes during in vitro oocyte maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development** . v. 28, n.2, p. 222, 2015.

Armstrong, D.G.; Baxter, G.; Gutierrez, C.G.; Hogg, C.O.; Glazyrin, A.L.; Campbell, B.K.; Bramley, T.A.; Webb, R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v.139, p.2146-2154, 1998.

Arunakumari, G.; Shanmugasundaram, N.; Rao, V.R. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884 – 894, 2010.

Arunakumari,G.; Vagdevi, R.; Rao, B. S.; Naik, B. R.; Naidu, K. S.; Suresh, R. V.; Rao, V. H. Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preantral follicles, **Small Ruminant Research**, v. 70, p.93–100, 2006.

Basso, A. C.; Esper, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 311-319, 2002.

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

Braw-Tal, R., Yossefi, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.109, p.165–171, 1997.

Brito, R. ; Saraiva, M.V.A.; Araújo, V.R.; Celestino, J.J.H.; Magalhães-Padilha, D.M.; Lima, I.M.; Van den Hurk, T R.; Figueiredo, J.R.; Silva, J.R.V. The effect of IGF-1 and FSH on the in vitro development of caprine secondary follicles and on the IGF-1, IGFR-I and FSHR mRNA levels I. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p.729–732, 2012.

Capacchietti, G.; Cecconi, S.; Colantoni, E.; Russo, V.; Berardinelli, P.; Barboni, B.; Mattioli, M. In vitro Growth of Sheep Preantral Follicles: Which Perspectives? **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 1, p. 583–586, 2003.
Catz, S. D.; Johnson, J. L. BCL-2 in prostate cancer: A minireview. **Apoptosis**, v. 8, n. 1, p. 29-37, 2003.

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

Cecconi, S., Barboni, B., Coccia, M. and Mattioli, M., 1999. In vitro development of sheep preantral follicles.

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.; Bão, S. N.; Figueiredo, J. R. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured *In vitro*. **Reproductive Science**, v. 16, p. 239-246, 2009.

De Bem, T. H. C.; Adona, P. R.; Bressan, F. F.; Mesquita, L. G.; Chiaratti, M. R.; Meirelles, F. V.; Leal, C. L. V. The influence of morphology, follicle size, and Bcl-2 and

Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocyte. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.576-583, 2014.

Fabian, D.; Il'kova, G.; Rehak, P.; Czikkova, S.; Baran, V.; Koppel, J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplan-tation embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 61, p. 745–755, 2004.

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

Figueiredo, J.R.; Rodrigues, A.P.R.; Amorim, C.A.; Silva, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.303-327.

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

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

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., Identification of ... death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, **Journal Cell Biology**, v.119, p. 493, 1992.

Guidice, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. **Endocrinology Reviews**, v.13, p.641–669, 1992.

Guthrie, H.D.; Garrett, W.M.;Cooper, B.S. Follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. **Biology Reproduction**, v.58, p.390-396,1998.

Gutierrez, C.G.; Ralph, J.H.; Telfer, E.E.; Wilmut, I.; Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 1322-1328, 2000.

Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7^a ed., São Paulo, Manole, 513p. 2004.

Hastie PM, Haresign W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 284–299,2006a.

Hastie, P.M.; Haresign, W. A role for LH in the regulation of expression of mRNAs encoding components of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**. v.96,p. 196-209,2006b.

Hemamalini, N. C.; Rao, B. S.; Tamilmani, G.; Amarnath, D.; Vagdevi, R.; Naidu, K. S.; Reddy, K. K.; Rao, V. H. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 50, p. 11–22, 2003.

Iacopino, F.; Angelucci, C.; Lama, G.; Zelano, G.; Latorre, G.; D`Addressi, A.; Giovannini, C.; Bertaccini, A., Macaluso, M. P.; Martorana, G.; Sica, G. Apoptosis-Related gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. **Anti Cancer Research**, v.26, n. 3, p. 849-854, 2006.

Itoh, T.; Kacchi, K.; Abe, H.; Sendai, Y.; Hoshi, H. Growth, antrum formation and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology Reproduction**, v. 67, p.1099– 1105, 2002.

Jewgenow K. Impact of peptide growth factors on the culture of preantral follicles of domestic cats. **Theriogenoogy**, v.45, p. 889–895, 1996.

Jimenez, C.R.; Azevedo, J.L.; Silveira, R.G.; Penitente-Filho, J.; Carrascal-Triana, E.L.; Zolini, A.M.; Araujo, V.R.; Torres, C.A.A.; Gonçalves, W.G. Effects of IGF-1 on *In Vitro* Culture of Bovine Preantral Follicles are Dose-Dependent. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 435–444, 2016.

Kim, M. R.; Tilly, J. L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1644, p.205–210, 2004.

Liu, X.; Andoh, K.; Yokota, H.; Kobayashi J, Abe, Y.; Yamada, K.; Mizunumaem U. H.; Ibuki, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. **Endocrinology**, v. 139, p. 2342-2347, 1998.

Louhio, H.; Hovatta; O., SjöberG, J.; Tuuri, T. The effects of insulin, and insulin-like growthfactors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, v.6, p.694-698, 2000.

Luz, V.B.; Chaves, R.N.; Alves, A.M.C.V.; Pinheiro, A.S.; Figueiredo, J.R.. Papel do Fator de Crescimento semelhante à Insulina-I (IGF-I) e Kit Ligand (KL) na função ovariana. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p. 1300, 2015.

Magalhães, D.M.; Duarte, A.B.G.; Araújo, V.R.; Brito, I.R.; Soares, T.G.; Lima, I.M.T.; Lopes, C.A.P.; Campello, C.C.; Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone, **Theriogenology**, v.75, n. 1, p.182-188, 2011.

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. **Reproduction Animal**, v.33, n.4, p.171-182, 2009.

Magalhães-Padilha, D. M.; Andrade, P. M.; Sales, E. T.; Araujo, V. R.; Lima, I. M.; Castro, S. V.; Faustino, L. R.; Lopes, C. A.; Campello, C. C.; Bão, S. N.; Gastal, M. O.;

Gastal, E. L.; Figueiredo, J. R. Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 159-68, 2012a.

Magalhães-Padilha, D. M.; Duarte, A. B. G.; Araújo, V. R.; Saraiva, M. V. A.; Almeida, A. P.; Rodrigues, G. Q.; Matos, M. H. T.; Campello, C. C.; Silva, J. R.; Gastal, M. O.; Gastal, E. L.; Figueiredo, J. R. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 77, p. 206-213, 2012b.

Mani, A. M.; Fenwick, M. A.; Cheng, Z.; Sharma, M. K.; Singh, D.; Wathes, D. C. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositoldependent kinase/AKT in bovine granulosa cells . **Reproduction**, v. 139, p. 139–151, 2010.

Makarevich, A. V.; Markkula, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 386–392, 2002.

Makarevich, A. V.; Markkula, M. Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. **Biology Reproduction**, v. 66, p. 386-439, 2002.

Mao, J.; Smith, M. F.; Rucker, E. B.; Wu, G. M.; Mccauley, T. C.; Cantley, T. C.; Prather, R. S.; Didion, B. A.; Day, B. N. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1967–1975, 2004.

Mao, J.; Wu, G.; Smith, M.F.; Mccauley, T.C.; Cantley, T.C.; Prather, R.S.; Didion, B.A.; Day, B.N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1197-1203, 2002.

Martins, F. S. ; Celestino, J. J. H. ; Saraiva, M. V. A. ; Matos, M. H. T. ; Bruno, J. B. ; Rocha-Junior, C. M. C. ; Lima-Verde, I. B. ; Lucci, C. M. ; Bao, S. N. ; Figueiredo, J. R.. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 916, 2008.

Matos, M.H.T.; Lima-Verde, I.B.; Luque, M.C.A.; Maia Jr, J.E.; Silva, J.R.V.; Celestino, J.J.H.; Martins, F.S.; Bao, S.N.; Lucci, A.M.; Figueiredo, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. **Zygote**. v. 15, p. 173-182, 2007.

Metoki, T.; Iwata, H.; Itoh, M.; Kasai, M.; Takajyo, A.; Suzuki, A.; Kuwayama, T.; Monji, Y. Effects of follicular fluids on the growth of porcine preantral follicle and oocyte. **Zygote**, v. 16, p. 239-247, 2008.

Monget, P.; Fabre, S.; Mulsant, P.; Lecerf, F.; Elsen, J.M.; Mazerbourg, S.; Pisselet, C.; Monniaux, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23,p.139-154,2002.

Monniaux, D.; Pisselet, C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. **Biology Reproduction**, v. 46, p.109–119, 1992.

Munoz-Gutierrez, M.; Findlay, P.A.; Adam, C.L.; Wax, G.; Campbell, B.K.; Kendall, N.R. et al. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. **Reproduction**, 2005;130:869–81.

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

Ola, M. S.; Nawaz, M.; Ahsan, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.351, p.41-58, 2011.

Parrizas, M.; LeRoith, D.. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product . **Endocrinology** v.138, p.1355-1358, 1997.

Petros, A.M.; Olejniczak, E.T.; Fesik, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1644, p.83-94, 2004.

Reed, J. C. Apoptosis Based Therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1, n.2, p.11-121, 2002.

Richards, J.S.; Russell, D.L.; Ochsner, S.; Espey, L.L. Ovulation: new dimension and new regulators of the inflammatory like response. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 69–92, 2002.

Rodrigues, G. Q.; Silva, C. M. G.; Faustino, L. R.; Bruno, J. B.; Pinto, L. C.; Lopes, C. A. P.; Campello, C. C.; Figueiredo, J. R.. Efeito de diferentes concentrações de hormôniofolículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antraiscaprinos e ovinos isolados. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.3, p.144-152, 2010.

Rossetto, R.; Santos, R. R.; Silva, G. M.; Duarte, A. B. G.; Silva, C. M. G.; Campello, C. C.; Figueiredo, J. R. Comparative study on the *in vitro* development of caprine and bovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 167-170, 2013.

Santos, S.S.D.; Biondi, F.C.; Cordeiro, M.S.; Miranda, M.S.; Dantas, J.K.; Figueiredo, J.R.; Ohashi, O.M. Isolation, follicular density and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages, **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 1–15, 2006.

Saumande, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil De Medecine Veterinaire**, v. 157, p.29-38, 1981.

Schams, D.; Berisha, B.; Kosmann, M.; Einspanier, R.; Amselgruber, W.M. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian

function in large farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.279–285, 1999.

Sharma G. T.; Pawan, K. Dubey, A. , Kumar, G. S. Effects of IGF-1, TGF- α plus TGF- β 1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalus*) preantral follicles. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 20, p. 319–325, 2010.

Sharma, G.T.; Pawan, K.D.; Meur, S.K. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three dimensional collagen gel culture system, **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 115–124, 2009.

Silva J.R.V., Brito I.R., Leitão C.C.F., Silva A.W.B., Passos M.J., Vasconcelos G.L., Saraiva M.V.A., Almeida A.P. ; Figueiredo J.R. 2008. **Quantificação da proteína e do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante à insulina- 1 (IGF-1) em folículos ovarianos caprinos**. In: Resumos da XXII Reunião Anual da SBTE (Guarujá, SP, Brasil). p.466

Silva J.R.V., Ferreira M.A.L., Costa S.H.F., et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 203-209, 2002.

Silva, J.R.V.; Figueiredo, J. R.; Van den Hurk C. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, p. 1193-1208, 2009.

Sudo, N.; Shimizu, T.; Kawashima, C.; Kaneko, E.; Tetsuka, M.; Miyamoto, A. Insulinlike growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A), **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 264, p. 197–203, 2007.

Thomas, F.H.; Campbell, B.K. , Armstrong, D.G.; Telfer, E.E. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. **Reproduction**, v. 133, p.1121–1128, 2007.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Barrios-De-Tomasi, J., Maldonado, A., Nayudu, P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of FSH: studies derived from in vitro and in vivo models. **Biology Reproduction**, v. 69, p.379–389, 2003.

Van Cruchten, S.; Van Den Broeck, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomic Histology Embryology**, v. 31, p. 214–223, 2002.

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

Wandji, S.A.; Eppig, J.J.; Fortune, J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817–832, 1996.

Xu, Z.; Garverick, H.A.; Smith, G.W.; Smith, M.F.; Hamilton, S.A.; Youngquist, R.S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p.951–957, 1995.

Yang, M. Y.; Rajamahendran, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.70, p.159–169, 2002.

Youle, R. J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.47–59, 2008.

Zhao, J., Taverne, M.A., Van de Weijden, G.C.; Bevers MM, van den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Molecular and Reproduction Development**, v.58, p. 287–96, 2001.

Zhou, H.; Zhang, Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 265–272, 2005a.

Zhou, H, Zhang, Y. Impact of growth factors on in vitro development of caprine oocytes at pre-antral stage. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p. 161–165, 2005b.

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, 2005c.

Zhou, J.; Kumar ,T.R.; Matzuk, M.M.; Bondy, C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. **Molecular and Endocrinology**, v. 11, p. 1924-1933, 1997.

CAPÍTULO 2

CULTIVO *in situ* COM O FATOR SEMELHANTE A INSULINA 1 (IGF-1) E FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) PARA AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E CRESCIMENTO FOLICULAR

[Growth and apoptosis of ovine preantral follicles *in situ* cultured with insulin-like growth factor 1(IGF-1) and epidermal growth factor (EGF)]

S.S. Duarte^{1*}, S. S. N. Rocha¹, D. M. F. Silva¹, A. M. Batista¹, M. A. S. Medeiros³, C. G. D'Assunção², C.G.M. Ferreira², A.A.C.Teixeira², V. W. Texeira², M. Adrião², A. Wischral¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco;

²Departamento de Morfologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

³ Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco

*e-mail: sandrinhamargi@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do fator IGF-1 associado ao EGF sobre a sobrevivência, ativação, crescimento e apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*. Ovários de ovelhas sem raça definida foram coletados em matadouro, e o córtex ovariano foi fragmentado. O grupo controle foi constituído por fragmentos frescos imediatamente preservados para posterior análise e o restante dos fragmentos foram cultivados. O cultivo durou oito dias, a 39 °C e com 5% CO₂, em placas de 24 poços, cada poço contendo 1 mL α -MEM+ suplementado ou não com IGF-1 (50 ng/mL) e EGF (50 ng/mL), ou a associação de IGF-1, EGF e pFSH (50ng/mL). Os fragmentos foram fixados (antes ou após o cultivo) e analisados por histologia clássica e imuno-histoquímica. Os folículos foram classificados em primordiais, e em desenvolvimento (primários e secundários), bem como em normais ou atresicos. Além disso, os diâmetros foliculares foram avaliados e o percentual de apoptose foi avaliado pela técnica TUNEL. Os resultados mostraram que o tratamento α -MEM+ acrescido de IGF-1 e EGF, e o tratamento α -MEM+ acrescido de IGF-1 e EGF e FSH resultaram em menor percentual de apoptose folicular, maior desenvolvimento folicular, maior índice de folículos normais e maior diâmetro de folículos em desenvolvimento que o tratamento α -MEM+. Assim, conclui-se que a concentração de 50ng/mL de IGF-1 associada a 50 ng/mL de EGF, ou IGF-1 50 ng/ml, EGF 50 ng/ml e pFSH 50 ng/mL

umentam o diâmetro de folículos em desenvolvimento, a desenvolvimento folicular e reduzem a apoptose em folículos pré-antrais.

Palavras-chave: ativação folicular, fator de crescimento, foliculogênese.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of EGF-associated factor IGF-1 on the survival, activation, growth and apoptosis of ovine preantral follicles grown in situ. Ovaries of undefined sheep were collected in a slaughterhouse, and the ovarian cortex was fragmented. The control group consisted of fresh fragments immediately preserved for later analysis and the remaining fragments were cultured. The cultures were incubated at 37 ° C and 5% CO₂ in 24-well plates, each well containing 1 mL α -MEM + supplemented or not with IGF-1 (50 ng / mL) and EGF (50 ng / mL) , Or the association of IGF-1, EGF and pFSH (50ng / mL). The fragments were fixed (before or after culturing) and analyzed by classical histology and immunohistochemistry. Follicles were classified as primordial, developing (primary and secondary) as well as normal or atresic. In addition, the follicular diameters were evaluated and the percentage of apoptosis was evaluated by the TUNEL technique. The results showed that α -MEM + treatment plus IGF-1 and EGF, and α -MEM + treatment plus IGF-1 and EGF and FSH resulted in a lower percentage of follicular apoptosis, greater follicular development, higher normal follicular index and Greater diameter of developing follicles than α -MEM + treatment. Thus, the concentration of 50 ng / ml of IGF-1 associated with 50 ng / ml of EGF, or 50 ng / ml IGF-1, 50 ng / ml EGF and 50 ng / ml pFSH increase the diameter of follicles Developing follicular development and reduce apoptosis in preantral follicles.

Key words: follicular activation, growth factor, folliculogenesis

INTRODUÇÃO

O ovário é um reservatório de oócitos inclusos em folículos primordiais, primários e secundários (pré-antrais). Porém, a maioria dos folículos pré-antrais sofrem atresia, não completando o processo completo da foliculogênese e apenas uma pequena fração se desenvolve e chega a ovulação (Arunakumari et al., 2010).

Os hormônios e fatores de crescimento mais importantes envolvidos no processo da foliculogênese são aqueles produzidos pela hipófise (hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e hormônio de crescimento (GH)), do fator de crescimento epidermal (EGF) e sistema dos fatores de crescimento semelhante a insulina (IGF), incluindo os IGFs e suas proteínas de ligação (IGFBPs) (Magalhães-Padilha et al., 2012).

O crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais representa um importante papel para a tecnologia reprodutiva como estratégia capaz de aumentar o número de oócitos fertilizáveis (Capacchietti et al., 2003). A aplicação principal desta biotecnologia na ciência veterinária é conhecer melhor o processo da foliculogênese, para melhor aproveitamento de técnicas reprodutivas e conservação da herança genética de animais importantes, enquanto que para medicina humana é uma forma de preservar a fertilidade de pacientes jovens como mulheres em risco de perda prematura do ovário (Capacchietti et al., 2003).

Estudos *in vitro* com folículos pré-antrais de diferentes espécies têm demonstrado que o EGF promove o crescimento (bubalinos: Gupta et al., 2002; ovinos: Hemamalini et al., 2003), a proliferação das células da granulosa (suíno: Morbeck et al., 1993; Demeestere et al., 2005), reduz a taxa de atresia folicular (bovinos: Gutierrez et al., 2000; suínos: Mao et al., 2004; caprinos: Zhou e Zhang, 2005) e mantém a viabilidade folicular (ovinos: Andrade et al., 2005).

Já o IGF-1 possui sua origem nas células da granulosa nos ovários, e tem como principal função estimular o desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral (Armstrong e Benoit, 1996; Mani et al., 2010; Magalhães-Padilha et al., 2012). O envolvimento do IGF-1 nos estádios iniciais da foliculogênese foi evidenciado por

estudos em que a retirada do gene comprometeu severamente o desenvolvimento pré-antral e o antral inicial em camundongos (Elvin e Matzuk, 1998).

Além disso, o IGF-1 possui ação no processo de atresia folicular (Zhao et al., 2001; Hastie et al., 2006). Dependendo da espécie e do estágio do crescimento folicular, o IGF-1 atua sobre a esteroidogênese da célula granulosa sozinho ou em conjunto com o FSH (Mani et al., 2010).

Estudos prévios tem demonstrado o envolvimento do IGF-1, do EGF, e do hormônio folículo estimulante (FSH), sobre a ativação folicular (Betteridge et al., 1989; Magalhães et al., 2009). May et al. (1988) relataram que a presença simultânea de EGF e IGF-I melhorou a proliferação das células da granulosa em suínos.

Além disso, já foi relatado que o IGF-I também ativa receptores de EGF (Arunakumari et al., 2010). Um estudo em cabras demonstrou que o IGF-1 juntamente com o EGF e FSH estimulou o crescimento de oócitos de folículos pré-antrais, em cultivo de folículos pré-antrais isolados por 9 dias (Zhou; Zhang, 2005).

Em ovinos, o meio de maturação suplementado com EGF, IGF-I e cisteína resultou em maior proporção de clivagem e maiores rendimentos de mórula e blastocistos (Shabankareh e Zandi, 2010).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de EGF e IGF-I sobre a sobrevivência, ativação, crescimento e apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

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.

Coleta dos ovários e cultivo *in vitro*

Ovários de ovelhas adultas (n = 24), independente do estágio do ciclo estral, obtidos em abatedouro comercial, foram lavados em álcool 70%, seguido por duas lavagens em Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido com 20 mM de HEPES, 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.

No laboratório, os ovários foram separados de todo o tecido de gordura e ligamentos, e cortados ao meio, após o qual a medula, grandes folículos antrais e corpos lúteos foram removidos. Em seguida, o córtex ovariano foi dividido em 4 fragmentos por ovário. Um fragmento foi imediatamente fixado em formalina tamponada a 10% para estudos histológicos clássicos (controle fresco).

Os demais fragmentos foram transferidos para placas de cultura de 24 poços e cultivados individualmente em 1 mL de meio de cultura base α MEM⁺ suplementado com as concentrações de IGF 1 e EGF que promoveram a maior taxa de ativação e viabilidade em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, associado ou não de 50 ng/mL de FSH (Folltropin[®], Tecnopec, Brasil).

Os seguintes grupos foram formados: CT (controle fresco); α -MEM⁺; IGF-1/EGF (α -MEM⁺ adicionado de 50 ng/ml de IGF-1 e 50 ng/ml de EGF), e IGF-1/EGF/FSH (α -MEM⁺ adicionado de 50 ng/ml de IGF-1, 50 ng/ml de EGF e 50 ng/ml de pFSH).

O meio base consistiu de α MEM suplementado com ITS (insulina 10 µg/mL, transferrina 5,5 µg/mL, e selênio 5,0 ng/mL), 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 250 ng/mL de anfotericina B (UNIANF[®], Brasil) e 1 ng/mL gentamicina, sendo denominado de α -MEM⁺.

Os tecidos foram cultivados durante 8 dias a 39 °C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi totalmente substituído com meio fresco a cada 2 dias. Este experimento foi repetido 3 vezes utilizando ovários de animais diferentes. Parâmetros como morfologia, ativação, diâmetro e apoptose foram avaliados.

Análise Histológica

Para avaliar a morfologia folicular após 8 dias de cultivo, cada fragmento de cultura foi fixado em formalina tamponada a 10% para estudos histológicos. Após a fixação, os fragmentos de tecido foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificadas com xileno, e inclusos em parafina. Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados com micrótomo em espessura de 5 µm. 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 da ativação dos folículos pré-antrais, os folículos foram definidos como folículo primordial e folículos em desenvolvimento. 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 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, e folículos degenerados foram definidos quando apresentaram oócito com núcleo picnótico, retração citoplasmática e/ou células da granulosa desorganizadas (Silva et al., 2004). Foi feita a contagem de 90 folículos por grupo, sendo feita a análise de 30 folículos por lâmina dos grupos cultivados e controle fresco em 3 repetições.

Os diâmetros de folículos morfologicamente normais foram registrados a partir das extremidades externas da camada de células da granulosa. Foi utilizada a média de dois diâmetros perpendiculares (horizontal e vertical) (Jimenez et al., 2016), obtidos através do programa Image J (Fiji 1.46) (Ferreira; Rasband, 2012). Foram analisados 90 folículos por tratamento.

Análise da fragmentação do DNA *in situ*

A fragmentação do DNA em cortes de tecido ovariano cultivado, oriundo de cada grupo experimental, foram submetidas ao teste TUNEL (Terminal Deoxinucleitidil Transferase Uracil Nick End Labeling), utilizando o kit Apoptag Plus (Merck®), seguindo as recomendações do fabricante. Secções seriadas de 5 µm foram montadas sobre lâminas silanizadas secadas *overnight* a 37 °C, desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Posteriormente, foram incubados em PBS (solução salina tamponada) por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos.

As lâminas foram então lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão de equilíbrio por 60 minutos a 4 °C. Depois, os cortes foram incubados em TdT (transferase deoxitidil terminal) a 37 °C por 1 hora em câmara úmida na ausência de luz. Na etapa seguinte, foi aplicada a solução *stop* por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), contracolorados com hematoxilina. As lâminas foram então lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas e fotografadas em microscópio de luz (Leica DM 500 acoplado com câmara Leica ICC50 HD e software LAS EZ 4.3).

O índice apoptótico de proliferação celular foi determinado pela contagem de 30 folículos por lâmina, sendo 3 lâminas por tratamento, considerando positivos para o teste TUNEL os folículos com o oócito marcado e/ou mais de 50% das células da granulosa marcadas em marrom (Bertoldo et al., 2014).

Análise estatística

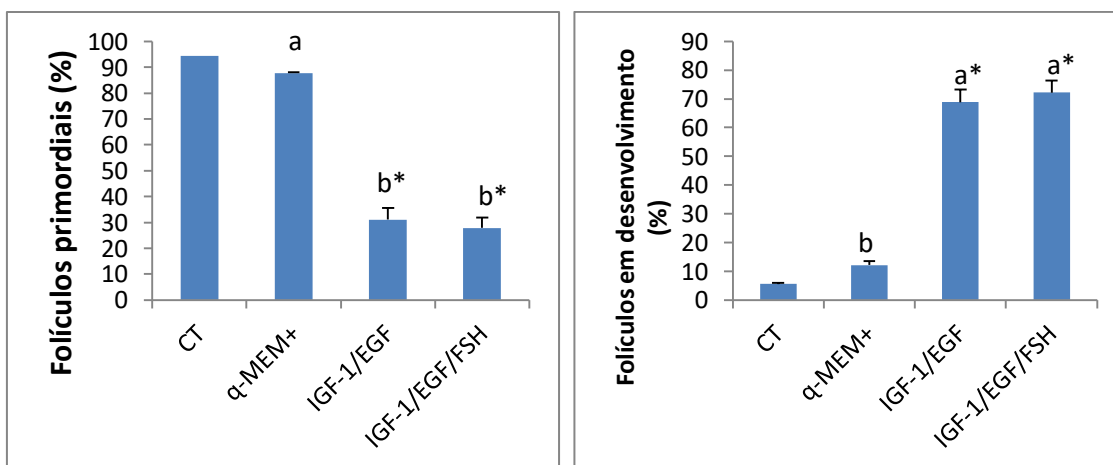
As análises morfológicas de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários), as análises morfométricas (diâmetro folicular), foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguidas de comparações entre as médias, pelo teste de Tukey (versão 5.0; GraphPad.Prism; 2007). As variáveis qualitativas de folículos pré-antrais normais e degenerados e de presença de apoptose folicular pela imuno-histoquímica foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Resultados de ativação folicular (primordial/desenvolvimento), morfologia (normal/degenerado) e apoptose (presente/ausente) foram apresentados em percentuais, o diâmetro folicular são apresentados em média \pm erro padrão da média. Valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

No presente estudo, foi observado que a adição dos fatores IGF-1 e EGF ou IGF-1, EGF e FSH associados, aumentou a ativação folicular apresentando maior percentual de folículos em desenvolvimento quando comparado ao α MEM⁺ e ao grupo controle fresco ($P < 0,05$) (Figura 1).

Figura 1– Percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento cultivados com IGF-1, EGF, e em associação IGF-1/EGF/FSH durante 8 dias.



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT); ^{a,b}, Letras diferentes entre tratamentos representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Não foi observada diferença no diâmetro dos folículos primordiais entre os tratamentos avaliados ($P > 0,05$). Entretanto, nos folículos em desenvolvimento, obteve-se aumento nos diâmetros dos tratamentos IGF-1/EGF e IGF-1/EGF/FSH em relação ao grupo α -MEM⁺ e controle fresco ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão da média do diâmetro de folículos pré-antrais ovinos

Tratamentos	Folículos Primordiais	Folículos em Desenvolvimento
CT	17,3 \pm 1,1	30,0 \pm 3,0
α -MEM ⁺	16,7 \pm 2,1 ^a	27,0 \pm 3,6 ^b
IGF-1/EGF	18,0 \pm 1,0 ^a	48,3 \pm 8,0 ^{a*}

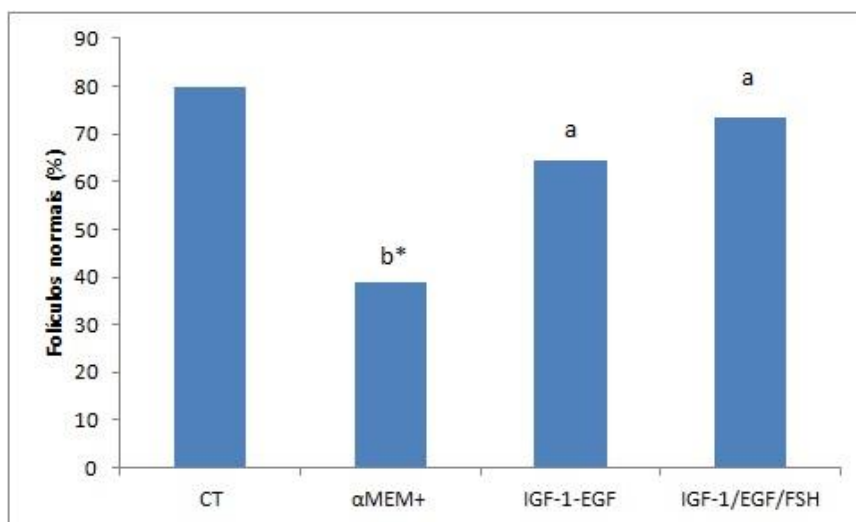
IGF-1/EGF/FSH $18,7 \pm 0,6^a$

$50,3 \pm 2,1^{a*}$

* Indica diferença do grupo controle fresco (CT), ^{a,b,c}. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre colunas ($P < 0,05$);

Quando avaliada a morfologia, foi observada diminuição dos folículos normais no tratamento α -MEM⁺ em relação a todos os tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 2).

Figura 2 – Percentual de folículos pré-antrais ovinos normais cultivados com IGF-1/EGF, IGF-1/EGF/FSH, ou α -MEM⁺.



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT); ^{a,b}. Letras diferentes entre tratamentos representam diferença significativa ($P < 0,05$).

No que se refere à apoptose, os tratamentos com IGF-1 e EGF ou IGF-1/EGF/FSH, obtiveram maior número de folículos negativos ao teste TUNEL em relação ao α MEM⁺, porém menor em relação ao grupo controle fresco ($P < 0,05$) (Figuras 3 e 4).

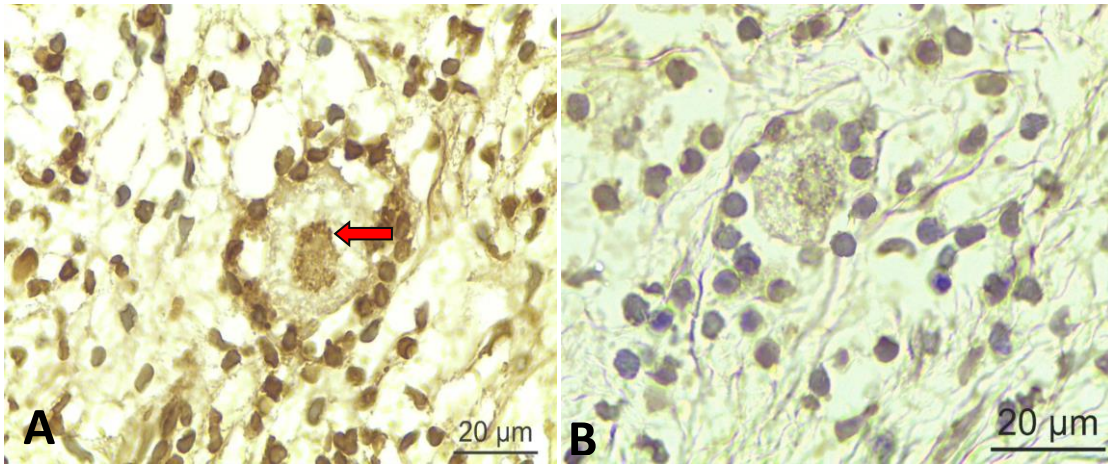
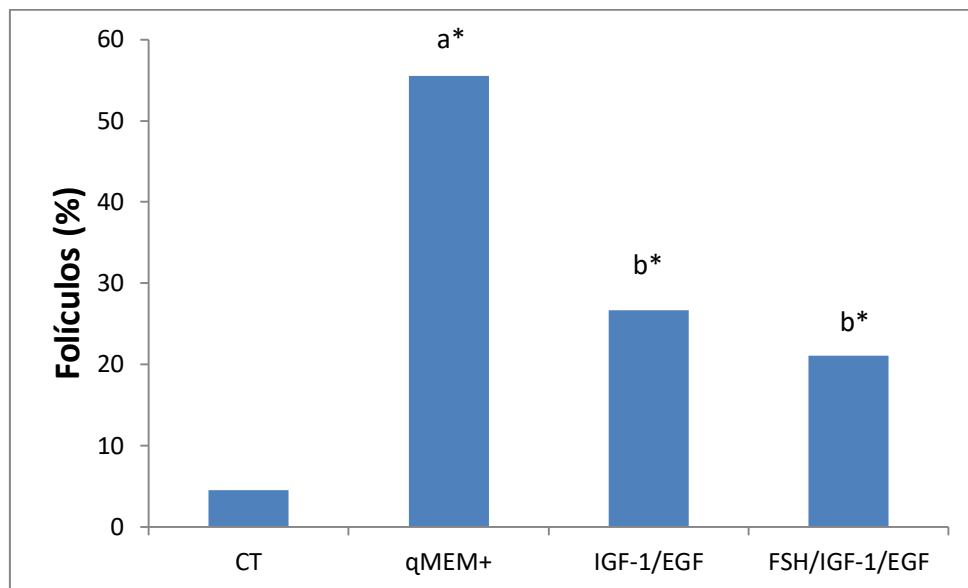


Figura 3. Imagens representativas da coloração pela técnica de TUNEL, em fragmentos ovarianos cultivados durante 8 dias; As células TdT-positivas são representadas pela coloração marrom indicada pela seta vermelha. (A) α -MEM⁺. (B) α -MEM⁺ associado a IGF-1/EGF/FSH.

Figura 4 - Percentual de folículos pré-antrais positivos pela técnica de TUNEL, após cultivo *in situ* durante 8 dias.



* Indica diferença do grupo controle fresco (CT); ^{a,b} Letras diferentes entre tratamentos representam diferença significativa ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Diferentes concentrações vem sendo aplicadas na associação de cultivo *in vitro* contendo IGF-1 e EGF. A escolha das concentrações de EGF (50 ng/mL) e IGF-I

(50 ng/mL), neste trabalho, foi devido estas doses terem sido consideradas mais eficazes em estudos anteriores obtidos no laboratório (dados não publicados).

O estudo foi conduzido para analisar o efeito dos fatores EGF e IGF-I na fase inicial do desenvolvimento folicular na espécie ovina, entretanto faz-se necessário estudos com cultivos *in situ* mais tardios que avaliem a formação de antro e maturação nuclear. Tendo visto que, estudos em bovinos (LORENZO et al.,1994), suínos (REED et al., 1993) e bubalíno (PUROHIT et al.,2005) demonstraram que a associação de IGF-I e EGF em diferentes concentrações estimularam a maturação nuclear e o desenvolvimento do oócito .

Na avaliação do desenvolvimento folicular nos tratamentos utilizados, foi observado que tanto o tratamento contendo IGF-1 e EGF, como IGF-1, EGF e FSH obtiveram um maior percentual de folículos em desenvolvimento do que o α MEM+, não divergindo entre si. A diminuição de folículos primordiais e o aumento de folículos em desenvolvimento após cultivo de 8 dias suplementados com a associação de IGF-I com EGF determinou a retomada do desenvolvimento folicular, caracterizada pela presença de oócitos envoltos com uma ou mais camadas de células da granulosa do tipo cúbica, o que também está associado ao aumento do diâmetro folicular, resultante da diferenciação e proliferação das células da granulosa.

Quando observado o diâmetro dos folículos pré-antrais, os tratamentos contendo IGF-1 e EGF com ou sem FSH obtiveram maior diâmetro dos folículos em desenvolvimento quando comparados ao grupo controle fresco e α MEM+. Estes resultados também foram observados em estudos avaliando o cultivo de folículos pré-antrais caprinos, usando EGF (100 ng/mL) e FSH (100 ng/mL), que demonstraram a estimulação do aumento do diâmetro folicular, promovendo o crescimento de oócitos (Silva et al., 2004).

Isso pode ter ocorrido pelo fato da adição de IGF-1 e EGF, ao meio de cultura, proporcionar superior desenvolvimento folicular, formação de antro e proliferação de células da granulosa de folículos pré-antrais de diferentes espécies (bovina: Gutierrez et al., 2000, suína: Mao et al., 2004; caprina: Zhou e Zhang, 2005; equina: Silva et al., 2014 e felina: Alves et al., 2016).

Em relação ao percentual de folículos normais, foi observado que os tratamentos contendo IGF-1 e EGF, adicionado ou não de FSH, mostraram normalidade semelhante ao controle fresco, tendo o grupo α MEM+ um menor percentual em relação aos demais tratamentos. Esses achados corroboram com Andrade et al. (2005) que demonstraram

que o EGF (100 ng/mL) e FSH (100 ng/mL) adicionados ao meio de cultura foram eficazes para sustentar a normalidade de folículos primordiais de caprinos. Peng et al. (2010) também observaram que a adição sequencial de FSH (200 mUI/mL), EGF (75 ng/mL), GDF-9 (100 ng/mL) e bFGF (100 ng/mL) melhorou as taxa de sobrevivência e de folículos normais, em ovinos.

Zhou e Zhang (2005) observaram que IGF-1, FSH e EGF podem efetivamente manter a sobrevivência dos oócitos e a normalidade dos folículos pré-antrais de cabras. Bem como Alves et al. (2016) ao observarem folículos pré-antrais isolados de gatas, cultivados durante 6 dias em MEM suplementado com IGF-1 e EGF (100 ng/mL de cada), obtiveram maior número de folículos normais.

O desenvolvimento folicular na fase inicial está em sinergismo com a manutenção da viabilidade de folículos normais promovida pela ação dos fatores EGF e IGF-I no *cultivo in situ*, esta manutenção é observada pelo efeito dos fatores na integridade da morfologia celular, diminuição da retração da membrana citoplasmática e núcleos picnóticos, quando comparadas ao cultivo sem a suplementação.

A avaliação da apoptose dos folículos pré-antrais pela técnica TUNEL mostrou que os tratamentos IGF-1 e EGF, ou IGF-1, EGF e FSH obtiveram um menor percentual de marcação de folículos positivos que o α MEM+. A manutenção da viabilidade nos tratamentos contendo IGF-1 e EGF pode estar relacionada com a ação da combinação dos fatores na inibição da via que desencadeia a apoptose, este efeito pode ser observado quando os folículos foram submetidos a técnica do TUNEL identificando folículos em desenvolvimento com menores taxas de fragmentação nuclear quando cultivados com a associação dos fatores.

A mensuração dos níveis do processo apoptótico pela técnica TUNEL ainda é um dos parâmetros mais utilizados na identificação da viabilidade folicular (Bertoldo et al., 2014). Essa técnica já vem sendo utilizada para avaliação de apoptose em folículos secundários cultivados com IGF-1(50ng/mL), FSH (2mU/mL) e EGF(10ng/mL) em suínos após 8 dias de cultivo (Mao et al. 2004). Bertoldo et al. (2014) também utilizaram esta técnica para avaliar a apoptose de fragmentos de córtex ovariano, cultivados por 9 dias com meio suplementado com BMP I e II e FSH, em ovinos.

Sharma et al. (2010) demonstraram que o cultivo de folículos pré-antrais isolados de búfalos em meio contendo FSH (0,5 μ g/mL), TGF- α e TGF- β 1 (10 ng/mL), resultou em menor índice apoptótico, pela técnica TUNEL, quando IGF-I (100 ng/mL) foi adicionado ao cultivo. Peng et al. (2010), utilizando meio sequencial contendo FSH

(200 mUI/mL), EGF (75 ng/mL), GDF-9 (100 ng/mL) e bFGF (100 ng/mL) em folículos pré-antrais inclusos em córtex ovariano de ovinos, observaram que o meio sequencial após 6, 12 e 18 dias de cultivo reduziu a apoptose. Demonstrando que os fatores IGF-1 e EGF atuam na redução da apoptose.

Além disso, Luciano et al. (2000) mostraram que, após maturação *in vitro*, tanto as células do cúmulus, quanto as da granulosa mural de bovinos, exibem respostas qualitativamente e quantitativamente diferentes ao IGF-I (50 ng/mL), obtendo melhores resultados quando foram cultivadas na presença de EGF (5 ng/mL), tanto para a síntese de DNA como para a redução da apoptose. Demonstrando que em sinergia esses fatores reduzem ainda mais a ação apoptótica do que isolados.

Segundo os dados obtidos, a retomada do desenvolvimento, o crescimento e a diminuição da apoptose folicular na fase inicial no cultivo *in situ* foi devido ao efeito da associação do IGF-I com EGF e não pela ação do FSH, uma vez que sua ausência não afetou as características analisadas. Entretanto é necessário analisar o efeito da sua ausência no desenvolvimento a longo prazo nas células que compõe a unidade do folículo. Já que estudos demonstram que o FSH associado ao EGF e IGF-I aumentou a taxa de clivagem e maiores rendimentos de mórula e blastocisto na espécie ovina (SHABANKAREH & ZANDI, 2010), aumentou a sobrevivência dos oócitos e a normalidade dos folículos pré-antrais de cabras (ZHOU E ZHANG, 2005) e afetou significativamente o aumento do diâmetro de folículos secundários em suínos (MAO et al., 2004).

CONCLUSÕES

Conclui-se que IGF-1 e EGF quando associados, acrescido ou não FSH atuam na ativação e diferenciação folicular, promovem o crescimento de folículos em desenvolvimento e reduzem a apoptose das células foliculares.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

Alves, A.E.; Padilha-Nakaghi, L.C.; Pires-Butler, E.A.; Apparicio, M.; Silva, N.A.M.; Motheo, T.F.; Vicente, W.R.R.; Luvoni, G.C. Viability and growth of feline preantral follicles in vitro cultured with insulin growth factor and epidermal growth factor supplemented medium. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 1–5, 2016.

Andrade, E.R.; Seneda, M. M.; Alfieri, A. A.; Oliveira, J. A.; Bracarense, A.P.F.R.L.; Figueiredo, J. R.; Toniolli, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 64, p.1104–1113, 2005.

Armstrong, J.D.; Benoit, A.M. Paracrine, autocrine, and endocrine factors that mediate the influence of nutrition on reproduction in cattle and swine: an in vivo, IGF-I perspective. **Journal Animal Science**, v.74, p.18-35, 1996.

Arunakumari, G.; Shanmugasundaram, N.; Rao, V.R. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884 – 894, 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.

Betteridge, K.J.; Smith, C.; Stubbings, R.B.; Xu, K.P.; King, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p. 87-98, 1989.

Demeestere, I.; Centner, J.; Gervy, Y.; Englert, Y.; Delbaere, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v.130, p. 147-156, 2005.

Elvin, J.A.; Matzuk, M.M. Mouse models of ovarian failure. **Review Reproduction**, v.3, p.183-195, 1998.

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

Guler, A.; Poulin, N.; Mermillod, P.; Terqui, M.; Cognié, Y. Effect of growth factors, EGF and EGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep. **Theriogenology**, v. 54, p. 209-218, 2000.

Gupta, P.S.; Nandi, S.; Ravindranatha, B.M.; Sarma, P.V. In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology**, v. 57, p.1839-1854, 2002.

Gutierrez, C. G.; Ralph, J. H.; Telfer, E. E.; Wilmut, I.; Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1322–1328, 2000.

Hastie P.M.; Haresign W. A role for LH in the regulation of expression of mRNAs encoding components of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**. v.96,p. 196-209,2006.

Hemamalini, N.C.; Rao, B.S.; Tamilmani, G.; Amarnath, D.; Vagdevi, R.; Naidu, K.S.; Reddy, K.K.; Rao V.H. Influence of transforming growth factor- α , insulin like growth factorII, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 50, p.11-22, 2003.

Illera, M. J.; Pedro, L.; Lorenzo, P.; Juan, C.; Illera, A.; Robert M.; Petter, J. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 42, p.1169-1172, 1998.

Jewgenow, K. Impact of peptide growth factors and the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v.45, p. 889–895, 1996.

Lorenzo, P.; Hiera, M.J.; Illera, J.C.; Mera, M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 697-701, 1994.

Luciano, A.M.; Modina, S.; Gandolfi, F.; Lauria, A.; Armstrong, D.T. Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. **Biology Reproduction**, v. 63, n. 6, p.1580-1585, 2000.

Magalhães, D.M.; Araújo, V.R; Lima-Verde, I.B.; Matos, M.H.; Silva, R.C.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R.; Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v.33, p. 91–97, 2009.

Magalhães-Padilha, D.M.; Fonseca, G.R.; Haag, K.T.; Wischral, A.; Gastal, M.O.; Jones, K.L.; Geisler-Lee, J.; Figueiredo, J.R.; Gastal, E.L. Long-term in vitro culture of ovarian cortical tissue in goats: effects of FSH and IGF-I on preantral follicular development and FSH and IGF-I receptor mRNA expression. **Cell Tissue Research**, v. 350, p. 503–511, 2012.

Mani, A. M.; Fenwick, M. A.; Cheng, Z.; Sharma, M. K.; Singh, D.; Wathes, D. C. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositoldependent kinase/AKT in bovine granulosa cells . **Reproduction**, v. 139, p. 139–151, 2010.

May, J.V.; Frost, .JP.; Schomberg, D.W. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. **Endocrinology**, v.123, p. 168–179, 1989.

Morbeck, D.E.; Flowers, W.L.; Britt, J.H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8- bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 577–584, 1993.

- Peng, X.; Mei, Y.; Liqin, W.; Chen, T.; Zhiqin, G. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium . **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, p.247–257, 2010.
- Purohit, G.N.; Brady, M.S.; Sharma, S.S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.87:229–239, 2005.
- Rajarajan, K.; Rao, B.S.; Vagdevi, R.; Tamilmani, G.; Arunakumari, G.; Sreenu, M.; Amarnath, D.; Naik, B.R.; Rao, V.H. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 204–212, 2006.
- Reed, M.; Estrada, J. L.; Illera, M. J.; Petters, R. Effects of Epidermal Growth Factor, Insulin-Like Growth Factor-I, and Dialyzed Porcine Follicular Fluid on Porcine Oocyte Maturation In Vitro .**The Journal of Experimental Zoology**, v. 26, p.674-678, 1993.
- Shabankareh, H.K.; Zandi, M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 1, p. 335-340, 2010.
- Sharma, G.T.; Pawan, K.D.; Meur, S.K. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three dimensional collagen gel culture system. **Animal Reproduction Science**. v. 114, p. 115–124, 2009.
- Sharma, S. S.; Taru, G.; Dubey, P.K.; Amar N.;Saikumar, G. Co-culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles with antral follicles: a comparative study of developmental competence of oocytes derived from in vivo developed and in vitro cultured antral follicles. **Zygote**, v. 21, p. 286–294, 2012.
- Silva, C. B.; Max, M. C.; Gomes, R. G.; Lisboa, L. A.; Marino, P. C.; Oliveira, R. L.; Seneda, M. M. **Effect of different concentrations of EGF on in vitro culture of equine ovarian preantral follicles: preliminary results**. Proc. 28th Annual Meeting

Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 14-17th, 2014, Natal, RN, Brazil.

Silva, J. R.; Van den Hurk, R.; de Matos, M. H.; Santos, R. R.; Pessoa, C.; Moraes, M. O., Figueiredo, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691–1704, 2004.

Silva, J. R.; Van den Hurk, R.; Figueiredo, J. R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: Advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123–135, 2016.

Sirisathien, S.; Brackett, B. G. TUNEL Analyses of Bovine Blastocysts After Culture With EGF and IGF-I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, p.51–56, 2003.

Sirisathien, S.; Hernandez-Fonseca, H. J.; Brackett, B G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 21-32, 2003.

Yu, Y.; Yan, J.; Li, M.; Yan, L.; Zhao, Y.; Lian, Y.; Li, R.; Liu1, P.; Qiao, P. Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development . **Human Reproduction**, v. 27, n. 7, p. 2146–2159, 2012.

Zhou, H.; Zhang, Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 265–272, 2005.

Zhou, J.; Refuerzo, J.; Bondy, C. Granulosa cell DNA synthesis is strictly correlated with the presence of insulin-like growth factor I and absence of cfos/c-jun expression. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 924-931, 1995.

Zhao, J., Taverne, M.A., Van de Weijden, G.C.; Bevers MM, van den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Molecular and Reproduction Development**, v.58, p. 287–96, 2001.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo poderão servir de base para o aperfeiçoamento e elaboração de meios de cultivos capazes de propiciar ótimas condições de desenvolvimento folicular *in vitro*. Os resultados mostraram que a adição de IGF-1 pode ser utilizada com sucesso em cultivo de folículos pré-antrais inclusos em folículos ovarianos durante 8 dias, melhorando a ativação folicular e reduzindo a apoptose. Além disso, foi demonstrado que o IGF-1 e o EGF acrescidos ou não do FSH podem propiciar melhores condições para o desenvolvimento, aumento do diâmetro folicular e redução da apoptose de folículos pré-antrais ovinos após cultivo *in situ* por 8 dias. No entanto, estudos complementares utilizando hormônios e fatores de crescimento isolados ou em associação serão necessários, visto que a produção *in vitro* de embriões a partir de folículos pré-antrais, um dos principais objetivos da biotécnica de MOIFOPA, ainda apresenta índices insatisfatórios na espécie ovina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D, et al. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Biochem Pharmacol**, v. 66, p.1355-1362, 2003.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M. T.; MORATO, R. et al. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. **Animal Reproduction Science**. v. 116, p. 95–106, 2009.

APOLLONI, L.B.; BRUNO, J.B.; ALVES, B.G ; J.R. FIGUEIREDO, J.R. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.44,p. 1369,2016.

ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M.V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction Fertility and Development**, v. 21, p. 679-687, 2009.

ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B.S.; NAIK, B.R.; NAIDU, K.S.; SURE,S.H.; KUMAR,R.V., RAO, V.H. Effect of hormones and growth factors on in

vitro development of sheep preantral follicles. **Small Ruminant Research**. v. 70, p. 93–100, 2007.

BAR-JOSEPH, H.; BEN-AHARON, I.; RIZEL, S.; STEMMER, S.M.; TZABARI, M.; SHALGI, R. Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle oocytes. **Reproductive Toxicology**. v. 30, p. 566-572, 2010.

BENNETT, N.C.; GARDINER, R.A.; HOOPER, J.D.; JOHNSON, D.W.; GOBEA, G.C. 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 42, n.6, p. 813-827.

BOATRIGHT, K.M.; SALVENSEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**. v.15, p.725-731, 2003.

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

BRUNO, J. B.; CELESTINO J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 321-327, 1990.

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

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

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 Science**, v. 16, p. 239-246, 2009.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B., et al. 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 & Development**, v. 77, p. 231-240, 2010.

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

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

CHEN, Q.; YANO, T.; MATSUMI, H. et al. Cross-talk between fas/fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. **Endocrinology**, v. 146, p. 808-815, 2005.

CHUNG, C.K.; GE, W. Epidermal growth factor differentially regulates activin subunits in the zebrafish ovarian follicle cells via diverse signaling pathways. **Mol Cell Endocrinol**, v.361, p.133-142, 2012.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe? **Journal of Reproduction and Fertility**., v.93, p.63-70, 1991.

DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; et al. Bovine dominant follicular fluid promotes the in vitro development of goat preantral follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 490-500, 2012.

EPPIG, J.J.; VIVEIROS, M.M.; BIVENS, C.M.; DE LA FUENTE, R. Regulation of Mammalian oocyte maturation. In: LEUNG, P.C., ADASHI, E.Y. (Eds.), **The ovary**, 2004.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais.. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.303-327.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. **Theriogenology**. v. 5, p. 845-858, 1995.

FISHER, U.; JANICKE, R.U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death Differ**. v. 10, p.76-100, 2003.

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

FROTA, I.M.A.; LEITÃO, C.C.F.; COSTA, J.J.N.; ROBERT VAN DEN HURK; SARAIVA, M.V.A.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.V. Levels of BMP-6 mRNA in goat ovarian follicles and in vitro effects of BMP-6 on secondary follicle development. **Zygote**, v. 6, p. 1-9, 2011.

FUJINO, K.; YAMASHITA, Y.; HAYASHI, A, et al. Survivin gene expression in granulosa cells from infertile patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. **FertilSteril**,v.89, p. 60-65, 2008.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. **Animal Reproduction Science**. v.105, p.417–423, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, 2008, cap. 14, p.261-291

GUDERMANN, T.; NÜRNBERG, B.; SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I. G-protein-coupled receptors: Structure and function. **Journal of Molecular Medicine**. v. 73, p. 51-63, 1995.

GUERREIRO, D.D.; CARVALHO, A.A.; LIMA, L.F.; RODRIGUES G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. **Reprodução e climatério**, v. 30, n. 2, p 90-99. 2015.

GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIE, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**. v. 54, p.209-218, 200.

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

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed., São Paulo, Manole, 513p. 2004.

HASTIE P.M.; HARESIGN W. A role for LH in the regulation of expression of mRNAs encoding components of the insulin-like growth factor (IGF) system in the ovine corpus luteum. **Animal Reproduction Science**. v.96,p. 196-209,2006.

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

HOVATTA, O.; SILY, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R.M.L. Extra cellular matrix improves the survival of human primordial and primary fresh and frozen-thawed ovarian follicles in long-term culture. **Human Reproduction**. v.12, p. 1032-1036, 1997.

HULSHOF, S.C.J.; DIJKSTRA, G.; VAN DER BEEK, E.M.; BEVERS, M.M.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; VAN DEN HURK, R. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide y in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 553-560, 1994.

HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E.T. FSH signaling pathways in immature granulose cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 1351-1359, 2006.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biology eTherapy**. v.4,p.139-163, 2005.

JOHNSON, A.L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.185-201, 2003.

JOHNSTONE, R.J.; RUEFFI, A.A.; LOWE, S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**,v. 108, p. 153-164, 2002..

KIM, J.Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental Reproduction Medicine**, v. 39, p. 10-14, 2012.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R.; FROTA, I.M.A.; SILVA J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.2, p. 215-224. 2009.

LUCIANO, A.M.; PAPPALARDO, A.; RAY, C.; PELUSO, J.J. Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium. **Biology of Reproduction**. v.51,p. 646-654, 1994.

LUZ, V.B.; CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.C.V.; PINHEIRO, A.S.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do Fator de Crescimento semelhante à Insulina-I (IGF-I) e Kit Ligand (KL) na função ovariana. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.43, p. 1300, 2015.

LUZ, V.B.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; et al. Eight-Cell Parthenotes Originated From In Vitro Grown Sheep Preantral Follicles. **Reproductive Sciences**, v. 1, p. 1-1, 2012.

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

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

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

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R. et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v. 123, p. 23-30, 2002.

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; LANGENDONCKT, A.V.;
DEFRÈRE, S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular
pedicle with a passive cooling device. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 1390-1394,
2004.

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

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

MÉDURI, 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 e Metabolism**, v.
87, p. 2266-2276, 2002.

METOKI, T.; IWATA, H.; ITOH, M.; KASAI, M.; TAKAJYO, A.; SUZUKI, A.;
KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effects of follicular fluids on the growth of porcine
preantral follicle and oocyte. **Zygote**, v. 16, p. 239-247, 2008.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSSEN, J.M.;
MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian
folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal
Endocrinology**. v.23,p.139-154,2002.

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

OTSUKY, Y.; LI, Z. ; SHIBATA, M.A. Apoptotic detection methods-from morphology to gene. **Prog Histochem Cytochem.** v.38,p. 275-339, 2003.

PARROTT, J.A.; VIGNE, J.L.; CHU, B.Z.; SKINNER M.K. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. **Endocrinology.** v.135,p. 569-575,1994.

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

PRU, J.K.; KANEKO-TARUI, T.; JURISICOVA, A. et al. Induction of proapoptotic gene expression and recruitment of p53 herald ovarian follicle loss caused by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Reproduction Science,** v. 16, p. 347-356, 2009.

QU, J.P.; GODIN, P.A.; NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Distribution of epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. **Human Reproduction.** v.15,p. 302-310,2000.

RAFF, H.; LEVITZKY, M.G. **Fisiologia Médica (Lange)- Uma abordagem Integrada.** Editora McGraw-Hill. 2012. 800p.

RIESE D.J. ; STERN D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. **Bioassays.** v.20,p. 41-48,1998.

RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; BRUNO, J. B.; PINTO, L. C.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO,C. C.; FIGUEIREDO, J. R.. Efeito de diferentes concentrações de hormôniofolículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antraiscaprinos e ovinos isolados.**Acta Veterinaria Brasilica,** v.4, n.3, p.144-152, 2010.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F.S.; FAUSTINO, L.R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; NAME, K.P.O.;

BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, 2009.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biology Chemical**. v.385,p.449-464, 2004.

SAMBADE, C. (2005). **A Morte Celular por Apoptose. In Biologia Celular e Molecular**. Carlos Azevedo (Coord.). 4ª Edição. Lidel – Edições Técnicas. pp 553-573.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 528-537,2000.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil De Medecine Veterinaire**, v. 157, p.29-38, 1981.

SCHULZE-OSTOFF K (2008). **How cells die: Apoptosis and other cell death pathways**. In Rode H-J (Ed). Apoptosis, Citotoxicity and Cell Proliferation (4ª Edição).

SILVA, J.R.V.; BRITO, I.R.; LEITÃO, C.C.F.; SILVA, A.W.B.; PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; SARAIVA, M.V.A.; ALMEIDA, A.P.; FIGUEIREDO J.R. 2008. **Quantificação da proteína e do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante à insulina- 1 (IGF-1) em folículos ovarianos caprinos**. In: Resumos da XXII Reunião Anual da SBTE (Guarujá, SP, Brasil). p.466

SILVA, J.R.V.; BRITO, I.R.; LEITÃO, C.C.F.; SILVA, A.W.B.; PASSOS, M.J.; FERNANDES, L.A.; VASCONCELOS, G.L.; FIGUEIREDO J.R. 2007. **Expressão da proteína morfogenética óssea-6 (BMP-6) em folículos ovarianos caprinos**. In: Resumos da XXI Reunião Anual da SBTE (Costa do Saúpe, BA, Brasil). p.1044.

SILVA, J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S.H.F.; et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminat Research**,v. 43, p. 203-209, 2002.

SILVA, R.V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO J.R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. **Zygote**. v.14,p. 107-117,2006.

SILVA, C.M.G.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L.R.; PINTO, L.C.; CHAVES, R.N.; ARAUJO, V.R.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. **Animal Reproduction Science**. In press, 2009.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; SILVA, C. M. G.; LOBO, C.H.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; TAVARES, L. M. T.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v.8, p.14-24, 2011.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R., PESSOA, 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.

SILVA, J. R. V.; CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C.M.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO J. R.. Conservação de folículos pré-antrais caprinos *in situ* em solução à base de água de coco. **Ciência Animal**, v. 9, n.1, p.27-36, 1999.

SINGH, B.; RUTLEDGE, J.M.; ARMSTRONG, D.T. 1995. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**. v.40, p.391-399, 1995.

SOUZA, C.J.; CAMPBELL, B.K.; MCNEILL, Y A.S.; BAIRD, D.T. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. **Reproduction**. v. 123,p. 363-369, 2002.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annuary of Review in Biochemistry**, v. 69, p. 217-245, 2000.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.9, p.231-241, 2008.

TILLY, J.L.; BILLIG, H.; KOWALSKI, K.I.; HSUEH A.J. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. **Molecular Endocrinology.** v.6, p. 1942-1950, 1992.

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

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. **Human Reproduction**, v.12, p.1993-2001, 1997.

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

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

YU, Y.; LI, W.; HAN, Z.; LUO, M.; CHANG, Z.; TAN, J. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. **Theriogenology**, v. 60, p. 1691- 1704, 2003.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. **Neuroendocrinology**, v. 63, p. 397–407, 1996.

ZHANG, Y.; HUANG, Q.; CHENG, J.C.; NISHI, Y.; YANASE, T.; HUANG, H.F.; LEUNG, P.C. Homeobox A7 increases cell proliferation by up-regulation of epidermal growth factor receptor expression in human granulosa cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v.8, p.61-70, 2010.

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.