

TALITA FERNANDES DA SILVA

**EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) NO
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e
2014
Silva, Talita Fernandes da, 1988-
Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbST) no
desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais de bovinos /
Talita Fernandes da Silva. – Viçosa, MG, 2014.
xiv, 34f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.26-34.

1. Bovinos - Reprodução. 2. Oogênese. 3. Somatotropina.
4. Cultura *in vitro*. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08926

TALITA FERNANDES DA SILVA

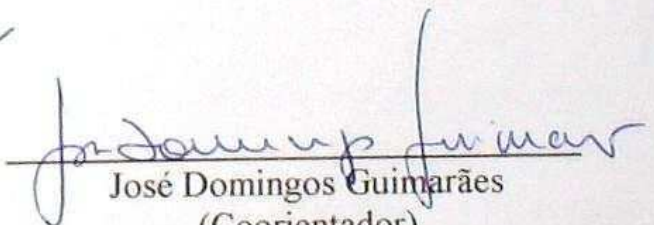
**EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) NO
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE
BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

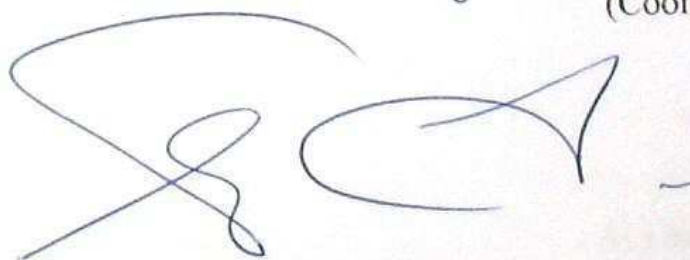
APROVADA: 29 de outubro de 2014.



Cláudio José Borela Espescht



José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

Aos meus pais, Wilson e Beti,
por tanto amor e saudade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À FAPEMIG, pelo financiamento do Projeto de Pesquisa.

À FUNARBE e todos os funcionários, por intermediarem de forma tão eficiente os recursos do projeto.

Ao Frigorífico Sabor de Minas e todos os funcionários pela inteira disponibilidade e fornecimento dos ovários.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. Agradeço especialmente à Carla, ao Gilmar, ao Emílio e ao Wagner, pelo auxílio fundamental com as análises de Microscopia Eletrônica. Muito obrigada pela paciência e atenção sempre que precisei.

Ao BioAgro, ao Professor Joaquin Hernán Patarroyo e ao doutorando Gabriel Tofur pelas colaborações. Agradeço também imensamente aos Professores Marlene Isabel Vargas Viloria e Claudio Fonseca e aos Técnicos Adão e Cláudio pelo grande auxílio com o processamento histológico.

Ao meu orientador, Professor Eduardo Paulino da Costa, por ter acreditado no meu potencial e pela confiança em meu trabalho. Agradeço também pelas conversas e mais diversas experiências compartilhadas durante esses anos de convivência.

Agradeço a meus Coorientadores, Professores José Domingos Guimarães e Ademir de Moraes e aos demais membros da banca, Professores Cláudio José Borela Espescht, Cristina Mattos Veloso e Tarcísio Antônio Rego de Paula, por aceitarem o convite de participação da banca e pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço carinhosamente à Rosi, Beth, Andréia e Aline, pela grande eficiência, bom-humor e inteira disponibilidade em atender a todas as solicitações no decorrer destes anos. Agradeço também a todos os demais funcionários e amigos do DVT, especialmente à Camila, Faider, Gisele, Jhonata, Zé de Oliveira e Divino.

Agradeço profundamente à Sanely e ao Sidney, pelo grande apoio e amizade quando cheguei em Viçosa e durante a execução deste projeto. Obrigada pela disposição e por toda colaboração. Serei eternamente grata!

Aos bolsistas de Iniciação Científica, Iana e Pedro, pela colaboração em todas as etapas deste projeto. Muitíssimo obrigada pelo auxílio, esforço, dedicação, amizade e companheirismo no decorrer desses anos. Não só parceiros de trabalho, mas amigos pra toda vida. Todo agradecimento a vocês seria pouco! Também agradeço imensamente a equipe do Laboratório de Reprodução Animal, Vívian, Ana Clara, Divina, Vanessa, Aline e Emílio Neto.

À minha querida Professora Adriana Reis, por ter feito o contato inicial e depois me incentivado tanto neste percurso. Serei eternamente grata por todas as portas abertas por você, professora! Aos Professores Aluísio e Sousa, ao Alisson, a Lucilene e toda equipe da Central de Biotecnologia da Reprodução Animal (CEBRAN), obrigada pelo apoio e incentivo que sempre me proporcionaram.

Aos amigos de Castanhal, Danuza, Mariane, Paulo César, Rafaelle, Gustavo, Geovanni, Débora e Eziquiel. Obrigada pelos conselhos e pela parceria desde os tempos de faculdade, quando tudo era menos difícil. É gratificante perceber que quando nos encontramos, uma vez ao ano, nada mudou! Amo vocês!

Aos amigos de Belém, Flor, Flávia, Yuri Porto, Ronan, Sérgio, Renan, Cris, Eduardo, Thália, Julian, Flávio, Michel, Herson e Yuri Guimarães. Quando nos conhecemos ainda nem sabíamos o que fazer da vida, e hoje é um imenso orgulho ver o sucesso pessoal e profissional de cada um. Sempre que consegui “escapar” pra Belém vocês me receberam com todo amor que cabe nesse mundo. Obrigada por todos esses anos da mais sincera e recíproca amizade.

Aos amigos inesquecíveis que fiz em Viçosa, Amanda, Karinne, Glenda, Mariana, Andresa, Jussara, Rodolfo, Malu e Beto. Precisei percorrer milhas e milhas de distância para encontrá-los. Obrigada por me acolherem com tanto carinho sempre que precisei. Pelas conversas, pelo incentivo, pela amizade sincera e pelas quintas menos amargas no Bar do Leão.

Agradeço ao Ray, por ter sido um grande e paciente companheiro em todos os inevitáveis momentos agrídoces ao longo desses dois anos. Obrigada por me ouvir, aconselhar, acompanhar todos os meus passos e sempre torcer, à sua maneira, pra que tudo desse certo. “Que sorte a nossa, hein? Entre tantas paixões, esse encontro, nós dois, esse amor”.

Um obrigada muito especial à minha avó Luiza, aos meus tios Rosemi, Ângelo, Rosemae e Darci, a meus primos Aldine, Aline e Paulo que, mesmo tão distantes, se fizeram

presentes em todos os momentos importantes. É um grande orgulho fazer parte dessa família tão linda.

Agradeço imensamente à minhas irmãs, simplesmente por serem as melhores desse mundo. Por estarem presentes todos os dias, pela confiança, pelas mensagens, pelo companheirismo e pelo amor mais puro que pode existir. Obrigada por dividirem comigo o peso das responsabilidades e de todas as adversidades que surgiram no decorrer do caminho. Eu sei que “pela janela vocês sempre estiveram de olho em mim”.

Aos meus pais, Wilson e Beti, por terem me dado muito mais que a vida, mas o melhor exemplo de educação, princípios e honestidade. Obrigada por se orgulharem de mim e me possibilitarem toda base e apoio. Obrigada por serem o melhor que conseguem ser. Já são oito anos longe casa, oito anos sem a convivência diária, oito anos de saudade, e a vida inteira do amor mais incondicional.

Por fim, agradeço Àquele que esteve comigo em todos os momentos de angústia. Agradeço não só por ter me conduzido quando, por vezes, desacreditei de mim mesma, mas principalmente por ter resgatado algo que há muito não havia mais em mim: a fé.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 O ovário e a oogênese.....	2
2.2 Foliculogênese	3
2.3 Atresia folicular	4
2.4 Sistemas de cultivo in vitro de FOPA	5
2.5 Meio de cultivo para o desenvolvimento in vitro de FOPA	7
2.6 Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Localização	11
3.2 Procedência dos ovários	11
3.3 Meio de cultivo base.....	11
3.3 Protocolo experimental.....	11
3.4 Processamento para Histologia Clássica	12
3.5 Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão	12
3.6 Análises estatísticas	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Sobrevivência folicular.....	15
4.2 Ativação folicular	18
4.3 Crescimento ovocitário e folicular	20
4.4 Análise ultraestrutural	23
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fragmentos ovarianos (400x) demonstrando um folículo normal (A) e degenerado (B) após coloração PAS-Hematoxilina (O: ovócito; n: núcleo do ovócito; CG: células na granulosa). Seta: núcleo picnótico..... 15
- Figura 2: Fragmentos ovarianos (400x) demonstrando um folículo primordial (A) e ativado (B) após coloração PAS-Hematoxilina (O: ovócito; n: núcleo do ovócito; CG: células na granulosa). Na figura A é evidente a camada de células da granulosa de formato pavimentoso, enquanto na figura B estas células apresentam formato cúbico. 18
- Figura 3: Ultraestrutura de folículo pré-antral, cultivado por sete dias (3.000x) em meio contendo 1000ng/mL de rbST. Nu: núcleo do ovócito; CG: células da granulosa; Setas: vacúolos. 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem média de folículos pré-antrais morfolologicamente normais em tecido ovariano não cultivado e cultivado por um e sete dias, com diferentes concentrações de rbST	16
Tabela 2 - Porcentagem média de folículos pré-antrais primordiais e ativados em tecido ovariano não cultivado e cultivado por um dia e sete dias, com diferentes concentrações de rbST	19
Tabela 3 - Diâmetro ovocitário médio de folículos ovarianos não cultivados e cultivados por um e sete dias, com diferentes concentrações de rbST	20
Tabela 4 – Diâmetro médio de folículos ovarianos não cultivados e cultivados por um e sete dias, com diferentes concentrações de rbST.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

°C – Graus Celsius

BMP-15 – Proteína Morfogenética Óssea-15

BSA – Albumina Sérica Bovina

bST – Somatotropina bovina

CG – Células da Granulosa

CGP – Células Germinativas Primordiais

CO₂ – Dióxido de Carbono

DMP – Dimetilamino Metil Fenol

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

E₂ – Estradiol

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

FOPA – Folículos Ovarianos Pré-antrais

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GDF-9 – Fator de Crescimento e Diferenciação-9

GH – Hormônio do Crescimento

HC – Histologia Clássica

IA – Inseminação Artificial

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-1

IGFBP – Proteína Transportadora do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina

ITS – Insulina-Transferrina-Selênio

KL – Kit Ligand

LH – Hormônio Luteinizante

L – Litro

MEM – Meio Essencial Mínimo

MEM⁺ - Meio Essencial Mínimo suplementado

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MOIFOPA – Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

mOsm – Miliosmol

nm – Nanômetros

ng – Nanograma

PAS – Ácido Periódico de Schiff

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIVE – Produção *In Vitro* de Embriões

rbST – Somatotropina recombinante bovina

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

SCF – Fator de Células Tronco

TE – Transferência de Embriões

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

μm – Micrômetro

ZP – Zona Pelúcida

± - Mais ou menos

RESUMO

SILVA, Talita Fernandes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de bovinos.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Ademir de Moraes Ferreira.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de Folículos Ovarianos Pré-antrais (FOPA) de bovinos cultivados *in vitro*. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Viçosa. Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico e transportados ao laboratório em aproximadamente uma hora após a coleta. No laboratório, a região parenquimatosa foi fragmentada, sendo um dos fragmentos de cada ovário imediatamente fixado para Histologia Clássica (HC) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), constituindo o controle não cultivado. Em seguida, os demais fragmentos/folículos foram cultivados *in situ* por um e sete dias, em estufa a 38,5°C e 5% de CO₂, em Meio Essencial Mínimo suplementado (controle cultivado), na ausência ou presença de diferentes concentrações de rbST (10, 50, 100 e 1000ng/mL). A troca de meio foi realizada a cada dois dias. Após um e sete dias, os fragmentos ovarianos foram fixados e corados para posterior análise histológica. Nesta análise, os folículos foram classificados como normais ou degenerados, bem como primordiais ou ativados. O diâmetro folicular foi mensurado com auxílio de uma ocular micrométrica. Na avaliação ultraestrutural foi observada a integridade da membrana basal, das organelas citoplasmáticas e o grau de vacuolização citoplasmática. Após um e sete dias de cultivo *in vitro*, o percentual de folículos normais em fragmentos não cultivados foi superior ($P < 0,05$) quando comparado aos folículos cultivados com o meio base e na presença das diferentes concentrações de rbST. Nenhuma das concentrações de rbST manteve as taxas de sobrevivência folicular após sete dias de cultivo. Quanto ao estágio de desenvolvimento, a ativação folicular ocorreu independente da presença da rbST no meio de cultivo. Apenas os folículos cultivados na presença de 1000ng/mL apresentaram o diâmetro dos ovócitos semelhante ($P > 0,05$) ao do controle não cultivado, após um dia de cultivo. Após um e sete dias de cultivo, o diâmetro dos folículos cultivados na presença de 1000ng/mL de rbST foi superior ($P < 0,05$) aos folículos cultivados apenas com o MEM⁺ e com 10ng/mL de rbST. As características ultraestruturais demonstraram que após sete dias de cultivo em meio contendo 1000ng/mL de rbST, houve

danos à membrana nuclear e basal, alteração nas células da granulosa, bem como aumento da vacuolização e baixa densidade de organelas no citoplasma. Conclui-se que as concentrações de 10, 50 e 100ng/mL de rbST não tem efeitos benéficos sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais de bovinos. A concentração de 1000ng/mL de rbST aumenta o diâmetro folicular, entretanto não tem efeitos benéficos sobre a sobrevivência e a ativação de folículos pré-antrais de bovinos cultivados *in vitro* durante um e sete dias.

ABSTRACT

SILVA, Talita Fernandes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october, 2014. **Effect of Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) on in vitro development of preantral follicles of cattle.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Ademir de Moraes Ferreira.

The aim of this study was to evaluate the effect of Recombinant Bovine Somatotropin (rbST) on survival, activation and growth of Preantral Ovarian Follicles of cattle grown in vitro. The experiment was conducted at the Laboratory of Animal Reproduction, Federal University of Viçosa. Ovaries were obtained from cows slaughtered in a slaughterhouse and transported to the laboratory in approximately one hour after collection. In the laboratory, the parenchymal region was fragmented, being one of the fragments of each ovary immediately fixed for Histology Classic and Transmission Electron Microscopy, constituting the control. Then, the remaining fragments / follicles were cultured in situ for one and seven days in an incubator at 38.5°C and 5% CO₂ in Minimal Essential Medium supplemented (cultured control) in the absence or presence of different concentrations of rbST (10, 50, 100 and 1000ng/ml). The medium change was performed every two days. After one and seven days, ovarian fragments were fixed and stained for subsequent histological analysis. In this analysis, the follicles were classified as normal or degenerated, as well as primary or activated. Follicular diameter was measured with the aid of an ocular micrometer. In the ultrastructural evaluation, were analysed the integrity of the basement membrane, the cytoplasmic organelles and the degree of vacuolation. After one and seven days of in vitro culture, the percentage of normal follicles in not cultivated fragments was higher ($P<0.05$) when compared to follicles cultured with basal medium and in the presence of different concentrations of rbST. Neither concentration of rbST kept rates follicle viability after seven days. In relation the development, follicular activation occurred independent of the presence of rbST in the culture medium. Only follicles cultured in the presence of 1000ng/ml showed the diameter of oocytes similar ($P>0.05$) to the not cultivated control, after one day. After one and seven days of cultivation, the diameter of follicles cultured in the presence of 1000ng/ml rbST was higher ($P<0.05$) to the found in only follicles cultured with MEM and 10ng/ml of rbST, respectively. Results showed that after seven days of culture in medium containing 1000 ng/ml rbST, there was damage to nuclear and basement membrane changes in granulosa cells as well as increased vacuolation and low density of organelles in the cytoplasm. It was concluded that concentrations of 10, 50 and 100

ng/ml rbST has no beneficial effect on survival, growth and activation of preantral follicles in cattle. The concentration of 1000ng/mL rbST increases follicular diameter, but has no beneficial effects on the survival and activation of preantral follicles in cultured bovine in vitro for one and seven days.

1. INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento da pecuária brasileira tem levado a uma busca incessante pela produção e reprodução de espécies com interesse econômico. Para tanto, é fundamental o desenvolvimento e a aplicação de biotécnicas da reprodução (CELEGHINI, 2005).

Dentre as biotécnicas que se aplicam a bovinos está a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE), a Produção *in vitro* de Embriões (PIVE), a Criopreservação de Embriões ou Ovócitos e, mais recentemente, a Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os Folículos Ovarianos Pré-antrais (FOPA) compreendem cerca de 90% de toda população folicular presente no ovário de mamíferos (LIU et al., 2001). Entretanto, no processo fisiológico ocorrido *in vivo*, mais de 99% destes sofre atresia (MAO et al., 2002). Considerando esta perda tão expressiva, têm-se a extrema importância da MOIFOPA, a qual possui como objetivo principal a recuperação dos mesmos para que sejam cultivados *in vitro* até atingirem sua maturação.

Como principais perspectivas da implementação desta biotécnica, têm-se a maximização da produção *in vitro* de embriões, resultando na preservação e disseminação do material genético de um animal. Além disto, a possibilidade de maior elucidação da fisiologia ovariana e dos mecanismos e fatores envolvidos na foliculogênese desde a fase inicial (FIGUEIREDO et al., 2008). Apesar de promissora, a técnica ainda apresenta resultados pouco significativos.

Assim, vários pesquisadores têm utilizado diferentes hormônios (FLAWS et al., 1997) e fatores de crescimento (MATOS et al., 2007) no cultivo *in vitro* desses folículos, visando a definição de um sistema adequado que permita sua viabilidade e crescimento.

Dentre os hormônios que têm sido alvo de pesquisas na área de reprodução animal está a Somatotropina Recombinante Bovina (rbST). Este possui influência nos mecanismos relacionados ao crescimento e maturação folicular (PAVLOK et al., 1995; IGA et al., 1998), bem como na regulação de processos fisiológicos dos animais. Assim, acredita-se que o mesmo possa exercer influência na sobrevivência e no crescimento de FOPA.

Neste contexto, considerando o grande valor econômico que a espécie bovina representa em todo território brasileiro, objetiva-se avaliar o efeito da rbST na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos pré-antrais de bovinos cultivados *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ovário e a oogênese

O ovário é um dos principais órgãos relacionados à reprodução de fêmeas mamíferas. Este é composto por vários tipos de células diferenciadas que, em conjunto, promovem suas funções endócrina e exócrina (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006). Quanto à função endócrina, o ovário é responsável pela produção e liberação de hormônios esteroides e peptídeos, enquanto a função exócrina ou gametogênica visa a produção e liberação de ovócitos (SAUMANDE, 1991).

Este órgão é constituído por duas regiões, a vascular e a parenquimatosa, circundadas por um epitélio superficial (SILVA, 2005). Na região vascular, localizada mais internamente, estão contidos os nervos, os vasos sanguíneos e os linfáticos, responsáveis por sua nutrição e sustentação. Já na região parenquimatosa estão contidos folículos ovarianos e corpos lúteos em diferentes estádios de desenvolvimento (HAFEZ, 2004). A função do ovário durante a vida reprodutiva das fêmeas depende de uma associação de fatores parácrinos e endócrinos, os quais atuam coordenando o processo conhecido como foliculogênese ovariana (SARAIVA et al., 2010).

Os estádios iniciais do desenvolvimento ovariano em mamíferos, ainda no período intrauterino, são desencadeados pela migração das Células Germinativas Primordiais (CGP) para a gônada primitiva (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006). Imediatamente após a diferenciação das gônadas, ocorre a transformação das CGP em oogônias meioticamente ativas. Posteriormente, estas oogônias se diferenciam em ovócitos primários ou imaturos, os quais sofrem uma parada no seu desenvolvimento (SUH et al., 2002) em prófase I no estágio de dictióteno.

Os ovócitos primários são circundados por uma camada de quatro a oito células da pré-granulosa, de formato pavimentoso, formando os folículos primordiais, iniciando assim a foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). Após a formação dos folículos primordiais, alguns podem ser estimulados a crescer imediatamente ou, na maioria destes, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência até receberem sinais para entrar no *pool* de crescimento (McGEE & HSUEH, 2000).

Os ovócitos primários inclusos nesses folículos encontram-se na fase de prófase I da meiose. A progressão da divisão meiótica ocorre somente na puberdade, com a liberação do

pico pré-ovulatório de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), originando assim os ovócitos secundários, ocorrendo uma nova parada da meiose na fase de metáfase II. A meiose será retomada novamente somente após a fecundação do ovócito pelo espermatozoide, originando o ovócito haploide fecundado, marcando assim o fim da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular. Ela ocorre simultaneamente à oogênese, quando o ovócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies (MARTINS et al., 2008). O início se dá com a formação do folículo primordial que, após diversas modificações estruturais, culmina com o estágio de folículo de Graaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre pela transição dos folículos do *pool* de reserva para o *pool* de folículos em crescimento (RÜSSE, 1983).

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e é formado por vários tipos celulares, sendo composto por um ovócito circundado por células da granulosa e tecais. De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em dois grupos: folículos pré-antrais ou não cavitários (folículos primordiais, de transição, primários e secundários) e folículos antrais ou cavitários (folículos terciários, de Graaf ou pré-ovulatório) (HULSHOF et al., 1994).

Os folículos primordiais são constituídos por um ovócito imaturo, circundado por uma simples camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (HUTT et al., 2006). As características morfológicas que marcam a ativação destes folículos são o aumento do diâmetro ovocitário, a proliferação das células da granulosa e a mudança na morfologia destas células de pavimentosas para cúbicas. Durante este período em que os folículos apresentam células da granulosa tanto pavimentosas quanto cúbicas, são denominados de folículos de transição ou intermediários (FORTUNE, 2003; ARAÚJO et al., 2010).

Em seguida, quando o ovócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos vêm a ser denominados de primários (GOUGEON & BUSSO, 2000). Posteriormente, duas ou mais camadas de células da granulosa são formadas ao redor do ovócito, o folículo então recebe a denominação de

secundário. Nesta fase, é possível a visualização da zona pelúcida em torno do ovócito (FORTUNE, 2003). Com o desenvolvimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em múltiplas camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, que confere a classificação destes folículos em terciários e pré-ovulatórios (BARNETT et al., 2006).

Os folículos primordiais possuem diâmetro médio de 35,23; 18,00 e 33,00µm em bovinos (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), ovinos (AMORIM et al., 2000) e caprinos (BEZERRA et al., 1998), respectivamente. É importante ressaltar que estes folículos primordiais representam cerca de 95% do total de FOPA presentes no ovário (ERICKSON, 1986).

Segundo Campbell (2009), o desenvolvimento folicular parece ocorrer em três fases distintas. Na primeira, o desenvolvimento ocorre na ausência de gonadotrofinas e parece ser controlado apenas pela expressão de fatores de crescimento locais. Na segunda fase, eles começam a ser responsivos, mas não requerem a presença de hormônios gonadotróficos para manter o desenvolvimento normal. Já na terceira fase, existe uma alta dependência gonadotrófica para o desenvolvimento dos folículos antrais.

A ativação, ou seja, a passagem dos folículos primordiais do estágio de quiescência para a fase de crescimento é a primeira e essencial etapa, em que os folículos primordiais saem do estágio de repouso e iniciam seu desenvolvimento. Os mecanismos precisos que controlam o início de sua progressão ainda são pouco esclarecidos. Em espécies mamíferas, o contínuo crescimento folicular é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como por fatores de crescimento que agem, direta ou indiretamente, de forma autócrina ou parácrina (MARTINS et al., 2008).

2.3 Atresia folicular

A população folicular difere entre as espécies, sendo de aproximadamente 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999) e 235.000 na vaca (BETTERIDGE et al., 1989). Os FOPA representam 90% da população folicular e constituem o estoque de gametas femininos (LIU et al., 2001).

Apesar da grande população folicular presente no ovário mamífero, a grande maioria dos folículos (aproximadamente 99%) não culmina em ovulação. Estes folículos sofrem um processo denominado de atresia. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas

de atresia ocorrem no ovócito, como, por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação ovocitária (MORITA & TILLY, 1999).

O processo de atresia folicular ocorre de duas maneiras, pela via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995). Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER, 1982). Esta resulta em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS et al., 2001). As mudanças observadas nos folículos primordiais e primários degenerados mostraram ovócitos retraídos com núcleos picnóticos e numerosos vacúolos no citoplasma (SILVA et al., 2002).

Já a apoptose é um sistema de morte celular programada encontrado em todos os organismos multicelulares, ocorrendo em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a um estímulo fisiológico. A alteração típica observada é a condensação da cromatina (MARKSTRÖM et al., 2002). Sabe-se que se trata de um evento geneticamente determinado, ou seja, depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos (HUSSEIN, 2005). Duas famílias regulam este processo: caspases e Bcl-2. As caspases são consideradas as executoras principais da via apoptótica e atuam ativando DNases, que são responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal. Já a família Bcl-2 compreende tanto genes anti-apoptóticos, quanto pró-apoptóticos (MARKSTRÖM et al., 2002).

A atresia folicular e os fatores que influenciam este processo são extensivamente estudados e tem sido demonstrado que alguns hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos na sua regulação (HSU & HSUEH, 2000). Desta forma, visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, têm sido desenvolvidos vários modelos de cultivo *in vitro*, no intuito de possibilitar o estudo dos fatores que controlam a atresia e, conseqüentemente, o crescimento folicular.

2.4 Sistemas de cultivo *in vitro* de FOPA

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos é uma das etapas da biotécnica de Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA). Esta técnica vem sendo amplamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações, sobre diferentes fases do desenvolvimento folicular, a fim de se mimetizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário. Além disso, o cultivo

folicular tem por objetivo fornecer um grande número de ovócitos viáveis para posterior utilização em outras biotécnicas, como a fecundação *in vitro*, a transgenia e a clonagem.

O cultivo *in vitro* de FOPA permite o desenvolvimento folicular, assegurando o crescimento e a maturação dos ovócitos, bem como a multiplicação e diferenciação das células da granulosa inclusas nesses folículos (FIGUEIREDO et al., 2002).

O cultivo de tecido ovariano tem sido usado para avaliar a importância da vascularização (FORTUNE et al., 2000), apoptose (FLAWS et al., 2001) e fatores de crescimento (ERICKSON, 2001) para o desenvolvimento de folículos primordiais (O'BRIEN et al., 2003).

Diferentes métodos de cultivo *in vitro* têm sido desenvolvidos a fim de se manter a viabilidade e promover o crescimento de FOPA *in vitro* (CHAVES et al., 2010). Dentre estes métodos, estão o cultivo isolado e o cultivo *in situ*.

O princípio das técnicas de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos FOPA dos demais componentes do estroma ovariano, como fibroblastos, fibras colágenas e elásticas e fibronectina (FIGUEIREDO et al., 2008). Para o isolamento, utilizam-se métodos enzimáticos ou instrumentos mecânicos. O tratamento enzimático baseia-se na utilização de enzimas digestivas que digerem o estroma ovariano e, assim, permitem o isolamento de um grande número de pequenos folículos. Com relação aos procedimentos mecânicos de isolamento folicular, aqueles comumente utilizados são o Tissue Chopper, tesouras cirúrgicas e agulhas dissecantes (KURVILA, 2007).

Além do isolamento folicular, o outro método utilizado é o cultivo *in situ*. Neste procedimento, pequenos fragmentos de córtex ovariano são obtidos com auxílio de um bisturi e cultivados em poços de placas de cultivo. Os cortes são superficiais, tendo em vista que é neste local que se encontram os folículos (SILVA et al., 2004).

O cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e do crescimento de folículos primordiais em diferentes espécies, como ovinos (ANDRADE et al., 2005) e bovinos (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997). Esse sistema de cultivo tem como principal vantagem a manutenção da integridade folicular e das interações entre as células foliculares e do estroma, facilitando a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1996). Esta interação é bastante benéfica para o desenvolvimento folicular, tendo em vista os efeitos hormonais autócrinos e parácrinos exercidos sobre as células ovarianas.

Atualmente, vários autores têm utilizado sistemas de cultivo *in situ* para estudar o desenvolvimento de folículos pré-antrais em roedores e ruminantes (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Apesar de estar sendo estudado em diferentes espécies animais há relato de desenvolvimento completo *in vitro* apenas em camundongos (O'BRIEN, 2003).

Em bovinos, os primeiros estudos sobre cultivo *in vitro* de FOPA ocorreram na década de 90 (FIGUEIREDO et al., 1994) e o melhor resultado relatado para esta espécie, até o momento, foi a formação da cavidade antral (GUTIERREZ et al., 2000; ITOH et al., 2002). Apesar dos esforços, para animais domésticos ainda não foi desenvolvido um sistema de cultivo adequado capaz de promover o completo desenvolvimento de FOPA iniciais (primordiais, de transição, primários e secundários) até o estágio de pré-ovulatório (SILVA et al., 2004).

2.5 Meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de FOPA

Diversos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais têm sido sugeridos por diferentes pesquisadores, porém os resultados em relação à viabilidade e ao desenvolvimento folicular são variáveis, dependendo do meio de cultivo utilizado (MATOS et al., 2007).

Dentre as substâncias acrescidas ao meio de cultivo de FOPA da espécie bovina estão fatores de crescimento e hormônios (GUTIERREZ et al., 2000), ácido ascórbico, piruvato, glutamina, hipoxantina, insulina, transferrina e selênio (FIGUEIREDO et al., 1994). Foi descrito por Figueiredo et al. (1994) que o acréscimo de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina ao meio de cultivo de base (MEM), suplementado com ITS (Insulina – 6,25 µg/mL, Transferrina - 6,25 µg/mL e Selênio - 6,25 µg/mL) aumenta significativamente a porcentagem de folículos morfológicamente normais durante o cultivo.

A insulina é normalmente adicionada ao meio de cultivo como fator de sobrevivência, permitindo um melhor aproveitamento das fontes de energia do meio (LIU et al., 2002). Adicionalmente, o selênio e a transferrina também são importantes substâncias a serem acrescentadas. Alguns autores sugerem que o processo de maturação folicular está relacionado a altas concentrações de transferrina e seus receptores na célula e que selênio pode ser adicionado ao meio de cultivo para ativar enzimas envolvidas na detoxificação e eliminação de radicais livres (DEMEESTERE et al., 2004).

Em mamíferos, o crescimento folicular contínuo é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como por fatores de crescimento que agem de forma autócrina ou parácrina (MARTINS et al., 2008). Acredita-se que o desenvolvimento de FOPA independe das gonadotrofinas, mas é influenciado por fatores intraovarianos, como *kit Ligand* (KL) ou Fator de Células Tronco (SCF) (HUTT et al., 2006), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) (WANG & ROY, 2004) e Proteínas Morfogenéticas Ósseas-15 (BMP-15) (FORTUNE, 2003).

Além destes, autores também relatam a participação do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1) (GUTIERREZ et al., 2000), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) (WANDJI et al., 1996), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (YANG & FORTUNE, 2007) e Fator de Crescimento Epidermal (EGF) (ANDRADE et al., 2005).

A ativação e o crescimento de FOPA é um processo dependente de diversos fatores, que podem agir sobre o ovócito, ou nas células da granulosa e da teca. A atividade destes fatores pode ser isolada ou combinada e até mesmo modular o efeito de hormônios, o que demonstra que o crescimento folicular é regulado por uma complexa interação entre diversas substâncias intra e extraovarianas (SILVA et al., 2005). Assim, atualmente, as pesquisas baseiam-se na busca por novas substâncias, como hormônios e fatores de crescimento, que assegurem a ativação e o desenvolvimento dos FOPA.

2.6 Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)

A Somatotropina Bovina (bST), ou hormônio do crescimento (GH), é um peptídeo composto por 192 aminoácidos sintetizado por células localizadas na adeno-hipófise que participa de vários processos fisiológicos e metabólicos de bovinos (FERREIRA, 2002). Ela liga-se a receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de estimular o seu crescimento (HERRINGTON & CARTER-SU, 2001).

A partir da década de 80, teve início a produção em escala industrial da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST), um fator de crescimento produzido a partir da técnica de DNA recombinante em *Escherichia coli* (SANTOS et al., 2001), no intuito de promover o aumento da produtividade de vacas leiteiras. Atualmente, este fator de crescimento também tem sido utilizado para o incremento em diferentes aspectos da reprodução de animais da espécie bovina.

A rbST atua na regulação de processos fisiológicos e metabólicos dos animais por meio da síntese de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1) e Proteínas Transportadoras de IGF (IGFPB) (GONG et al., 1997). De acordo com Ramos (2007), a atuação conjunta destes é fundamental no controle da função ovariana, melhorando a qualidade dos ovócitos e, conseqüentemente, a maturação e a formação de blastocistos *in vitro*.

Receptores de Somatotropina e IGF-1 têm sido encontrados em ovócitos imaturos e nas células da granulosa e do *cumulus* de bovinos (LONERGAN et al., 2000). Também Eckery et al. (1997) demonstraram que o RNAm para o receptor do GH é abundante no ovócito e nas células da granulosa de FOPA de ovelhas. Assim, vários autores desenvolveram estudos no intuito de verificar os efeitos benéficos da rbST sobre os aspectos reprodutivos de animais de produção.

Dentre os resultados satisfatórios relatados pelos autores, está o aumento da população de folículos durante a fase de recrutamento (BURATINI JR. et al., 1999; KOZICKI et al., 2005), melhora na qualidade de folículos quando associada ao FSH (RAMOS, 2007) e aceleração no desenvolvimento embrionário (MANN & LAMMING, 2001). Roth et al. (2002), sugerem que o efeito benéfico da rbST no desenvolvimento embrionário pode estar relacionado a influências diretas ou indiretas no microambiente folicular e/ou no próprio ovócito.

Avaliando a influência deste hormônio em receptoras inovuladas com embriões, Marques (2006), observou que a aplicação de 500mg no dia do estro aumentou a taxa de gestação destes animais. Resultado semelhante foi obtido por Vasconcelos (2011), que trabalhando com a mesma concentração, observou maior viabilidade de embriões de doadoras submetidas ao tratamento com o hormônio. Efeito positivo também foi encontrado por Pavlok et al. (1995), que constataram a maior preservação dos ovócitos da atresia por degeneração. Entretanto, Moraes Junior (2008) não encontrou modificações na resposta ovariana no que se refere a embriões viáveis, estruturas degeneradas e não fertilizados após tratamento prévio de vacas superovuladas com FSH, em associação com dose única de rbST.

Com relação à utilização deste hormônio em cultivos *in vitro*, Drakakis et al. (1995) relataram efeitos benéficos do mesmo sobre a fase pré-implantacional e desenvolvimento de embriões de camundongos. Estes autores observaram que a adição de 0,2ug/mL de GH ao meio de cultivo resultou em 87% de blastocistos formados.

Com o intuito de verificar os efeitos de várias concentrações (0.1, 1, 10, 100, 1000ng/mL) de rbST sobre a maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos bovinos *in vitro* e desenvolvimento embrionário após a fertilização *in vitro*, constatou-se que a presença das maiores concentração de rbST melhoraram as taxas de maturação e, conseqüentemente, o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto (IGA et al., 1998).

Em trabalhos com FOPA de camundongas, foi demonstrado que o GH, na concentração de 1mg/mL, aumentou o diâmetro folicular durante quatro dias de cultivo (KIKUCHI et al., 2001). Já em bovinos, a utilização de 100ng/mL de GH adicionado de insulina aumentou a proliferação das células da granulosa cultivadas por quatro dias (LANGHOUT et al., 1991).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito da rbST, no meio de cultivo, sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de FOPA de bovinos cultivados *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal e Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária (DVT), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BioAgro) e no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CEUA/UFV (protocolo: 485/2013) sendo as normas desta comissão seguidas rigorosamente.

3.2 Procedência dos ovários

Foram utilizados 5 pares de ovários de fêmeas bovinas coletados assepticamente no Frigorífico Sabor de Minas, localizado na cidade de Muriaé (MG). Imediatamente após a coleta, os mesmos foram lavados em álcool 70% e em Meio Essencial Mínimo (MEM), suplementado com antibióticos (Penicilina e Estreptomicina). Em seguida, os ovários foram transportados ao laboratório em MEM a 4°C em aproximadamente uma hora, de acordo com o protocolo desenvolvido por Chaves et al. (2008).

3.3 Meio de cultivo base

O meio de cultivo de base foi o MEM (Osmolaridade: 300 mOsm/L, pH: 7,2-7,4 – Sigma, St Louis, MO, USA) adicionado de uma solução de Insulina Transferrina Selênio (ITS), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 1,25 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA). Este meio foi chamado de MEM⁺ e constituiu o controle cultivado.

3.3 Protocolo experimental

Cada par ovariano correspondeu a uma repetição (total de 5 repetições). Para o cultivo *in situ*, a região parenquimatosa de ambos os ovários foi seccionada com auxílio de pinça e bisturi em fragmentos de aproximadamente 3x3x1mm, dos quais um foi escolhido aleatoriamente e imediatamente fixado para Histológica Clássica (HC) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), constituindo o controle não cultivado. Os fragmentos restantes foram cultivados individualmente em placas de 24 poços, contendo 1mL de MEM⁺ (controle cultivado) em cada poço, acrescidos de 10, 50, 100 e 1000ng/mL de rbST.

O cultivo foi realizado em estufa a 5% de CO₂ e 38,5°C e o meio foi totalmente substituído a cada dois dias. Os fragmentos foram retirados após um e sete dias de cultivo *in vitro* para os procedimentos de Histologia Clássica e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

3.4 Processamento para Histologia Clássica

Os folículos foram fixados em Carnoy por quatro horas e destinados à Histologia Clássica. Primeiramente foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), e em seguida diafanizados em Xilol. Os fragmentos foram então incluídos em blocos de parafina e seccionados seriadamente à espessura de 7µm. Cada secção foi montada em lâmina e corada pela técnica de Periodic Acid Schiff (PAS) e Hematoxilina. Todas as secções foram examinadas utilizando um microscópio óptico.

Foram analisados 30 folículos por tratamento. Com relação à sobrevivência folicular, os folículos foram classificados em normais ou degenerados. Os FOPA presentes no tecido ovariano foram considerados morfológicamente normais quando apresentavam células da granulosa organizadas circundando o ovócito, enquanto que o mesmo apresentava-se esférico ou ligeiramente alongado, com núcleo sem evidência de picnose (BRUNO et al., 2008). Já os degenerados foram assim caracterizados de acordo com a desorganização das células da granulosa e com a presença de áreas de retração citoplasmática e picnose nuclear (SILVA et al., 2002).

Quanto ao estágio de desenvolvimento, os FOPA foram classificados como primordiais (ovócito circundado por células da pré-granulosa de formato pavimentoso) e ativados (a partir do estágio de transição, no qual o ovócito é circundado por pelo menos três células da granulosa de formato cúbico) (BRUNO et al., 2008). A proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento foi calculada no dia zero (controle não cultivado) e após um e sete dias de cultivo, nos diferentes tratamentos testados. Os diâmetros ovocitário e folicular foram mensurados com auxílio de uma ocular micrométrica, sendo a mensuração realizada em folículos classificados como normais na análise histológica.

3.5 Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os procedimentos para a Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizados conforme descrito por Costa (1994).

Para fixação dos fragmentos, foi utilizada a solução de glutaraldeído a 1% em tampão fosfato $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,6 por uma hora. Após a fixação, foram lavados no mesmo tampão e submetidos à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora a 4°C. Após três lavagens sucessivas em água bidestilada, foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de etanol (50, 75, 90 e 100%), durante 15, 15, 15 e 30 minutos, respectivamente. A última desidratação, em álcool 100%, foi realizada duas vezes.

Foi utilizada a resina EPON-812 como meio de embebição e inclusão. As substâncias foram homogeneizadas cuidadosamente para se evitar a formação de bolhas de ar. Para a inclusão, foram adicionados 2% de Dimetilamino Metil Fenol (DMP) na solução final. Os fragmentos foram incluídos na resina utilizando moldes como suporte. O material foi incubado por 1 hora à 40°C e depois 72 horas à 60°C, estando assim, disponível para os procedimentos de ultramicrotomia.

Foram realizadas inicialmente secções semi-finas ($0,5\mu\text{m}$) com navalhas de vidro em ultramicrotomo. Estas foram coradas com azul de toluidina, montadas em lâmina/lamínula e examinadas sob microscopia óptica, selecionando-se as melhores para secções ultra-finas (60-70nm). Secções ultra-finas foram obtidas com navalha de vidro e colhidas em grades de cobre (malha 200), coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, conforme os protocolos de WATSON (1958) e REYNOLDS (1963). Posteriormente, as secções ultra-finas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão.

A análise ultraestrutural foi realizada em FOPA oriundos do grupo que apresentou os melhores resultados após o cultivo *in vitro*, quanto à sobrevivência, ativação e crescimento ovocitário e folicular. Foi realizada avaliação da integridade e densidade das organelas citoplasmáticas do ovócito e das células da granulosa, o grau de vacuolização citoplasmática e a integridade do envelope nuclear.

3.6 Análises estatísticas

Cada tratamento foi repetido cinco vezes. As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Normalidade (Lilliefors) e Homocedasticidade (Cochran) e posteriormente a Análise de Variância (ANOVA).

Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de comparação de médias mais apropriado, evitando-se erros estatísticos tipo I e II. Quando não atenderam às premissas de Normalidade e Homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados

foram submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon ou Kruskal-Wallis, de acordo com o número de tratamentos (SAEG, 1999).

As variáveis qualitativas foram comparadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sobrevivência folicular

Tanto no grupo de folículos não cultivados quanto nos submetidos ao tratamento com o meio base e as diferentes concentrações de rbST foram observados folículos normais (Fig.1A) e degenerados (Fig. 1B).

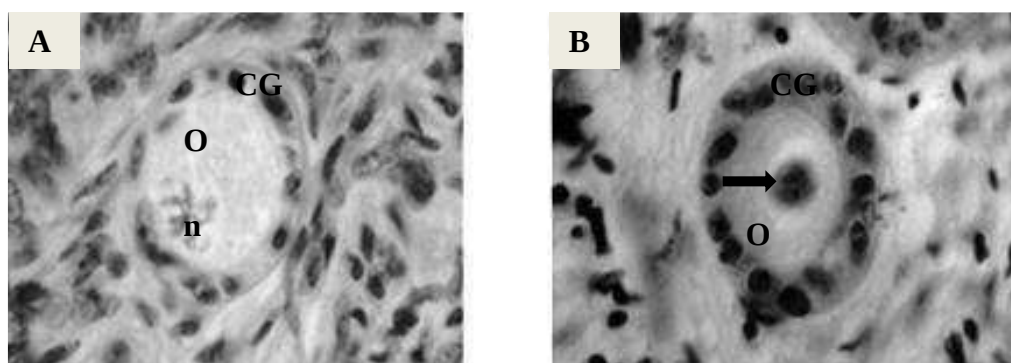


Figura 1: Fragmentos ovarianos (400x) demonstrando um folículo normal (A) e degenerado (B) após coloração PAS-Hematoxilina (O: ovócito; n: núcleo do ovócito; CG: células na granulosa). Seta: núcleo picnótico.

O número de folículos normais não cultivados verificados no presente estudo é semelhante ao descrito por Luna et al. (2011) para a espécie bovina (93,6%). Após um e sete dias de cultivo *in vitro*, o percentual de folículos normais em fragmentos não cultivados foi superior ($P < 0,05$) quando comparado aos folículos cultivados apenas com o meio base e na presença das diferentes concentrações de rbST testadas (Tabela 1).

Estes resultados demonstram que a rbST, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de manter a viabilidade folicular normal. Corroborando com o estudo de Bruno et al. (2008), que relataram que o cultivo *in vitro* reduz o número de folículos morfolologicamente normais.

Os mecanismos pelos quais este hormônio promove efeitos benéficos sobre a viabilidade folicular ainda não estão completamente elucidados. Alguns autores sugerem um efeito direto no ovócito e nas células da granulosa (LUCY, 2000), enquanto que outros relatam que este hormônio induz aumento nas concentrações plasmáticas e ovarianas de IGF-1 (BURATINI et al., 2000). Neste contexto, estudos apontam que o IGF-1, por sua vez, é capaz de suprimir a fragmentação do DNA por apoptose em ovócitos de ratas cultivados *in*

vitro, agindo como um fator anti-apoptótico (CHUN et al., 1994). Entretanto, o presente estudo corrobora com Costa et al. (2014) e Fortune et al. (2003), que relataram que o IGF-1 não foi capaz de manter a viabilidade de FOPA de cabras cultivados *in vitro* durante sete dias.

Tabela 1 - Porcentagem média de folículos pré-antrais morfologicamente normais em tecido ovariano não cultivado e cultivado por um e sete dias, com diferentes concentrações de rbST

Controle	92,22 ± 19,25 ^a	
Tratamento	Dia 1 (%)	Dia 7 (%)
MEM ⁺	71,66 ± 11,35 ^{bA}	72,78 ± 18,70 ^{bA}
10ng/mL	81,66 ± 12,65 ^{bA}	78,34 ± 20,65 ^{bA}
50ng/mL	65,00 ± 13,0 ^{bA}	66,12 ± 16,98 ^{bA}
100ng/mL	74,44 ± 14,01 ^{bA}	83,88 ± 20,63 ^{bA}
1000ng/mL	79,44 ± 12,46 ^{bA}	76,66 ± 20,23 ^{bA}

^{a,b} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

^{A,B} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (P<0,05).

De acordo com Gutierrez et al. (1997), este fator de crescimento é também responsável por acentuar os efeitos do FSH por meio do aumento de seus receptores nas células da granulosa. Este mecanismo de ação pode justificar porque a rbST não contribuiu para o aumento das taxas de folículos viáveis no presente estudo, tendo em vista que pequenos folículos pré-antrais não são responsivos ao FSH. Ramos et al. (2007) também relataram que a rbST somente alterou a qualidade de ovócitos de bovinos quando associada ao FSH.

Além disso, alguns fatores como o transporte e a manipulação do ovário, além de alterações de pH durante as trocas de meio podem afetar a qualidade dos folículos. Com isso, é muito provável que ocorra a redução da taxa de sobrevivência folicular e, consequentemente, o aumento do número de folículos atresícos (COSTA, 2010).

Este processo de atresia folicular pode ocorrer de duas maneiras, pela via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995). Na via degenerativa, a isquemia resulta em alterações na permeabilidade da membrana celular, onde se pode observar aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, consequentemente, degeneração (BARROS et al., 2001). Quanto à atresia pela apoptose, pode ser decorrente da redução do oxigênio e difusão de nutrientes dentro do córtex ovariano (FARBER, 1982). No presente estudo, a principal alteração observada nos folículos classificados como degenerados foi a presença de núcleos picnóticos (Fig. 1B).

Ainda assim, as taxas de folículos normais observadas são consideradas elevadas e corroboram com os resultados de outros autores, que relataram um total de sobrevivência de 83,5%, após cultivo isolado por quatro dias, utilizando apenas um meio de cultivo base semelhante (MACHADO et al., 2006).

Quando foi avaliada a sobrevivência folicular após progressão do dia um ao sétimo dia de cultivo, foi observado que a taxa de folículos viáveis se manteve ($P>0,05$) em todos os tratamentos (Tabela 1). Isto demonstra que o tempo de cultivo não interferiu na sobrevivência destes folículos. Este resultado é satisfatório tendo em vista que outros autores relatam a redução da quantidade de folículos viáveis com o decorrer do tempo de cultivo *in vitro*, utilizando 50 e 100 ng/mL de IGF-1 (COSTA et al., 2014). Entretanto, não se pode atribuir a estabilidade da sobrevivência dos folículos ao hormônio em estudo, visto que a quantidade de folículos considerados normais quando cultivados com diferentes concentrações do hormônio foi semelhante ($P>0,05$) aquela encontrada nos folículos incubados apenas com o meio base (MEM⁺).

A composição do meio é um importante aspecto a ser considerado para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. O meio de cultivo utilizado no presente estudo é uma das mais ricas fórmulas de MEM, sendo composto por 21 aminoácidos essenciais, complexos de vitamina B, vitaminas C e D e sais inorgânicos. No presente estudo também foram adicionados insulina, transferrina e selênio a este meio de cultivo. De acordo com Liu et al. (2002), a insulina permite um maior aproveitamento das fontes de energia do meio. Já o selênio possui a função de ativar enzimas que participam do processo de eliminação de radicais livres produzidos pelas células (DEMEESTERE et al., 2004). Segundo Silva et al. (2004), a adição destas substâncias ao cultivo de base (MEM) contribui para a manutenção da sobrevivência folicular no cultivo

As taxas de sobrevivência folicular obtidas evidenciam a eficiência do meio de cultivo utilizado em fornecer um ambiente adequado aos folículos, como também relatado por Celestino et al. (2009). Assim, no presente estudo, o meio de cultivo MEM⁺ foi capaz de sustentar a sobrevivência folicular em taxas consideradas satisfatórias, bem como foi capaz de manter o número de folículos viáveis após sete dias de cultivo. Da mesma forma, Bruno et al. (2008) e Andrade et al. (2005) relataram a eficiência deste meio na manutenção da viabilidade folicular para caprinos e ovinos, respectivamente.

4.2 Ativação folicular

Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados como primordiais, de transição (intermediários), primários e secundários. A partir do momento em que evoluem do estágio de primordiais, considera-se que houve a ativação dos mesmos, ou seja, estes folículos entram no *pool* de crescimento (RÜSSE, 1983). Por isso, no presente estudo, os folículos foram classificados apenas como “primordiais” ou “ativados”, sendo incluídos neste segundo grupo os folículos de transição, os primários e os secundários.

Os folículos primordiais são constituídos por um ovócito circundado por uma simples camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (HUTT et al., 2006). As características morfológicas que marcam a ativação destes folículos são o aumento do diâmetro ovocitário, a proliferação das células da granulosa e a mudança na morfologia destas células de pavimentosas para cúbicas, como pode ser observado na Figura 2.

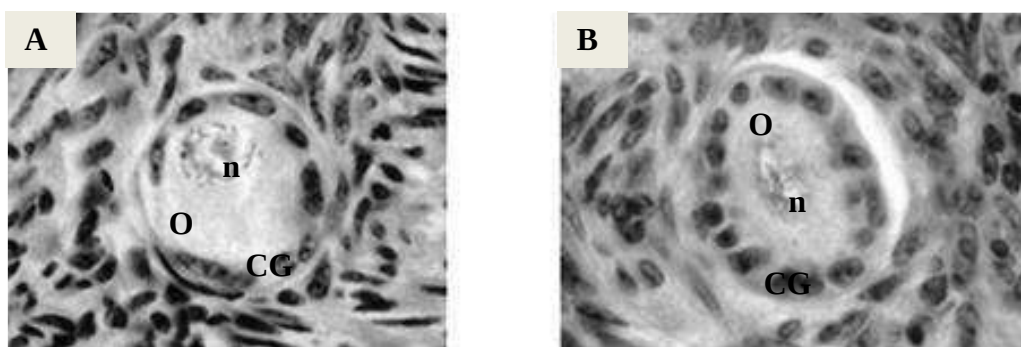


Figura 2: Fragmentos ovarianos (400x) demonstrando um folículo primordial (A) e ativado (B) após coloração PAS-Hematoxilina (O: ovócito; n: núcleo do ovócito; CG: células na granulosa). Na figura A é evidente a camada de células da granulosa de formato pavimentoso, enquanto na figura B estas células apresentam formato cúbico.

Quanto ao estágio de desenvolvimento folicular, foi observado que a quantidade de folículos ativados foi superior ($P < 0,05$) nos fragmentos cultivados em comparação ao grupo controle não cultivado, após um e sete dias de cultivo (Tabela 2).

Como pode ser verificado, a partir de um dia de cultivo já houve ativação de grande parte destes folículos. Esta ativação precoce também foi relatada por Costa et al. (2014) e Martins et al. (2010) durante o cultivo *in vitro* de folículos ovariano de cabras. Também foi verificado que o percentual de folículos primordiais reduziu ($P < 0,05$) após o período de sete

dias de cultivo em todos os tratamentos estudados. Resultados semelhantes também foram relatados por Wandji et al. (1996) e Braw-Tal & Youssefi (1997).

Entretanto, diferente do relato destes autores, no presente estudo não houve aumento ($P>0,05$) do número de folículos ativados após o cultivo por sete dias. Desta forma, embora o cultivo dos folículos tenha promovido sua ativação, diminuindo assim a percentagem de primordiais após sete dias, as condições de cultivo não foram eficientes para permitir o posterior crescimento dos demais folículos. Resultado semelhante também foi obtido por Costa et al. (2014) para a espécie caprina.

Tabela 2 - Porcentagem média de folículos pré-antrais primordiais e ativados em tecido ovariano não cultivado e cultivado por um dia e sete dias, com diferentes concentrações de rbST

Controle	87,34 ± 40,18 ^a		12,66 ± 20,71 ^a	
	Primordiais		Ativados	
Tratamento	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
MEM ⁺	30,00 ± 15,07 ^{bA}	2,76 ± 2,22 ^{bB}	70,00 ± 22,54 ^{bA}	97,24 ± 26,83 ^{bA}
10ng/ML	23,34 ± 13,29 ^{bA}	0,56 ± 0,96 ^{bB}	76,66 ± 26,34 ^{bA}	99,44 ± 31,95 ^{bA}
50ng/mL	27,77 ± 14,17 ^{bA}	1,17 ± 1,50 ^{bB}	72,78 ± 24,51 ^{bA}	98,83 ± 20,55 ^{bA}
100ng/mL	37,22 ± 20,12 ^{bA}	2,78 ± 3,32 ^{bB}	62,78 ± 28,08 ^{bA}	97,22 ± 34,47 ^{bA}
1000ng/mL	31,00 ± 16,27 ^{bA}	0,00 ± 0,00 ^{bB}	69,00 ± 24,86 ^{bA}	100,00 ± 29,05 ^{bA}

^{a,b} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Duncan ($P<0,05$).

^{A,B} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem entre si pelo teste Duncan ($P<0,05$).

De acordo com Cushman et al. (2001) o tratamento a longo prazo com bST reduz a quantidade de folículos ativados. Estes autores sugeriram então que a supressão da ativação ocorre em função de um feedback local. Este pode ser um dos motivos pelo qual o número de folículos ativados não tenha aumentado ($P>0,05$) do dia um ao sétimo dia de cultivo no presente estudo. Além disso, Cushman et al. (2001) e Fortune (2003) afirmam que os efeitos positivos do IGF-1 em folículos de bovinos pode ter início apenas no estágio de secundários. Também Demeestere et al. (2004) observaram que as concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL de IGF-1 não estimularam a ativação de folículos primordiais durante o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos da espécie bovina.

Como pode ser constatado na presente pesquisa, a ativação folicular, tanto no dia um quanto no dia sete de cultivo, ocorreu independente da presença da rbST no meio de cultivo. Segundo Campbell (2009) o início do desenvolvimento folicular (fase de ativação) em

espécies mamíferas é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, além dos fatores de crescimento que agem sobre os mesmos (MARTINS et al., 2008). Este fato pode explicar o motivo pelo qual o acréscimo apenas da rbST não tenha sido suficiente para estimular a ativação em uma maior quantidade de folículos.

Estes resultados evidenciam que a ativação dos folículos após o cultivo *in vitro* por um e sete dias foi decorrente apenas do meio de cultivo, assim como relatado por Bruno et al. (2008), que encontraram uma média de 84,1% de folículos ativados em fragmentos cultivados, pelo mesmo período, apenas com o meio de cultivo base. De acordo com Yang & Fortune (2002) as altas doses de insulina presentes no composto ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), um dos componentes adicionados ao MEM, promove maior ativação de folículos primordiais de bovinos. Assim, é evidente que este meio atualmente utilizado apresente grande eficiência em fornecer ambiente adequado para possibilitar o desenvolvimento dos folículos, visto que as taxas de ativação são superiores a 80%, como também observado no presente estudo.

4.3 Crescimento ovocitário e folicular

Com relação à média de tamanho dos ovócitos não cultivados no presente estudo, esta foi semelhante à relatada por Munhoz & Luna (2008), de 25,92µm. Apenas os folículos cultivados na presença de 1000ng/mL apresentaram o diâmetro dos ovócitos semelhante ($P>0,05$) ao do controle não cultivado após um dia de cultivo. Entretanto, este diâmetro reduziu ($P<0,05$) após sete dias, bem como daqueles cultivados com as concentrações de 10 e 50ng/mL de rbST (Tabela 3).

Tabela 3 - Diâmetro ovocitário médio de folículos ovarianos não cultivados e cultivados por um e sete dias, com diferentes concentrações de rbST

Controle	25,54 ± 3,23 ^a	
Tratamento	Dia 1 (µm)	Dia 7 (µm)
MEM ⁺	19,79 ± 4,58 ^{bA}	21,30 ± 15,75 ^{bA}
10ng/mL	21,19 ± 4,08 ^{bA}	17,64 ± 4,76 ^{bB}
50ng/mL	21,52 ± 4,93 ^{bA}	19,03 ± 5,61 ^{bB}
100ng/mL	21,47 ± 4,32 ^{bA}	19,69 ± 3,89 ^{bA}
1000ng/mL	24,55 ± 3,97 ^{aA}	20,34 ± 5,75 ^{bB}

^{a,b} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Duncan ($P<0,05$).

^{A,B} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem entre si pelo teste Duncan ($P<0,05$).

Desta forma, foi observado que apenas o controle cultivado (MEM⁺) e a concentração de 100ng/mL de rbST foram capazes de manter o diâmetro ovocitário após sete dias de cultivo. Estes resultados estão de acordo com o relato de Martins et al. (2010), em que o cultivo com 100ng/mL de IGF-1 aumentou o diâmetro folicular e ovocitário após sete dias de cultivo, quando comparado ao controle não cultivado. IGA et al. (1998) também verificaram que maiores concentrações de rbST (100 e 1000ng/mL) melhoraram o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.

De acordo com Figueiredo et al. (1994), o aumento do diâmetro de folículos pré-antrais ocorre principalmente pela multiplicação das células da granulosa. Desta forma, é provável que, no presente estudo, após o período de sete dias em cultivo, tenha ocorrido aumento apenas nestas células. Isto poderia explicar o motivo pelo qual o tamanho do ovócito não foi influenciado pela rbST, e sim o tamanho do folículo (Tabela 4), no qual estas células são inclusas. Corroborando com este achado, Langhout et al. (1991) descreveram que a utilização de 100ng/mL de GH adicionado de insulina aumentou a proliferação das células da granulosa de folículos cultivadas por quatro dias.

Embora o IGF-1 exerça um efeito estimulador sobre o crescimento folicular na fase pré-antral, McCaffery et al. (2000) destacaram a importância de seu mecanismo regulador, mostrando que este fator de crescimento pode apresentar efeito negativo sobre o desenvolvimento dos ovócitos durante o cultivo de folículos pré-antrais de bovinos, por meio do mecanismo de feedback. Este mecanismo poderia justificar o fato da maior concentração do hormônio ter influenciado positivamente no crescimento do ovócito após um dia de cultivo, ocorrendo posteriormente redução ($P < 0,05$) no sétimo dia de incubação.

Quanto ao diâmetro dos folículos não cultivados (Tabela 4), as médias do presente estudo também foram similares ao relatado por Munhoz & Luna (2008) e Braw-Tal & Yossefi (1997) para a espécie bovina, de 36,58 e 35,23 μ m, respectivamente.

Após um dia de cultivo, o diâmetro dos folículos cultivados em MEM⁺ e em todas as concentrações de rbST foram semelhantes ($P > 0,05$) ao verificado naqueles do tratamento controle não cultivado. Além disso, pode-se observar que o diâmetro dos folículos cultivados na presença de 1000ng/mL de rbST foi superior ($P < 0,05$) ao encontrado nos folículos cultivados apenas com o MEM⁺, após um dia de cultivo.

Após sete dias de cultivo *in vitro*, os folículos cultivados em meio contendo 1000ng/mL de rbST apresentaram maior diâmetro folicular ($P < 0,05$), quando comparados

aqueles cultivados em meio contendo menor concentração do hormônio (10ng/mL), como demonstrado na Tabela 4. Este resultado ressalta a eficácia da maior concentração do hormônio sobre o crescimento dos folículos pré-antrais no presente estudo, corroborando com Kikuchi et al. (2001), os quais constataram o aumento do diâmetro folicular após quatro dias de cultivo de FOPA com maiores concentrações de GH (1mg/mL).

Tabela 4 – Diâmetro médio de folículos ovarianos não cultivados e cultivados por um e sete dias, com diferentes concentrações de rbST

Controle	35,62 ± 5,19 ^a	
Tratamento	Dia 1 (µm)	Dia 7 (µm)
MEM ⁺	32,59 ± 8,68 ^{a,bA}	28,71 ± 6,36 ^{aA}
10ng/mL	34,84 ± 7,05 ^{aA}	27,18 ± 5,59 ^{a,bB}
50ng/mL	36,67 ± 7,66 ^{aA}	33,10 ± 13,11 ^{aA}
100ng/mL	39,82 ± 15,75 ^{aA}	30,42 ± 5,91 ^{aB}
1000ng/mL	40,61 ± 12,72 ^{a,cA}	35,18 ± 10,82 ^{a,cA}

^{a,b} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Duncan (P<0,05).

^{A,B} Percentuais com letras diferentes sobrescritas na mesma linha diferem entre si pelo teste Duncan (P<0,05).

De acordo com Spicer et al. (2005) o IGF-1 apresenta potente ação mitogênica responsável por estimular o crescimento de células da granulosa na espécie bovina. O receptor para este fator de crescimento é expresso nas células da teca e da granulosa de folículos pré-antrais e antrais de bovinos (ARMSTRONG et al., 2000). Este fato justifica o motivo pelo qual no presente estudo houve o aumento no diâmetro foliculo, mas não no diâmetro ovocitário.

Foi observado que o MEM⁺, bem como as concentrações de 50 e 1000ng/mL foram capazes de manter o diâmetro folicular após os sete dias de cultivo *in vitro*. Thomas et al. (2007) também verificaram que o IGF-1 durante o cultivo por seis dias promoveu aumento no diâmetro de folículos de bovinos de maneira dose-dependente.

Como pode ser observado, o cultivo *in vitro* realizado com as diferentes concentrações de rbST não contribuiu para o aumento do diâmetro ovocitário e folicular dos FOPA no presente estudo. Entretanto, algumas concentrações foram capazes de manter estes diâmetros. Desta forma, a divergência entre os resultados deste estudo e os relatos de outros autores pode ser justificada pela sensibilidade diferenciada de cada folículo ao tratamento utilizado, pelo tamanho do folículo, composição do meio básico e tempo de cultivo.

Outra possível explicação é que o RNAm que codifica o receptor de IGF-1 foi detectado em ovócitos e em células da granulosa de folículos em estádios de desenvolvimento mais avançados na espécie bovina. Entretanto, este RNAm não foi detectado em folículos de pré-antrais (ARMSTRONG et al., 2002). Da mesma forma, Cushman et al. (2001) sugerem que o IGF-1 começa a apresentar efeitos positivos sobre FOPA de bovinos a partir do estágio de folículos secundários. Ainda Lussier et al. (1995) relatam que o crescimento do folículo bovino requer cerca de 42 dias para se completar.

Diante disto, é provável que a adição de rbST ao meio de cultivo não foi capaz de promover o aumento dos diâmetros foliculares no presente estudo. Possivelmente, o tempo de cultivo de sete dias não foi suficiente para influenciar na resposta destes folículos aos tratamentos com o hormônio testado.

4.4 Análise ultraestrutural

Atualmente, a avaliação da viabilidade e do desenvolvimento folicular *in vitro* tem sido mostrada principalmente por meio da análise histológica e ultraestrutural. Esta segunda análise é considerada mais precisa, pois revela mais informações sobre a qualidade dos folículos e ovócitos e pode detectar danos às membranas celulares e organelas (LUCCI et al., 2001; BRUNO et al., 2008).

A análise ultraestrutural do presente estudo foi realizada em FOPA oriundos do grupo que apresentou os melhores resultados nas análises histológicas, após o cultivo *in vitro* por um e sete dias (1000ng/mL de rbST).

Os achados ultraestruturais demonstraram que após sete dias de cultivo em meio contendo 1000ng/mL de rbST, houve danos à membrana nuclear e basal, alteração nas células da granulosa, bem como aumento da vacuolização citoplasmática e baixa densidade de organelas distribuídas no citoplasma (Fig. 3), características indicativas de degeneração folicular (BRUNO et al., 2008).

Corroborando com este resultado, Fortune et al. (2004) relataram que a adição de IGF-1 ao meio de cultivo aumentou a atresia de folículos pré-antrais em bovinos, após o cultivo *in vitro*. Segundo Bruno et al. (2008) estes achados de degeneração podem ser devido às concentrações inadequadas de algumas substâncias-chave envolvidas na regulação do desenvolvimento folicular normal, como, por exemplo, o FSH.

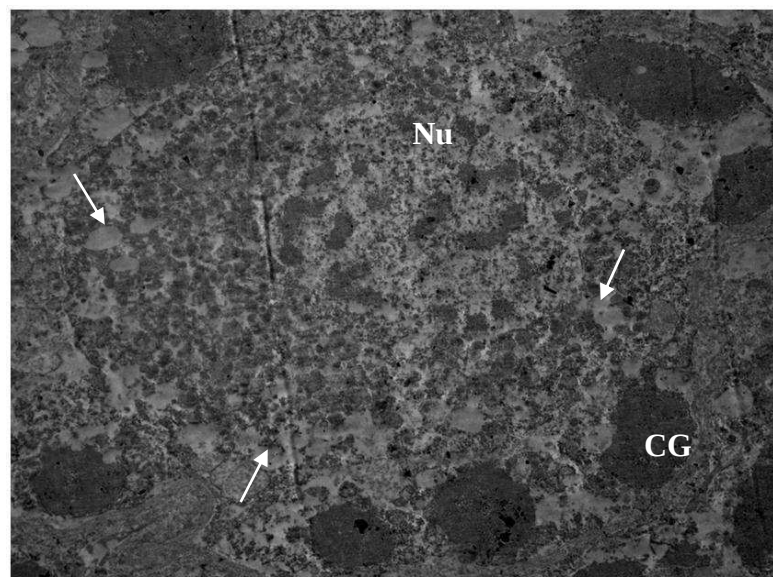


Figura 3: Ultraestrutura de folículo pré-antral, cultivado por sete dias (3.000x) em meio contendo 1000ng/mL de rbST. Nu: núcleo do ovócito; CG: células da granulosa; Setas: vacúolos.

A concentração de 1000ng/mL de rbST foi a que apresentou melhores resultados quanto a manutenção do crescimento do diâmetro ovocitário e folicular, após o cultivo *in vitro* por um e sete dias. Entretanto, este crescimento possivelmente não foi normal, tendo em vista que a adição desta concentração ao meio de cultivo não foi capaz de manter o percentual de folículos morfologicamente normais semelhante ao controle, após um e sete dias de cultivo. Resultado semelhante também foi relatado por Bruno et al. (2008) e Hulshof et al. (1994), em que o aumento do diâmetro de FOPA de bovinos foi causado pelo aumento no tamanho das células da granulosa após a degeneração, e não devido à sua proliferação.

Este fato foi confirmado no presente estudo por meio da análise ultraestrutural, em que os mesmos apresentaram sinais de degeneração, como relatado anteriormente. Desta forma, não obstante o tamanho do ovócito e a análise histológica dos folículos, também se torna de fundamental importância que as condições ultraestruturais sejam avaliadas, levando-se em consideração a densidade das organelas citoplasmáticas do ovócito e das células da granulosa, o grau de vacuolização citoplasmática e a integridade do envelope nuclear (ARAÚJO et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

As concentrações de 10, 50 e 100ng/mL de rbST não tem efeitos benéficos sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de FOPA de bovinos.

A concentração de 1000ng/mL de rbST aumenta o diâmetro folicular, entretanto não tem efeitos benéficos sobre a sobrevivência e a ativação de folículos pré-antrais de bovinos cultivados *in vitro* durante um e sete dias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.37, p.269-277, 2000.
- ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; 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.
- ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; MAGALHÃES, D.M.; SILVA, G.M.; BÃO, S.N.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.305-310, 2010.
- ARMSTRONG, D.G.; GUTIERREZ, C.G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A.L.; MANN, G.E.; WOAD, K.L.; HOGG, C.O.; WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v.165, p.101–113, 2000.
- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v.12, p.537-355, 2006.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v.130, p.401-409, 2001.
- 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 & Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
- BEZERRA, M.B.; RONDINA, D.; OLIVEIRA, L.C.; LIMA, A.K.F.; CECCHI, R.; LUCCI, C.M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J.R. Aspectos quantitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.8, p.30-41, 1998.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.1, p.5-13, 2006.
- BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I.B.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; LOPES, C.A.P.; MAIA-JR, J.E.; BÃO, S.N.; NOBRE JUNIOR, H.V.; MAIA, F.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1329-1337, 2008.

BURATINI JR., J.; PRICE, C.A.; BÓ, G.A. Os efeitos do bST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v.27, p.147-170, 1999.

BURATINI JR., J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, p.421-431, 2000.

CAMPBELL, B.K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. **Animal Reproduction**, v. 6, p.159-171, 2009.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovinos sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. São Paulo, SP, Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 188p., 2005.

CELESTINO, J.J.H.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M. V.A.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; 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 Sciences**, v.16, p.239-246, 2009.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.37-49, 2010.

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

CHUN, S.Y.; BILLI, H.; FURUTA, I.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A.J. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory roles of endogenous insulin-like growth factor I. **Endocrinology**, v. 135, p. 1845-1853, 1994.

COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte, Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de doutorado, 155p., 1994.

COSTA, S.L. **Efeito da Tiroxina e do Hormônio Folículo Estimulante no desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais ovinos**. Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa, Dissertação de Mestrado, 37p., 2010.

COSTA, S.L.; COSTA, E.P.; PEREIRA, E.C.M. BENJAMIN, L.A.; RODRIGUES, M.T.; MENDES, V.R.A.; SILVA, T.F. Influence of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) on the survival and the *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, p.1037-1044, 2014.

CUSHMAN, R.A.; SOUZA, JOSE C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J.H. Alteration of Activation, Growth, and Atresia of Bovine Preantral Follicles by Long- Term Treatment of Cows with Estradiol and Recombinant Bovine Somatotropin. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.581–586, 2001.

DEMEESTERE, I.; GERVY, C.; CENTNER, J.; DEVREKER, F.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, *in vitro* oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1664–1669, 2004.

DRAKAKIS, P.; LOUTRADIS, D.; MILINGOS, S.; MICHALAS, S.; KALLIANIDIS, K.; BLETSA, R.; ARAVANTINOS, D.; KIESSLIN, A. A Preliminary Study of the Effect of Growth Hormone on Mouse Preimplantation Embryo Development *in vitro*. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 40, p.222-226, 1995.

ECKERY, D.C.; MOELLER, C.L.; NETT,T.M.; SAWYER, H.R. Localization and qualification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.57, p.507-513, 1997.

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

ERICKSON, G. F. Role of growth factors in ovary organogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, p.13-16, 2001.

FARBER, J. L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Laboratory Investigation**, v.47, p. 14-123, 1982.

FERREIRA, A.T.; SOUZA, J.C.; PEREIRA, M.N.; PÉREZ, J.R.O.; ROCHA, G.P. Influência da Somatotropina Bovina Recombinante (rbST), aplicada um dia após o parto, sobre a produção de vacas da raça Holandês primíparas. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, p.1568-1574, 2002.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; 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 of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v.43, p.845-858, 1995.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; ECTORS, F.J.; BECKERS, J.F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, p.227-256, 2002.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Rocca, 2ª ed., p.303-327, 2008.

FLAWS, J.A.; ABBUD, R.; MANN, R.J.; NILSON, J.H.; HIRSHFIELD, A.N. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1233-1237, 1997.

FLAWS, J.A.; HIRSHFIELD, A.N.; HEWITT, J.A.; BABUS, J.K.; FURTH, P.A. Effects of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. **Biology Reproduction**, v.64, p.1153-1159, 2001.

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.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.53-60, 2002.

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.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WILMUT, I. et al. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v.45, p. 611-622, 1997.

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

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 Reproduction**, v.62, p.1322-1328, 2000.

GUTIERREZ, C.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. **Biology Reproduction**, v.56, p.608-616, 1997.

HAFAZ, E.S.E. Anatomy of Female Reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**, 7th edition, Williams & Wilkins, USA, p.20-58, 2004.

HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **Trends Endocrinology Metabolism**, v.12, p.252-257, 2001.

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

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, p.217-226, 1994.

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

HUTT, K.J.; MCLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. KIT/KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biology of Reproduction**, v.75, p.421-433, 2006.

IGA, K. ; NIWA, K.; BARTKE, A. Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes in vitro and promotes subsequent embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v.44, p.45-52, 1998.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology Reproduction**, v.67, p.1099-1105, 2002.

KIKUCHI, N.; ANDOH, K.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. **Biology Reproduction**, v.65, p.66-71, 2001.

KOZICKI, L.E.; SEGUI, M.S.; FANTINI FILHO, J.C.; PRADO, F.R.A.; MATTÉ, F.; GLASER, J.R.P.; WEISS, R.R.A. Somatotrofina bovina (bST) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v.10, p.35-44, 2005.

KURVILA, A. **Cloning and sequencing of FSH receptor gene from buffalo preantral follicles**. Thesis submitted to division of physiology and climatology, Deemed University, IVRI, Izatnagar, 2007.

LANGHOUT, D.J.; SPICER, L.J.; GEISERT, R.D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. **Journal Animal Science**, v.69, p.3321, 1991.

LIU, H.C.; HE, Z.; ROSENWAKS, Z. In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. **Fertil Steril**, v.77, p.373-383, 2002.

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

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular, Reproduction and Development**, v.57, p.146-152, 2000.

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

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.41, p.61-69, 2001.

LUCY, M. C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1635-1647, 2000.

LUNA, H.S.; SILVA, V.B. ABREU, F.A. Viabilidade de folículos pré-antrais bovinos isolados de ovários após vitrificação. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.693–698, 2011.

LUSSIER, J.P.; LAMOTHE, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology**, v.43, p.270, 1995.

MACHADO, G.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados a partir de ovários de vacas zebuínas (*Bos taurus indicus*). **Veterinária Notícias**, v.12, p.11-16, 2006.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v.121, p.175–180, 2001.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M.F.; MCCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effects of culturemedium, serumtype, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biology Reproduction**, v.67, p.1197–203, 2002.

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

MARQUES, P.A.F. **Influência da Somatotropina Bovina Recombinante (rbST) aplicada em receptoras de embriões bovinos, no dia do estro, sobre variáveis reprodutivas**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, Dissertação de Mestrado, 67 p., 2006.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.; SARAIVA, M.V.; MATOS, M.H.; BRUNO, J.B.; ROCHA- JUNIOR, C.M.; LIMA-VERDE, I.B.; LUCCI, C.M.; BAO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in*

vitro and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.916–924, 2008.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.H.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C.M.G.; LIMA-VERDE, I.B.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v.43, p.728-736, 2010.

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

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

McGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v.21, p.200-14, 2000.

MORAES JUNIOR, F.J. **Efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) na resposta ovulatória e na qualidade dos embriões de vacas da raça Nelore**. Teresina, PI, Universidade Federal do Piauí, Dissertação de Mestrado, 54p., 2008.

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1-17, 1999.

MUNHOZ, AL.R.; LUNA, H.S. morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos ao estresse calórico *in vitro*. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.85-88, 2008.

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 Reproduction**, v.68, p.1682-1686, 2003.

PAVLOK, A.; KOUTECKA, L.; KREJCI, P.; SLAVIK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombination somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.183–192, 1995.

RAMOS, A.A.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; POLISSENI, J.; HENRY, M. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.380-386, 2007.

REYNOLDS, E. S. The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.17, p.208, 1963.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R. et al. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1398-1405, 2002.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Anatomical Bibliography**, v.24, p.77-92, 1983.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.

SANTOS, R.A.; TEIXEIRA, J.C.; ABREU, L.R. MUNIZ, J.A.; DERESZ, F. Efeito de diferentes doses de Somatotropina Bovina (rbst) na produção e composição do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.1435-1445, 2001.

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.206-221, 2010.

SAUMANDE, J. Oogênese et folliculogênese. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157, p.29-38, 1991.

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

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

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

SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.

SPICER, L. J. et al. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.573-58, 2005.

SUH, C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.3, p.5-12, 2002.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v.45, p.101-110, 1996.

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.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v.63, p.1717-51, 2005.

VASCONCELOS, L.V.; PEREIRA, D.F.C.; RODRIGUES, A.S.; CHALHOUB, M.; LOIOLA, M.V.G.; FERRAZ, P.A.; ANDRADE, B.H.A.; RIBEIRO FILHO, A.L. Resposta superovulatória e viabilidade de embriões de doadoras Nelore submetidas a pré-tratamento com Somatotropina Recombinante Bovina (rbST). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, p.1126-1136, 2011.

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, 1996.

WANG, J.; ROY, S.K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster, p. modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology Reproduction**, v.70, p.577–585, 2004.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysics and Biochemistry Citology**, v.4, p.475, 1958.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.1095-1104, 2007.