

SANELY LOURENÇO DA COSTA CALIMAN

EFEITO DA TIROXINA E DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE NO
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS OVINOS

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.

VOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

SANELY LOURENÇO DA COSTA CALIMAN

EFEITO DA TIROXINA E DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE NO
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS OVINOS

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: 22 de fevereiro de 2010

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

(Co-orientador)

Prof. José Domingos Guimarães

(Co-orientador)

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de
Paula

Prof. Cláudio José Borela Espeschit

Prof. Eduardo Paulino da Costa

(Orientador)

*Aos meus pais, Maria Divina da Costa
e José Lourenço da Costa,
Dedico.*

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará. Em verdes prados ele me faz repousar. Conduz-me junto às águas refrescantes, restaura as forças de minha alma. Pelos caminhos retos ele me leva, por amor do seu nome. Ainda que eu atravesse o vale escuro, nada temerei, pois estais comigo”.

Salmo 22 (Bíblia)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pela proteção que tem me concedido durante toda minha vida. Por me dar força e coragem para enfrentar as dificuldades da vida. Por ter iluminado meu caminho e me colocado sempre nos lugares certos com as pessoas certas. Por tudo que me dá e por tudo que me nega. Como se eu não fosse tão pequena me abençoa e me agracia todos os dias da minha vida. Muito obrigado DEUS.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Medicina Veterinária e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amados e queridos pais, Maria Divina da Costa e José Lourenço da Costa, pelo amor, educação, incentivo e apoio que têm me dado durante todo esse tempo. Pelos valores morais ensinados e por estarem sempre ao meu lado, acompanhando-me rumo a esta realização. É difícil expressar em palavras meu amor e gratidão por vocês!

Ao meu esposo sempre amado, Cidnei Caliman, pelo amor e carinho. Por estar sempre ao meu lado, se preocupando e cuidando muito de mim, me fazendo muito feliz. Por me amar, acima de tudo, e me fazer crer nesse amor cada dia mais. Agradeço todos os dias a DEUS por ter você ao meu lado.

Às minhas irmãs, Alessandra Lourenço da Costa e Andréa Giordana Lourenço da Costa e Favalessa, pelas orações, companheirismo, atenção e pelo estímulo positivo que sempre me deram. Ao meu cunhado Enoildo Favalessa, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus lindos sobrinhos Maria Luiza (minha flor de formosura) e Miguel (titico) pela alegria que proporcionam a mim e toda a nossa família. E que a cada dia nos mostram a simplicidade da vida através de simples sorrisos inocentes.

À minha sogra Izabel Pizzol Caliman e meu sogro Orlando Caliman pela confiança, apoio, amizade e amor a mim oferecido. Muito obrigada por me deixar fazer parte desta família.

Ao Professor Dr. Eduardo Paulino da Costa, pela orientação, pelos ensinamentos e acima de tudo, por ter acreditado em minha capacidade e potencial, para realização deste projeto.

Ao Professor Dr. Claudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados e por todas as suas valiosas idéias. Além da paciência e atenção disponibilizadas.

Ao Professor Dr. José Ricardo de Figueiredo pela oportunidade e confiança na execução deste projeto. A todos os colegas do LAMOFOPA, incluindo doutorandos, mestrandos, alunos de iniciação científica e técnicos, pela oportunidade de conhecê-los e compartilhar diferentes idéias e experiências de vida. É bastante interessante pensar que em alguma ocasião, seja realizando experimento ou redigindo artigo, tive a oportunidade de trabalhar diretamente com todos os doutorandos e mestrandos do laboratório. Obrigada pela agradável convivência e pelo aprendizado.

Aos membros da banca examinadora, os professores José Domingos Guimarães, Laércio dos Anjos Benjamin, Claudio José Borela Espescht, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula pela predisposição em analisar este trabalho e pelas sugestões recebidas.

Ao meu amigo Fabiano Gomes de Oliveira por ter me incentivado a fazer um curso superior. À minha querida amiga Luciana Fonseca por ter ido comigo nesta conquista em outra cidade, sempre ao meu lado. Ao meu amigo, que tenho como irmão, Hélio do Nascimento, que sempre tem uma palavra de incentivo e por sua capacidade de me fazer rir em todos os momentos, inclusive os difíceis.

À minha querida amiga Rosinéia (Rosi) que é um anjo em minha vida, sempre com os conselhos certos. Levo você em meu coração, com todo amor e carinho.

Aos meus amigos do Departamento de Veterinária, Gian, Emílio, Laércio, José de Oliveira, Káterin, Bruno, Polyana, Marcelo, Bruna, Paulo, Lucas, Erick, Divino, Sidney, Marli, Fábio, Juliana, Beth, Isabel, Geraldo. E aos amigos que fiz no Departamento de Zootecnia, Regina, Charles, Héder, Renata, Sérgio Barreto, Bjaude, Carlão, Tatiana, Eriane, Daniel, Carol, Raquel, Paola, Mel, Matheus, Venâncio, Juquinha, Muito obrigada!

Agradeço as minhas amigas de república, Raísa, Polliana, Eliciane, pelo carinho e atenção e por sempre me ensinarem coisas que eu não sabia, e isto fez a diferença para que eu pudesse seguir em diante.

Gostaria de agradecer a duas pessoas em especial: Valdevane, pelo amor, carinho, ensinamentos, proteção, e por compartilhar sua família comigo, que são pessoas maravilhosas, principalmente sua mãe Edith, e Isabel pela ajuda, paciência, atenção e por ter me acolhido em sua casa, me deixando desfrutar de sua família. Agradeço também a Anderson, Juliana, Giovanna, Alexandre Lima, Roberta, Anelise, Alison, Viviane, Laritza, Patrícia, Rebeca, Valesca, Beatriz, Robério, Jamily, Livia, Luciana, Fabrício, Hiédely, Diego, Michele, Rochele, Gerlane, Isadora, Débora, Janduí, Ivina, Márcio, Rafael Fernando, Érika, Cleidson, Simone, Liliane, por me auxiliarem na conclusão deste trabalho em Fortaleza.

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

BIOGRAFIA

SANELY LOURENÇO DA COSTA CALIMAN, filha de Maria Divina da Costa e José Lourenço da Costa, nasceu na cidade de Baixo Guandu, Espírito Santo, em 04 de Janeiro de 1974.

Em março de 2002, ingressou na Faculdade de Castelo, na cidade de Castelo, Espírito Santo, graduando-se no curso de Medicina Veterinária em dezembro de 2006.

Em março de 2008, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, o curso em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, tendo defendido a dissertação em 22 de fevereiro de 2010.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURA	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ovário dos mamíferos	3
2.2. Foliculogênese e características estruturais dos folículos ovarianos ..	3
2.3. População e atresia folicular	5
2.3.1. Atresia folicular pela via apoptótica	6
2.3.2. Atresia folicular pela via degenerativa	6
2.4. A biotécnica de MOIFOPA e suas aplicações	7
2.5. Importância da composição do meio no desenvolvimento de folículos pré-antrais <i>in vitro</i>	8
2.6. Hormônios tireoideanos.....	9
2.7. Hormônio folículo-estimulante (FSH).....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Coleta de ovários.....	15
3.2. Protocolo experimental.....	15
3.3. Análise morfológica	16

3.4. Análise estatística	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Sobrevivência folicular.....	18
4.2. Crescimento folicular e oocitário.....	21
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes meios de cultivo de folículos pré-antrais ovinos utilizando tiroxina e/ou FSH.....16

Tabela 2. Percentagens (Média $\pm$ DP) de folículos pré-antrais morfológicamente normais em tecido não-cultivado ou cultivado por 1 e 7 dias em α -MEM⁺ suplementado ou não com diferentes concentrações de tiroxina e/ou FSH.....19

Tabela 3. Diâmetro folicular e oocitário (Média $\pm$ DP) em tecido não-cultivado ou cultivado por 1 e 7 dias em α -MEM⁺ suplementado ou não com diferentes concentrações de tiroxina e/ou FSH.....21

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Secção histológica de tecido não-cultivado mostrando folículo normal (A) e degenerado (B) após coloração PAS-Hematoxilina (o: oócito; n: núcleo do oócito; CG: célula da granulosa) ($\Rightarrow$) retração citoplasmática; ($\Rightarrow$) desorganização das células da granulosa; ($\rightarrow$) núcleo picnótico, escala 10 μ m.....18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

BMP-15 - Proteína Morfogenética Óssea-15

BSA - Albumina Sérica Bovina

Ca²⁺ - Cálcio

CG - Células da Granulosa

CO₂ - Dióxido de Carbono

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DP – Desvio Padrão

eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

FIV – Fecundação *in vitro*

FOPA - Folículos Ovarianos Pré-Antrais

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

FSH β - Hormônio Folículo Estimulante Beta

rFSH - Hormônio Folículo Estimulante recombinante

GDF-9 - Fator de Crescimento e Diferenciação-9

h – Horas

HEPES - N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)

IAA – Ácido 3-indol acético

IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

ITS – Insulina+Transferrina+Selênio

KL - Kit Ligand

LH - Hormônio Luteinizante

α -MEM - Meio Essencial Mínimo – Alfa

α -MEM⁺ - Meio Essencial Mínimo suplementado

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mm³ - Milímetro Cúbico

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

Na⁺ - Sódio

n – Número

ng – Nanograma

NGF – Fator de Crescimento do Nervo

PAS - Ácido Periódico de Schiff

pH – Potencial Hidrogeniônico

RFSH – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante

T3 - Triiodotironina

T4 – Tiroxina ou Tetraiodotironina

TRH – Hormônio Liberador de Tireotropina

TSH – Hormônio Estimulante da Tireóide

μg - Micrograma

μm – Micrômetro

ZP - Zona Pelúcida

± - Mais ou menos

400X - Aumento de 400 vezes

RESUMO

CALIMAN, Sanely Lourenço da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Efeito da tiroxina e do hormônio folículo estimulante no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Co-orientadores: José Domingos Guimarães, Laércio dos Anjos Benjamin e Jeferson Ferreira da Fonseca.

O presente experimento foi desenvolvido a fim de se verificar o efeito da tiroxina na presença ou ausência do hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a sobrevivência e o crescimento de folículos pré-antrais de ovinos. Fragmentos de tecido ovariano foram cultivados por 1 e 7 dias em meio essencial mínimo (α -MEM+) suplementado ou não com diferentes concentrações de tiroxina (10, 20, 50 μ g/mL) na presença ou ausência de rFSH (50 ng/mL). O tecido ovariano não-cultivado (controle fresco) e os fragmentos cultivados no dia 1 e 7 nos diferentes tratamentos foram processados e analisados utilizando a técnica de histologia clássica. Quando os dias de cultivo foram comparados ao controle não-cultivado, somente no dia 1 foi verificado que os tratamentos contendo α -MEM⁺, FSH, T20 e T50 mostraram percentuais de sobrevivência folicular semelhantes ao controle. Quando os tratamentos foram comparados entre si dentro de cada período de cultivo, foi observado que apenas no dia 7, o tratamento contendo T50 apresentou um percentual de folículos normais superior ao tratamento T10F. Com relação ao diâmetro folicular, não houve crescimento dos folículos em cultivo, uma vez que todos os tratamentos comportaram-se de maneira semelhante ao controle não-cultivado e ao α -MEM⁺, exceto o tratamento T10. Ao se comparar os tratamentos, dentro de cada período de cultivo, foi observado que no dia 1 os tratamentos T50, T10F e T50F apresentaram diâmetro folicular superior quando comparados ao tratamento T10. Semelhante ao crescimento folicular também não houve crescimento oocitário. Para o diâmetro oocitário, no dia 1, foi verificada uma redução para os tratamentos T10 e T20F quando comparados ao não-cultivado. Já no dia 7 de cultivo os tratamentos FSH, T10F e T50F reduziram o diâmetro oocitário, com a progressão do cultivo do dia 1 para o dia 7 e ainda quando comparados ao controle não-cultivado e ao α -MEM⁺. Concluiu-se que altas concentrações de T4 (50 μ g/ml) proporcionaram resultados promissores no que diz respeito à sobrevivência e desenvolvimento folicular *in vitro*. Quanto

a associação da T4 com o FSH não demonstrou resultados positivos na sobrevivência e no desenvolvimento folicular *in vitro*. Embora seja conhecida a atuação da tiroxina na fisiologia ovariana são necessárias mais pesquisas que verifiquem sua importância para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

ABSTRACT

CALIMAN, Sanely Lourenço da Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Effects of thyroxine and follicle stimulating hormone on the *in vitro* development of ovine preantral follicles.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: José Domingos Guimarães, Laércio dos Anjos Benjamin and Jeferson Ferreira da Fonseca.

This experiment has been developed in order to verify the thyroxine effect in the presence or absence of follicle stimulating hormone (FSH) on survival and growth of sheep preantral follicles. Fragments of ovarian tissue were grown for 1 or 7 days in a situation with a minimum essential (α -MEM⁺) alone or containing thyroxine (10, 20, 50 μ g / mL) in the presence or absence of rFSH (50 ng / mL). The ovarian tissue non-grown (fresh control) and grown in different treatments were processed for analysis using the classical histology technique. When the days of culture were compared to the non-cultivated control, on the first day was found that the treatment with α -MEM⁺, FSH, T20 and T50 showed follicular survival percentages similar to control. When the treatments have been compared between each other within the growing season was identified that only on the 7th day, the treatment containing T50 presents a percentage of normal follicles significantly superior to the treatment with T10F. Related to the follicular diameter, the follicle in culture has not grown, since all treatments have had a similar behavior when controlling non-grown and α -MEM⁺, except the T10 treatment. When comparing the treatments within each growing season, it has been observed that on the first day, treatments T50, T10F and T50F have showed a follicular diameter greater when compared to T10 treatment. Similar to what happened to follicular growth, oocyte growth has not grown either. For oocyte diameter, on the first day, there was a reduction for T10 and T20F treatments when compared to non-grown. On the 7th day of grown, FSH, T10F and T50F treatments have reduced oocyte diameter, with a progression of culture from the first day to the 7th one and even when compared to control non-grown and α -MEM⁺. It was concluded that high T4 concentrations (50 g / ml) have provided promising about the survival and follicular development *in vitro*. The association of T4 with FSH, have not presented positive results in the survival and follicular development *in vitro*.

Although it is known the thyroxine action on ovarian physiology, there is a need to verify its importance for the in vitro development of preantral sheep follicles.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biotécnicas relacionadas à biologia reprodutiva têm sido extensivamente realizado nos últimos anos, visando um melhor aproveitamento do material genético de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Neste sentido, muitos esforços estão sendo empregados para o avanço da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA), que muito tem contribuído para um melhor entendimento da biologia ovariana e futuramente poderá contribuir para maximizar o aproveitamento do potencial oocitário.

A biotécnica de MOIFOPA pode ser considerada uma alternativa valiosa para a padronização de outras biotécnicas como clonagem, fecundação *in vitro* (FIV) e transgenia, uma vez que disponibilizará um grande número de oócitos, oriundos de um mesmo animal, além de reduzir substancialmente o intervalo entre gerações. Além disso, esta biotécnica também conhecida como Ovário Artificial, tem avançado significativamente no contexto da elucidação da foliculogênese ovariana (FIGUEIREDO et al., 2008).

Neste contexto, tendo em vista que o ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais e que poucos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório, a biotécnica de MOIFOPA objetiva recuperar, preservar e cultivar *in vitro* um maior número de folículos pré-antrais, visando sua ativação, crescimento e maturação, prevenindo-os da morte folicular ou atresia, que ocorre naturalmente *in vivo* (FIGUEIREDO et al., 2008). Desta forma, é necessária a obtenção de um sistema de cultivo que permita o desenvolvimento completo dos folículos, tornando-os aptos a uma posterior FIV com subsequente aquisição de crias saudáveis. Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da adição de inúmeras substâncias ao meio de cultivo que propiciem o desenvolvimento folicular, dentre estas substâncias pode-se destacar os hormônios folículo estimulante (FSH) (MATOS et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2009a) e tiroxina (T4) (DICKSON, 1996; ARUNAKUMARI et al., 2007).

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% de toda a população folicular, armazenando assim a grande maioria dos oócitos presentes em

ovários mamíferos. Entretanto, a maioria desses folículos sofre atresia, reduzindo significativamente o potencial reprodutivo das fêmeas.

Porém, ainda existem poucos relatos na literatura sobre a utilização da tiroxina, hormônio este importante para o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos, no cultivo *in situ* de folículos pré-antrais ovinos. Além disso, ainda não foi testada a interação da tiroxina com o FSH para o desenvolvimento de folículos pré-antrais nesta espécie, podendo resultar em efeitos benéficos sobre o desenvolvimento folicular, visto que o FSH já demonstrou bons resultados para o desenvolvimento de folículos pré-antrais de diferentes espécies e ainda, que a associação desses dois hormônios teve efeitos benéficos para folículos secundários isolados na espécie ovina.

Dentre as várias técnicas disponíveis para a avaliação morfológica de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro*, foi aplicado no presente trabalho a histologia clássica, que permite a observação de alterações como picnose nuclear, destacamento e desorganização das células da granulosa e vacuolização citoplasmática. Embora essa técnica identifique somente alterações morfológicas superficiais, é considerado de fácil execução, baixo custo, e revela os resultados de forma rápida, permitindo visualizar um grande número de folículos.

Objetivou-se com este trabalho, verificar o efeito da tiroxina associada ou não ao FSH sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovário dos mamíferos

O ovário dos mamíferos é um órgão composto por vários tipos celulares diferenciados, os quais atuam em conjunto promovendo um ambiente ideal para o seu perfeito funcionamento (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006). A gônada feminina desempenha uma função endócrina através da produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos, bem como uma função exócrina ou gametogênica, a qual possibilita a produção e liberação de oócitos (HAFEZ, 1996).

Nos ruminantes, este órgão é constituído pelas regiões parenquimatosa e vascular. Na região parenquimatosa estão presentes folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos. Já a região vascular é constituída por tecido conjuntivo, algumas células musculares lisas, nervos, artérias e veias, que se estendem para o parênquima ovariano, sendo responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ, 1996).

2.2. Foliculogênese e características estruturais dos folículos ovarianos

A foliculogênese é um evento iniciado na vida intra-uterina na maioria das espécies e pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

O folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional do ovário, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT & SMITZ, 2001), além de produzir um grande número de hormônios e peptídeos (ADASHI, 1994). É composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais) tendo sua morfologia alterada durante a foliculogênese, uma vez que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se multiplicam e diferenciam (BRISTOL-GOULD &

WOODRUFF, 2006), adquirindo capacidade esteroideogênica (HICKEY et al, 2005). O crescimento folicular ocorre continuamente durante a vida do animal ou pelo menos até a reserva se exaurir.

De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais (FOPA) (primordiais, primários e secundários) ou antrais (terciários e pré-ovulatórios) (HULSHOF et al., 1995). Os folículos primordiais são constituídos por um oócito quiescente, esférico ou oval, circundado por células da pré-granulosa de formato pavimentoso (FORTUNE et al., 1998). O núcleo do oócito é relativamente grande e ocupa uma posição central ou excêntrica, podendo ter o nucléolo evidente. A zona pelúcida (ZP) neste estágio ainda não é totalmente observada, verificando-se uma justaposição entre oócito e células da granulosa, sem nenhuma junção específica (LUCCI et al., 2001). No entanto, na espécie humana, Gook et al. (2008), verificaram proteínas da ZP em folículos desde o estágio primordial, sugerindo que estas proteínas estão presentes desde o início da foliculogênese. Tais folículos permanecem quiescentes até serem ativados, momento no qual entram para o grupo de folículos em crescimento (primários, secundários e terciários) (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; PEPE et al., 2006). O processo de ativação é caracterizado pela retomada da proliferação das células da granulosa, mudança da morfologia dessas células de pavimentosa para cúbica e aumento considerável dos volumes citoplasmáticos e nuclear no oócito (VAN DEN HURK et al., 1997).

Os folículos primários são formados por um oócito circundado por uma única camada completa de células da granulosa de formato cúbico. A partir desse estágio, o oócito e as células da granulosa passam a manter um estreito contato, mediado por endocitose. A membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes surgindo na superfície oocitária algumas microvilosidades (LUCCI et al., 2001), momento em que se inicia a formação da ZP (RANKIN et al., 2001). Com a intensa multiplicação das células da granulosa, ocorre a formação de novas camadas destas células em torno do oócito, dando origem aos folículos secundários. Conforme estes folículos se desenvolvem, também aumenta o número de microvilos (LUCCI et al., 2001) e se evidencia a formação das células da teca externa a partir do estroma intersticial (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados antrais. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão relacionados com o aumento do folículo antral. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pela continuidade da fase de crescimento, seguindo o recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como para manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006).

2.3. População e atresia folicular

Os folículos ovarianos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e constituem o estoque definitivo dos gametas durante a vida reprodutiva da fêmea (LIU et al., 2001). Recentemente, alguns trabalhos têm evidenciado a formação de novas células germinativas em mulheres (BUKOVSKY et al., 2004) e camundongas adultas (JOHNSON et al., 2005). Independente disso, a população folicular difere de acordo com a espécie, podendo ser observada também uma forte variação individual (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), sendo esta população estimada em aproximadamente 1.500 em camundongas (SHAW et al., 2000), 33.000 em ovelhas (AMORIM et al., 2000), 35.000 em cabras (LUCCI et al., 1999), 235.000 em vacas (BETTERIDGE et al., 1989) e 2.000.000 em mulheres (ERICKSON, 1986).

Apesar da grande população folicular presente no ovário dos mamíferos, a maioria dos folículos, ou seja, 99,9% não chegam à ovulação, pois são eliminados por um processo fisiológico denominado atresia (CARROL et al., 1990; MAYER et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008). Este fenômeno pode ocorrer por via apoptótica e/ou degenerativa (MIKKELSEN et al., 2001), quando o ambiente parácrino ou endócrino não é apropriado para suportar o crescimento folicular e/ou diferenciação das células da granulosa (SILVA et al.,

2004b). A atresia é um fenômeno natural que leva à exaustão do *pool* de folículos pré-antrais (MORITA & TILLY, 1999) e é comum a todas as espécies domésticas, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (GLAMOCLIJIA et al., 2005), especialmente na fase antral terminal. Nos estádios iniciais da foliculogênese, a atresia é iniciada no oócito e em seguida acomete as células da granulosa (MORITA & TILLY, 1999), verificando-se o processo inverso nos folículos antrais (GLAMOCLIJIA et al., 2005).

2.3.1. Atresia folicular pela via apoptótica

A apoptose é um processo fisiologicamente importante para o desenvolvimento embrionário normal, bem como para a homeostase no tecido adulto (AMSTERDAN et al., 2003). Sabe-se que este é um evento geneticamente determinado, ou seja, depende do equilíbrio entre a expressão de genes pró e anti-apoptóticos (DEPALO et al., 2003), sendo observada nos folículos ovarianos durante toda a vida fetal e adulta.

Uma característica marcante da apoptose é a ativação de nucleases endógenas que quebram o DNA a cada 180-200 pares de bases (YU et al., 2005). No ovário, uma alta taxa de apoptose folicular ocorre durante a vida reprodutiva, porém, pouco se sabe a respeito da perda de folículos primordiais nas espécies mamíferas. No entanto, a morte desses folículos pode ser um evento significativo na determinação do potencial reprodutivo da fêmea (DEPALO et al., 2003).

2.3.2. Atresia folicular pela via degenerativa

Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática, e conseqüente morte celular (BARROS et al., 2001).

Jennings et al. (1975) demonstraram que uma sobrecarga de íons Na^+ e acúmulo de íons Ca^{2+} com concomitante mudança na permeabilidade da membrana celular, os quais estão associados com modificações no volume e

aumento na água intracelular, podem participar e levar ao processo necrótico. Além da isquemia, outros fatores que podem levar à degeneração são estímulos tóxicos, degenerativos e imunológicos, podendo tais fatores também induzir à apoptose (JOHNSON, 2003)

2.4. A biotécnica de MOIFOPA e suas aplicações

A biotécnica de MOIFOPA, também conhecida como “Ovário Artificial” é de grande importância tanto para a pesquisa fundamental como para a reprodução animal. No tocante à pesquisa fundamental, esta biotécnica poderá contribuir para elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese pré-antral. Neste caso, os folículos pré-antrais *in situ* ou isolados do ambiente ovariano poderão ser cultivados *in vitro* na presença de diferentes substâncias (hormônios, fatores de crescimento, antioxidantes etc), cujo efeito individual ou associado poderá ser avaliado e controlado em diversos experimentos. Com relação à reprodução animal, a MOIFOPA poderá, no futuro, permitir o isolamento de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação, contribuindo assim para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico, além de reduzir a utilização de animais vivos em experimentos e testes de laboratório (FIGUEIREDO et al., 2008).

É indiscutível que grandes progressos já tenham sido observados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais, uma vez que a ativação de folículos primordiais caprinos (BRUNO et al., 2008; LIMA-VERDE et al., 2009a), ovinos (ANDRADE et al., 2005; COSTA et al., 2009), bovinos (WANDJI et al., 1996; BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997) e babuínos (FORTUNE et al., 1998) foi alcançada com êxito após cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano. Além disso, o cultivo de tecido também foi favorável ao desenvolvimento folicular, uma vez que Martins et al. (2008) obtiveram aumento significativo no número de folículos secundários após cultivo de sete dias com adição do Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9).

No tocante ao desenvolvimento de folículos primários e secundários isolados, em algumas espécies como felinos (JEWGENOW & STOLTE, 1996)

e marsupiais (BUTCHER & ULLMAN, 1996) foi observado o crescimento folicular após o cultivo *in vitro*, porém, sem a formação de antro. Em felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993), a adição de FSH ao meio de cultivo estimulou o crescimento folicular, enquanto a adição do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e de ITS (Insulina + Transferrina + Selênio) ao meio permitiu a manutenção da integridade dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (JEWGENOW & GORITZ, 1995). Nas espécies ovina (CECCONI et al., 1999; ARUNAKUMARI et al., 2007), bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000) e caprina (HUAMIN & YONG, 2000) folículos secundários isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. Além disso, Silva et al. (2010) observaram que oócitos caprinos provenientes de folículos secundários cultivados, retomaram à meiose após maturação *in vitro*. Em bubalinos, Gupta et al. (2008) obtiveram embriões em estágio de blastocisto, a partir do cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados. O desenvolvimento de folículos antrais a partir de folículos primários ou secundários foi igualmente relatado em humanos (ROY & TREACY, 1993). Em suínos, folículos secundários cultivados *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO et al., 1994), com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (WU et al., 2001).

Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais citados anteriormente, os resultados mais satisfatórios foram observados em animais de laboratório, nos quais O'Brien et al. (2003) obtiveram o nascimento de crias saudáveis a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*. Desta forma, para que melhores resultados sejam alcançados nas espécies domésticas, faz-se necessário o desenvolvimento de um meio de cultivo *in vitro* capaz de promover o completo desenvolvimento folicular.

2.5. Importância da composição do meio no desenvolvimento de folículos pré-antrais *in vitro*

O cultivo folicular é realizado, geralmente, em meios comerciais que são compostos basicamente de vitaminas, aminoácidos, fonte energética e protéica de modo a atender as necessidades fisiológicas das células. No entanto, para

mimetizar as condições foliculares no ovário, são acrescentadas aos meios de cultivo comerciais, diferentes substâncias como fatores de crescimento e hormônios, que atuam estimulando o desenvolvimento folicular. Dentre estas substâncias podemos citar o GDF-9 (MARTINS et al., 2008), ácido 3-indol acético (IAA) (ANDRADE et al., 2005), EGF (CELESTINO et al., 2009), FSH (MATOS et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2009b) e estradiol (LIMA-VERDE et al., 2009c).

Estudos descreveram que a sobrevivência *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina (FIGUEIREDO et al., 1995). Foi demonstrado também que, em caprinos, a adição de uma mistura de piruvato, glutamina e hipoxantina ao meio de cultivo de base (Meio Essencial Mínimo – MEM) aumentou significativamente a percentagem de folículos morfológicamente normais (SILVA et al., 2004a). Jewgenow et al. (1998) também demonstraram que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao MEM é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*.

Diante dos estudos realizados, admite-se que o estabelecimento de um meio de cultivo ideal seja de fundamental importância para a ativação folicular *in vitro*, permitindo o desenvolvimento e contribuindo para uma melhor compreensão dos diversos mecanismos e fatores envolvidos nos processos de foliculogênese e atresia (FIGUEIREDO et al., 2008). Por este motivo, a procura por protocolos que garantam o desenvolvimento folicular *in vitro*, tem aumentado. Assim, inúmeros trabalhos têm sido realizados em diferentes espécies, onde diferentes substâncias (hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes) têm sido incorporadas ao meio de cultivo visando verificar seus efeitos sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (MARTINS et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009a; LIMA-VERDE et al., 2009a).

2.6. Hormônios tireoideanos

A tiroxina (T4), também chamada de tetraiodotironina, forma juntamente com a triiodotironina (T3) os hormônios tireoidianos. A formação de T4 ocorre a partir de duas moléculas de diiodotirosina (aminoácido de tirosina com dois átomos de iodo quimicamente ligados). Desta forma, as moléculas de T4

recebem este nome por possuírem quatro átomos de iodo, enquanto a T3 é uma versão da T4 com três átomos de iodo (PURVES et al., 2006). Estes hormônios têm ganhado destaque por sua grande influência no desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular (NUNES, 2003). Além disso, os hormônios tireoidianos participam da formação e degradação de vários hormônios e fatores de crescimento, como o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (NUNES, 2003).

A síntese dos hormônios tireoidianos ocorre quando o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), no hipotálamo, é liberado estimulando a hipófise a liberar o hormônio estimulante da tireóide (TSH). O TSH, por sua vez, se liga a um receptor na membrana da célula tireoidiana ativando a adenilciclase que desencadeará as etapas de biossíntese de T3 e T4 na glândula tireóide (ALMEIDA, 2004). A secreção do T4 ocorre a partir da iodação do aminoácido tirosina nas células foliculares tireoidianas. O iodo se fixa à tirosina, ocorrendo aumento na proteólise da tireoglobulina, ou seja, da grande molécula que a tirosina faz parte e que se encontra armazenada nas células foliculares tireoidianas, sendo T3 e T4 posteriormente liberados na circulação sanguínea (ALMEIDA, 2004). Entretanto, a maior parte da formação de T3 ocorre nos tecidos periféricos, por meio da desiodação de T4 promovida pelas desiodases (YEN, 2001). A T4 em relação à T3 apresenta menor atividade biológica, sendo de extrema importância a T3 estar em níveis adequados no organismo, de maneira a manter todas as funções e, conseqüentemente, a qualidade de vida (LOPES, 2002; NUNES, 2003). Esta síntese e a posterior liberação ou secreção de T3 e T4 são reguladas por processos do tipo *feedback* negativo (YEN, 2001), capazes de manter constante a síntese, o armazenamento e os níveis dos hormônios no sangue.

Vários fatores estão sob a influência direta ou indireta dos hormônios tireoideanos, uma vez que a utilização da tiroxina afeta a responsividade dos ovários a este hormônio, como observado no estudo conduzido em ratas por Serakides et al. (2001). Desta forma, quaisquer disfunções tireoidianas podem provocar falhas no desempenho reprodutivo das fêmeas, alterando a ciclicidade e, ainda, prolongando ou encurtando as fases do ciclo estral (MATTHEIJ et al., 1995). Em mulheres, o hipertireoidismo, por exemplo, pode

provocar redução nas taxas de fertilidade (KOUTRAS, 1997), exceto na sua forma branda ou moderada, onde poderá haver ovulação e gestação normal (LARSEN & INGBAR, 1998).

Apesar de já ter sido comprovada a influência dos hormônios tireoidianos na foliculogênese de ratas por meio da diferenciação das células da granulosa e estimulação da ovulação, o mecanismo pelo qual as disfunções tireoidianas alteram a função ovariana ainda não foi elucidado (DIJKSTRA et al.; 1996; MARUO et al.; 1992a).

Em um estudo realizado em camundongas com hipotireoidismo por Jiang et al. (2000), foi observado que o tratamento com tiroxina aumentou significativamente o peso corporal e a massa ovariana destas fêmeas, porém, não foi capaz de aumentar a concentração de estradiol. Entretanto, quando combinados os tratamentos de tiroxina com gonadotrofina coriônica equina (eCG), houve aumento significativo tanto da massa ovariana, quanto da concentração plasmática de estradiol nestes animais, promovendo assim maiores benefícios à foliculogênese na presença de eCG. Contudo, apesar do tratamento com tiroxina em ratas com hipotireoidismo não ter prejudicado a foliculogênese e ter aumentado a secreção de estradiol, notou-se que a falha da onda pré-ovulatória de LH não foi revertida pelo tratamento com tiroxina mesmo na presença de eCG.

Serakides et al. (2001) verificaram que ratas tratadas com T4 livre apresentaram manutenção da viabilidade folicular. Neste caso, esta manutenção pode ser explicada pela atividade metabólica dos hormônios da tireóide que, quando presentes em grandes quantidades (hipertireoidismo), são capazes de aumentar a produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, podendo levar a danos oxidativos nos tecidos-alvo (VENDITTI & DIMEO, 2006). Por outro lado, nota-se que o crescimento folicular é estimulado pelo hipertireoidismo, possivelmente pelos efeitos dos hormônios tireoideanos que atuam na diferenciação das células foliculares como descrito por Dijkstra et al. (1996) e Serakides et al. (2001). Além desses achados, Serakides et al. (2001) observaram uma correlação positiva entre os folículos primários e as concentrações plasmáticas de T4, comprovando desta maneira que há participação eficaz dos hormônios tireoideanos no desenvolvimento dos folículos primordiais, com consequente formação de folículos primários. Desta

forma, a participação dos hormônios da tireóide para o recrutamento de folículos primordiais não deve ser descartada.

Algumas pesquisas realizadas *in vitro*, mostraram que a tiroxina sozinha não estimula a diferenciação das células da granulosa (MARUO et al., 1992b) bem como a esteroidogênese (GREGORASZCZUK & SKALKA, 1996), sendo indispensável sua associação com o FSH. Nestes estudos, quando associados os hormônios da tireóide com o FSH, estes atuam em sinergismo e causam um aumento da função esteroidogênica. Entretanto, a presença de receptores de T3 nas células da granulosa de humanos (WAKIM et al., 1993; WAKIN et al., 1996) e suínos (WAKIN et al., 1987), e o desenvolvimento destas células *in vitro* em resposta à T3 (GOLDMAN et al., 1993), sugere uma ação direta desse hormônio sobre a função ovariana. Fitko & Szlezyngier, (1994) observaram que em ovários de ratas com hipertireoidismo, a hiperfunção tireoidiana induz a menor responsividade do ovário às gonadotrofinas, devido à redução dos receptores para FSH e LH, apresentando assim resultados contraditórios aos obtidos *in vitro*. Além disso, em ovinos, recentemente Arunakumari et al. (2007) verificaram que a adição de tiroxina isoladamente ou em associação com FSH no meio de cultivo de folículos secundários aumenta as taxas de crescimento, formação de antro, bem como, maturação oocitária.

2.7. Hormônio folículo-estimulante (FSH)

O hormônio gonadotrófico FSH é uma glicoproteína heterodimérica produzida na adenohipófise e que, em fêmeas, age exclusivamente no folículo ovariano. A ação do FSH ocorre diretamente nas células somáticas ovarianas por meio de receptores específicos (RFSH) presentes na superfície dessas células. Os receptores para o FSH se expressam nas células da granulosa (ULLOA-AGUIRRE et al., 1995; O'SHAUGHNESSY et al., 1996) a partir do estágio de folículos primários (OKTAY et al., 1997). Apesar dos receptores de FSH não estarem presentes em folículos primordiais, parece que esta gonadotrofina exerce um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Alguns estudos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de

crescimento, tais como kit ligand (KL), GDF-9 e proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), que têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (JOYCE et al., 1999, THOMAS et al., 2005).

O FSH parece estar envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (VAN DEN HURK et al., 1997). Existem hipóteses de que o número de folículos primordiais que deixa o *pool* de folículos quiescentes é predeterminado, e que o FSH age sobre o processo de ativação folicular (MATOS et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2009b). A ligação do FSH é restrita às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação e diferenciação destas células e a síntese de esteróides (DEMEESTERE et al., 2005). O FSH também regula a conexão transzonal entre o oócito e as células da granulosa (ALBERTINI et al., 2001).

Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o FSH pode promover o desenvolvimento de folículos pré-antrais e a formação de antro (camundongas: SPEARS et al., 1998; ratas: McGEE et al., 1997; mulheres: WRIGHT et al., 1999; vacas: GUTIERREZ et al., 2000; cabras: MATOS et al., 2007a; ZHOU & ZHANG, 2005; ovelhas: CECCONI et al., 1999; porcas: MAO et al., 2002). Além disso, o FSH inibe a apoptose em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (mulheres: ROY & TREACY, 1993; camundongos: BAKER & SPEARS, 1997; ratas: McGEE et al., 1997). Em caprinos, a adição de 50 ng/mL de FSH ao meio de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano foi responsável pela manutenção da integridade ultra-estrutural dos folículos e pelo aumento do diâmetro oocitário (MATOS et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2009b). Por outro lado, Nuttinck et al. (1996) cultivaram pequenos folículos pré-antrais bovinos por sete dias e observaram que o FSH aumentou a degeneração oocitária. Além disso, estudos têm mostrado que os folículos pré-antrais conseguem se desenvolver, independentemente da ação do FSH. Este fato foi observado em camundongas com deficiência nos genes FSH β e RFSH (KUMAR et al., 1997; DIETRICH et al., 1998) e também em pacientes com mutações que suprimiam a função do receptor para FSH (BEAU et al., 1998; TOURAINE et al., 1999). Os resultados contraditórios podem estar relacionados às diferenças entre espécies, metodologias e meios de cultivo *in*

vitro (por exemplo, substâncias adicionadas ao meio de cultivo e concentrações de FSH utilizadas nos experimentos).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de ovários

A pesquisa foi desenvolvida no período de Outubro de 2008 à Novembro de 2009 no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA), localizado na Universidade Estadual do Ceará (UECE). Foram utilizados 12 ovários provenientes de 6 ovelhas adultas (1 a 3 anos de idade) sem padrão racial definido, coletado do abatedouro multicarnes em fortaleza. Imediatamente após o abate dos animais, os ovários foram lavados em álcool 70% por 10 segundos e em seguida foram realizadas duas lavagens em Meio Essencial Mínimo (MEM) tamponado com *N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES) suplementado com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomomicina. Os ovários foram transportados ao laboratório no prazo máximo de 1 h em MEM a 4 °C (CHAVES et al., 2008).

3.2. Protocolo experimental

O sistema de cultivo utilizado neste trabalho foi descrito anteriormente por MATOS et al. (2007b). Ao chegar ao laboratório, os ovários de cada animal, eram imediatamente submetidos a um processo denominado fragmentação, utilizando lâminas de bisturi e pinças em condições estéreis. Este processo de fragmentação é realizado através de cortes mais superficiais possíveis de toda a região parenquimatosa onde se encontram a maioria dos folículos em todos os estádios de desenvolvimento. As amostras de tecido ovariano foram em seguida divididas em 17 fragmentos (9 mm³). Um desses fragmentos era tomado aleatoriamente e imediatamente fixado (pinça estéril) para análise histológica (controle fresco) e os demais fragmentos eram cultivados *in vitro* por 1 e 7 dias em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultivo em cada poço. O cultivo *in vitro* foi realizado a 39 °C e 5% de CO₂ em incubadora umidificada. O meio de cultivo base (meio controle) consistiu em α-MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com ITS (10 µg/mL de insulina, 5,5 µg/mL de transferrina e 5 ng/mL de selênio), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 1,25 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina), denominado α-MEM⁺. Para as

condições experimentais testadas neste trabalho, o α -MEM⁺ foi suplementado com tiroxina (T4), nas concentrações de 10, 20 e 50 μ g/mL, FSH recombinante na concentração de 50 ng/mL, ou as combinações das concentrações de tiroxina e FSH (Tabela 1). Cada tratamento foi repetido 6 vezes e o meio de cultivo foi totalmente substituído a cada dois dias. As concentrações de tiroxina e FSH utilizadas neste estudo foram escolhidas baseadas em estudos prévios (THOMAS et al., 2001; ARUNAKUMARI et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009a). Todos os reagentes mencionados foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA), com exceção do FSH recombinante bovino (rFSH[®]) que foi obtido da Nanocore, Brasil.

Tabela 1. Diferentes meios de cultivo de folículos pré-antrais ovinos utilizando tiroxina e/ou FSH

Meio de Cultivo	Abreviação
α -MEM ⁺	α -MEM ⁺
α -MEM ⁺ + rFSH (50 ng/mL)	rFSH
α -MEM ⁺ + Tiroxina (10 μ g/mL)	T10
α -MEM ⁺ + Tiroxina (10 μ g/mL) + FSH	T10F
α -MEM ⁺ + Tiroxina (20 μ g/mL)	T20
α -MEM ⁺ + Tiroxina (20 μ g/mL) + FSH	T20F
α -MEM ⁺ + Tiroxina (50 μ g/mL)	T50
α -MEM ⁺ + Tiroxina (50 μ g/mL) + FSH	T50F

3.3. Análise morfológica

Antes do cultivo (controle fresco) e depois de 1 ou 7 dias, todos os fragmentos foram fixados em solução de Carnoy por 4 h, e então desidratados em concentrações crescentes de etanol e diafanizados em xilol. Posteriormente, foram embebidos em parafina (Synth, São Paulo, Brasil) e cortados em secções de 5 μ m, as quais foram montadas em lâminas de vidro e coradas com Ácido Periódico de Schiff – Hematoxilina (PAS-Hematoxilina). O estágio e a sobrevivência folicular foram analisados sob microscopia ótica (Nikon, Japão) com aumento de 400X.

Com relação à sobrevivência, os folículos foram classificados como histologicamente normais (oócito intacto circundado por células da granulosa bem organizadas em uma ou mais camadas e sem núcleo picnótico) ou degenerados (presença de retração oocitária, núcleo picnótico e/ou células da granulosa desorganizadas) (SILVA et al., 2004a). De cada tratamento foram avaliados 180 folículos (30 folículos por tratamento para cada repetição).

Para avaliar o diâmetro folicular, foi feita uma mensuração com o auxílio de uma ocular micrométrica, a distância entre uma extremidade da camada de células da granulosa à outra. O diâmetro oocitário foi mensurado pela distância de uma extremidade da membrana do oócito à outra. Duas mensurações perpendiculares foram realizadas para cada diâmetro e a média desses dois valores foi relatada como sendo o diâmetro folicular e oocitário (MATOS et al., 2007a,b). Vale ressaltar que cada folículo foi contado uma única vez.

3.4. Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para confirmação da distribuição normal e homocedasticidade, respectivamente. Confirmadas as exigências para realização da Análise de Variância, esta foi executada por meio do Procedimento GLM do Programa SAS (1999) e o teste de Dunnett foi utilizado para comparação entre as médias dos tratamentos experimentais e cada um dos grupos controle (não cultivado e α -MEM⁺). O teste de Student-Newman-Keels (SNK) foi aplicado para as comparações de médias entre os tratamentos com Tiroxina em diferentes concentrações, combinada ou não com FSH, dias de cultivo e diâmetros dos folículos e oócitos. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Frente à importância comprovada da tiroxina (T4) no desenvolvimento dos folículos pré-antrais, o presente trabalho avaliou a influência da tiroxina, associada ou não ao hormônio folículo-estimulante (FSH), na sobrevivência e no crescimento de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in vitro*.

4.1. Sobrevivência folicular

Neste trabalho, um total de 3.060 folículos pré-antrais foram analisados. Na análise morfológica por meio de histologia clássica (Tabela 2) foi possível observar a presença de folículos normais e degenerados (Fig.1) em todos os tratamentos (controle não-cultivado e após 1 ou 7 dias de cultivo). Os folículos degenerados (fig.1B) foram evidenciados e caracterizados pela presença de áreas de retração citoplasmática, picnose nuclear e desorganização das células da granulosa (SILVA et al., 2002).

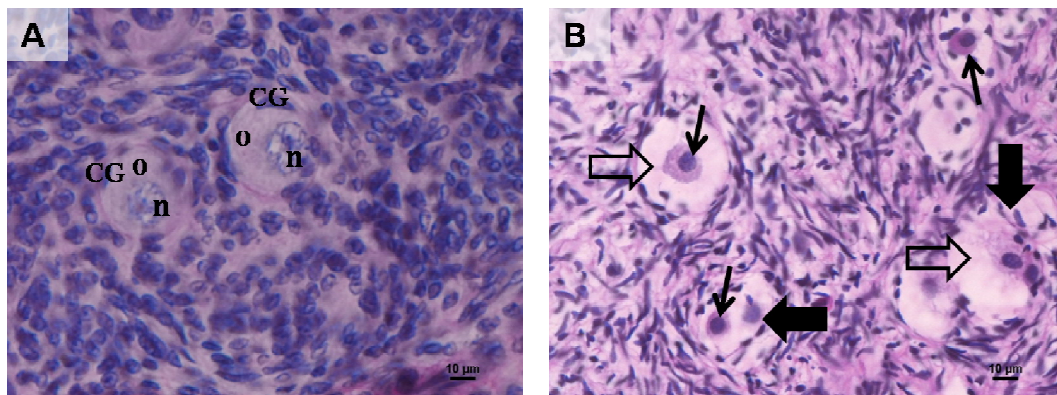


Figura 1. Secção histológica de tecido não-cultivado de folículo normal (A) e degenerado (B) após coloração PAS-Hematoxilina (o: oócito; n: núcleo do oócito; CG: célula da granulosa) (⇨) retração citoplasmática; (➡) desorganização das células da granulosa; (→) núcleo picnótico, escala 10 µm.

Tabela 2. Percentagens (Média±DP) de folículos pré-antrais morfologicamente normais em tecido não-cultivado ou cultivado por 1 e 7 dias em α -MEM⁺ suplementado ou não com diferentes concentrações de tiroxina e/ou FSH

Controle	87,22 ± 6,11	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7
α -MEM ⁺	73,33 ± 24,04 ^{a,A}	30,55 ± 24,80 ^{*,ab,B}
FSH	56,67 ± 33,79 ^{a,A}	44,44 ± 15,30 ^{*,ab,A}
T10	45,56 ± 35,38 ^{*,a,A}	31,11 ± 15,59 ^{*,ab,A}
T20	60,55 ± 31,93 ^{a,A}	43,89 ± 18,31 ^{*,ab,A}
T50	52,22 ± 32,71 ^{a,A}	49,44 ± 9,05 ^{*,a,A}
T10F	50,00 ± 27,33 ^{*,a,A}	23,89 ± 9,98 ^{*,b,A}
T20F	44,44 ± 28,26 ^{*,a,A}	27,99 ± 10,25 ^{*,ab,A}
T50F	46,67 ± 20,00 ^{*,a,A}	33,33 ± 16,87 ^{*,ab,A}

* difere em relação ao controle não-cultivado (P<0,05)

(a,b) letras diferentes na mesma coluna demonstram diferenças entre os tratamentos no mesmo período de cultivo (P<0.05)

(A,B) letras diferentes na mesma linha demonstram diferenças entre os períodos de cultivo em um mesmo tratamento (P<0.05)

Quando comparados os diferentes dias de cultivo (1 e 7) com o controle não-cultivado, foi verificado que apenas os tratamentos α -MEM⁺, FSH, T20 e T50 mostraram percentuais de sobrevivência folicular semelhantes ao controle, no dia 1 de cultivo. Os demais tratamentos reduziram o percentual de folículos normais em ambos os períodos de cultivo. Estes resultados apontam que 10 μ g/mL de T4 (T10) pode não ter sido suficiente para manter a sobrevivência folicular. Tais resultados corroboram com os observados por DIJKSTRA et al. (1996), JIANG et al. (2000) e SILVA et al. (2004c) em que baixos níveis de T4 podem afetar negativamente a foliculogênese levando a um maior número de folículos atresícos.

A ineficiência dos resultados em associação com o FSH observada no presente estudo confronta os resultados de ARUNAKUMARI et al. (2007). Neste caso, os autores observaram que para o cultivo, por 6 dias, de folículos pré-antrais ovinos isolados, a tiroxina associada ao FSH foi fundamental para o desenvolvimento desses folículos e aquisição de oócitos meioticamente competentes. Os resultados obtidos neste estudo ainda divergem de alguns estudos onde se demonstrou que o FSH possui importante participação na manutenção da sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos (YU et al. 2003;

MATOS et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2009b), ovinos (ANDRADE et al., 2005) murinos (CORTVRINDT et al., 1997; CECCONI et al. 2004) e bubalinos (GUPTA et al. 2008). Entretanto, no presente estudo, o FSH não foi capaz de manter a sobrevivência folicular após 7 dias de cultivo, quando comparado ao controle não-cultivado. Resultados semelhantes foram observados por SARAIVA et al. (2008) e LIMA-VERDE et al. (2009b), sendo este fato possivelmente ocasionado por algum fator que possa alterar a constituição bioquímica do meio de cultivo. Uma das hipóteses é que haja liberação de produtos da secreção folicular que interrompa o desenvolvimento folicular. Para se detectar se essa secreção é prejudicial para o cultivo se faz necessário a utilização de análises das concentrações de RNAm indicando a expressão gênica ou imunohistoquímica com o uso de anticorpos para proteínas específicas (HARTSHORNE, 1997).

Quando os tratamentos foram comparados entre si dentro de cada período de cultivo (dia 1 e 7), foi observada diferença significativa apenas no dia 7, onde o tratamento T50 apresentou um percentual de folículos normais superior ($P < 0,05$) ao tratamento T10F. Este fato está associado às baixas concentrações de T4 associadas ao FSH utilizadas neste experimento, contrariando o descrito por Arunakumari et al. (2007) que observaram que a associação do FSH com o hormônio da tireóide suporta melhor o crescimento, promove o desenvolvimento de antro, e ainda, a subsequente maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais. Outra condição que pode explicar tais resultados está no tratamento T50 em que altas concentrações de T4, podem evidenciar efeitos deste hormônio no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Semelhante ao observado em nosso trabalho, Serakides et al. (2001) verificaram que altos níveis de T4 estimulam a foliculogênese ovariana e diminuem a atresia folicular em ratas sexualmente maduras.

A avaliação da progressão do cultivo do dia 1 para o dia 7 apontou que todos os tratamentos testados foram capazes de manter a sobrevivência folicular, exceto o tratamento α -MEM⁺. Este resultado aponta que, nesta situação, o meio não foi capaz de fornecer um ambiente adequado para o desenvolvimento de folículos pré-antrais ovinos, discordando dos resultados obtidos por outros autores que utilizaram uma composição semelhante do MEM e comprovaram sua eficiência em ovinos (ANDRADE et al., 2005) e caprinos

(BRUNO et al., 2009a, CELESTINO et al., 2009 e LIMA-VERDE et al., 2009b). Esta divergência pode apontar que fatores como: mudanças de temperatura de transporte e manipulação dos ovários, bem como o pH e osmolaridade durante o cultivo *in vitro* e/ou trocas de meio além de outros fatores podem ter interferido na qualidade do cultivo. Além disso, ao longo do período de cultivo ocorre a variação na quantidade de receptores para a T4 e FSH nos oócitos, e nas células da granulosa e do *cumulus* (ZHANG et al., 1997). Entretanto, os mecanismos que desencadeiam essas diferenças ainda devem ser investigados.

4.2. Crescimento folicular e oocitário

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados referentes ao crescimento de folículos e oócitos em todos os tratamentos testados neste trabalho.

Tabela 3. Diâmetro folicular e oocitário (Média $\pm$ DP) em tecido não-cultivado ou cultivado por 1 e 7 dias em α -MEM⁺ suplementado ou não com diferentes concentrações de tiroxina e/ou FSH

	Diâmetro folicular (μ m)		Diâmetro oocitário (μ m)	
Controle	28.7 $\pm$ 4.6		21.5 $\pm$ 4.2	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
α -MEM ⁺	29.3 $\pm$ 7.6 ^A	28.1 $\pm$ 8.6 ^A	19.7 $\pm$ 4.2 ^A	18.1 $\pm$ 4.2 ^A
FSH	26.7 $\pm$ 6.1 ^{ab,A}	22.0 $\pm$ 4.4 ^{b,B}	18.5 $\pm$ 4.0 ^{ab,A}	15.3 $\pm$ 2.3 ^{*,†,c,B}
T10	23.6 $\pm$ 2.1 ^{*,†,b,B}	26.6 $\pm$ 4.7 ^{a,A}	17.4 $\pm$ 2.0 ^{*,b,A}	18.6 $\pm$ 4.6 ^{ab,A}
T20	26.1 $\pm$ 3.8 ^{ab,A}	26.1 $\pm$ 3.6 ^{a,A}	18.6 $\pm$ 3.2 ^{ab,A}	19.4 $\pm$ 3.0 ^{ab,A}
T50	28.8 $\pm$ 5.7 ^{a,A}	26.2 $\pm$ 5.0 ^{a,A}	19.7 $\pm$ 4.1 ^{ab,A}	19.0 $\pm$ 3.8 ^{ab,A}
T10F	30.2 $\pm$ 9.0 ^{a,A}	23.0 $\pm$ 4.7 ^{ab,B}	20.7 $\pm$ 6.3 ^{ab,A}	15.7 $\pm$ 3.0 ^{*,†,c,B}
T20F	26.2 $\pm$ 5.7 ^{ab,A}	26.7 $\pm$ 5.7 ^{a,A}	17.4 $\pm$ 3.8 ^{*,b,A}	19.8 $\pm$ 4.5 ^{a,A}
T50F	29.8 $\pm$ 4.9 ^{a,A}	23.0 $\pm$ 5.3 ^{ab,B}	21.9 $\pm$ 5.1 ^{a,A}	16.4 $\pm$ 4.1 ^{*,†,bc,B}

* difere em relação ao controle não-cultivado (P<0,05)

† difere em relação ao α -MEM⁺ (P<0,05)

(a,b) letras diferentes na mesma coluna demonstram diferenças entre os tratamentos no mesmo período de cultivo (P<0,05)

(A,B) letras diferentes na mesma linha demonstram diferenças entre os períodos de cultivo em um mesmo tratamento (P<0,05)

Com relação ao diâmetro folicular (Tabela 3), não houve crescimento dos folículos em cultivo, uma vez que todos os tratamentos comportaram-se de maneira semelhante ao controle não-cultivado e ao α -MEM⁺, exceto o tratamento T10. Neste caso, o tratamento T10 reduziu o diâmetro folicular no dia 1 de cultivo. Acredita-se que este resultado seja consequência da baixa concentração do hormônio tireoidiano utilizada neste tratamento. O que não é tão evidente no tratamento T10F devido a presença do FSH que pode ter produzido algum efeito benéfico corroborando com os resultados de MAGALHÃES et al. (2009b).

Além disso, ao comparar os tratamentos dentro de cada período de cultivo, o tratamento T10 também foi observado por reduzir o diâmetro folicular no dia 1 em relação aos tratamentos T50, T10F e T50F ($P < 0,05$). Estes resultados podem sugerir que tais tratamentos com associação do FSH e T4 no dia 1 de cultivo conseguiram manter a estrutura folicular, mas sem que houvesse desenvolvimento dos folículos pré-antrais. Além disso, altas concentrações de tiroxina (T50) podem ser capazes de suprir a ausência de FSH em folículos pré-antrais ovinos cultivados *in vitro* (TAMILMANI et al., 2005). Acredita-se que a diminuição ou o aumento da secreção tireoidiana atue indiretamente sobre o ovário, alterando suas respostas às gonadotrofinas e desta forma influenciando os diversos aspectos da fisiologia reprodutiva (MARUO et al.; 1992b; WAKIM et al., 1993; WAKIM et al.; 1994). Jiang et al. (2000) verificaram que a associação do FSH e T4 pouco influenciou no desenvolvimento de folículos antrais de ratas. A ação dos hormônios tireoidianos já foi comprovada na foliculogênese de ratas por meio da diferenciação das células da granulosa e estimulação da ovulação (WAKIM et al.; 1994; SERAKIDES et al.; 2001).

Outro resultado importante observado no presente estudo, foi com relação a progressão do cultivo do dia 1 para o dia 7, onde o tratamento T10, que foi ruim em quase todas as análises, apresentou um aumento no diâmetro folicular ($P < 0,05$). Segundo Matos et al. (2006), isso pode ser devido ao intumescimento das células da granulosa que aumentaram a quantidade de água intracelular resultando no aumento do folículo. Entretanto, para evidenciarmos tais observações, se faz necessário a utilização de uma técnica mais acurada, como microscopia eletrônica de transmissão, que é uma técnica

extremamente importante para avaliar a densidade das organelas celulares, bem como, as condições ultra-estruturais dos folículos cultivados *in vitro* (MATOS et al., 2006).

Semelhante ao crescimento folicular também não houve crescimento oocitário. Já foi comprovado que durante o crescimento dos oócitos ocorre reparo do DNA (DOWNEY et al., 1990) e intensa transcrição de RNAm (LINTERN-MOORE & MOORE, 1979). Etapas que são de extrema importância para o oócito e necessitam de uma série de nutrientes, hormônios e/ou fatores de crescimento (WANDJI et al., 1997).

No dia 1 de cultivo, os tratamentos T10 e T20F reduziram ($P<0,05$) o diâmetro oocitário quando comparados ao controle não-cultivado. Nesta situação, acredita-se que as baixas concentrações de T4 não foram suficientes para promover um crescimento oocitário eficiente. Já no dia 7 de cultivo, os tratamentos FSH, T10F e T50F reduziram o diâmetro oocitário ($P<0,05$) com a progressão do cultivo do dia 1 para o dia 7 e ainda quando comparados ao controle não-cultivado e ao α -MEM⁺. Estes resultados apontam que as condições de cultivo aqui testadas, ou seja, na presença de FSH ou sua combinação com T4, não produziram efeitos satisfatórios para o crescimento oocitário.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a importância da tiroxina para o cultivo de folículos pré-antrais ovinos. Concluiu-se que altas concentrações de T4 (50 µg/ml) proporcionaram resultados promissores no que diz respeito à sobrevivência e desenvolvimento folicular *in vitro*. Quanto à associação da T4 com o FSH, não demonstrou resultados positivos na sobrevivência e no desenvolvimento folicular *in vitro*. Embora seja conhecida a atuação da tiroxina na fisiologia ovariana são necessárias mais pesquisas que verifiquem sua importância para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E.Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 9, p. 815-827, 1994.

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

ALMEIDA, H. B. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina, tiroxina e a longevidade de sêmen eqüino resfriado**. 137 p. Tese Doutorado: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 25-26, 2004.

AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, F. C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; ARTINI, A.; GONÇALVES, P. B. D. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v.53, p.1251-1262, 2000.

AMSTERDAN, A.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; LANDBRACHA, A.; RIMON, E.; SASSON, R.; HIRSH L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. **Steroids**, v. 68, p. 861-867, 2003.

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.

ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B. S.; NAIK, B. R.; NAIDU, K. S.; SURESH KUMAR, R. V.; RAO, V. H. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 70, p. 93-100, 2007.

BAKER, S. J.; SPEARS, N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. **Human Reproduction Update**, v. 5, p. 153-165, 1997.

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

BEAU, I.; TOURAINE, P.; MEDURI, G.; GOUGEON, A.; DESROCHES, A.; MATUCHANSKY, C.; MILGROM, E.; KUTTENN, F.; MISRAHI, M. A novel phenotype related to partial loss of function 100 mutations of the follicle stimulating hormone receptor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 1352–1359, 1998.

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

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

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

BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; MAIA-JÚNIOR, 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.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P.O.; CAMPELLO C. C.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 679–687, 2009 (a).

BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CHAVES, R. N.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE, I. B.; ARAÚJO, V. R.; FIGUEIREDO, J. R. Angiogenic factors and ovarian follicle development. **Animal Reproduction**, v. 6, p. 371-379, 2009 (b).

BUKOVSKI, A.; CAUDLE, M. R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, N. B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.2-20, 2004.

BUTCHER, L.; ULLMANN, S. L. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 535-539, 1996.

CARROL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 321-327, 1990.

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

CECCONI, S.; ROSSI, G.; BARBERI, M.; SCALDAFERRI, L.; CANIPARI, R. Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development in vitro. **Endocrinology**, v. 145, p. 2071-2079, 2004.

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.; 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. Ovarian fragments chilling during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 640-647, 2008.

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

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 3-9, 2001.

COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; RONDINA, D.; ANDRADE, E. R.; OHASHI, O. M.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of IAA in combination with FSH on in vitro culture of ovine preantral follicles. **Zygote**, 2009 (in press).

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

DEPALO, R.; NAPPI, L.; LOVERRO, G.; BETTOCCHI, S.; CARUSO, M.L.; VALENTINI, A. M.; SELVAGGI, L. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. **Human Reproduction**, v. 18, p. 2678-2682, 2003.

DICKSON, W. M. Endocrinology. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Eds), reproduction and Lactation. **Ducke's Physiology of Domestic Animals**. Panima Publishing Corporation, New Delhi, p. 629-710, 1996.

DIETRICH, A.; SAIRAM, M. R.; MONACO, L.; FIMIA, G. M.; GANSMULLER, A.; LEMEUR, M.; SASSONE-CORSI, P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Cell Biology**, v. 95, p. 13612–13617, 1998.

DIJKSTRA, G.; ROOIJ, D. G.; JONG, F. H.; VAN DER HURK, R. Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. **European Journal Endocrinology**, v. 134, p. 649-654, 1996.

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

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.1-11, 2006.

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

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

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

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. **Manipulação de oócitos incluídos 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: Editora Roca, p.303-327, 2008.

FITKO, R.; SZLEZYNGIER, B. Role of thyroid hormone in controlling the concentration of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in rat ovaries. **European Journal Endocrinology**, v. 130, p. 378-380, 1994.

FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S. A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441-449, 1998.

GLAMOCLIIJA, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 83, p. 426-431, 2005.

GOOK, D. A.; EDGAR, D. H.; BORG, J.; MARTIC, M. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. **Human Reproduction**, v.23, p.394-402, 2008.

GOLDMAN, S.; DIRNFELD, M.; ABRAMOVICI, H.; KRAIEM, Z. Triiodothyronine (T3) modulates hCG-regulated progesterone secretion, cAMP accumulation and DNA content in cultured human luteinized granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 96, p.125-131, 1993.

GREGORASZCZUK, E. L.; SKALKA, M. Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotropin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of the follicular phase. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 961-967, 1996.

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

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HAFEZ, E.S.E. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**, 6a edição, WILLIAMS & WILKINS, Anatomy of Female Reproduction. Estados Unidos, p. 20-58, 1996.

HARTSHORNE, G. In vitro culture of ovarian follicles. **Reviews Reproduction**, v. 2, p. 94-104, 1997.

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

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

HUAMIN, Z.; YONG, Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v. 54, p. 641-650, 2000.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A. ; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17- β estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-226, 1995.

JENNINGS, R. B.; GANOTE, C. E.; REIMER, K. R. Ischemic tissue injury. **American Journal of Pathology**, v. 81, p. 179-197, 1975.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 39, p. 527-535, 1993.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 285-297, 1995.

JEWGENOW K.; STOLTE M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 183-19, 1996.

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

JIANG, J. Y.; UMEZU, M.; SATO, E. Improvement of follicular development rather than gonadotrophin secretion by thyroxine treatment in infertile immature hypothyroid rdw rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, p.193–199, 2000.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, v. 214, p. 342–353, 1999.

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

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H. J.; ADAMS, G. B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K. S.; TILLY, J. C.; CORTES, M. L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D. T.; TILLY, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, p. 303-315, 2005.

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

KOUTRAS, D. A. Disturbances of menstruation in thyroid disease. **Annual Academy of Science**, v. 17, p. 280-284, 1997.

KUMAR, T. R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M. M. Follicle-stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics**, v. 15, p. 201-204, 1997.

LARSEN, P. R.; INGBAR, S. H. **The thyroid gland**. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M. Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: WB Saunders, p. 357-487, 1998

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

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; TENÓRIO, S. B.; BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; ROSSETTO, R.; NAME, K. P. O.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.. Progesterone and Follicle Stimulating Hormone interact and promote goat preantral follicles survival and development in vitro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, in press, 2009 (b).

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; HONÓRIO, S. B.; MARTINS, F. S.; ROSSETTO, R.; CUNHA, L. D.; NAME, K. P. O.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes in vitro survival and development of caprine preantral follicles E2 and FSH in the culture of goat preantral follicles. **Cells and Tissues, Organs**, in press, 2009 (c).

LINTERN-MOORE, S.; MOORE, G. P. M. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 773–778, 1979.

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.

LOPES, H. J. J. **Função Tireoidiana: Principais testes laboratoriais e aplicações diagnósticas**. Belo Horizonte, p. 2-13, 2002.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÃO, 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, J. 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.

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

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I.B., MATOS, M. H. T., SILVA, R. C., LUCCI, C. M., BÁO, S. N., CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, in press, 2009 (b).

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

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JÚNIOR, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and Differentiation Factor-9 stimulates goat primordial follicles activation in vitro and the progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.916-924, 2008.

MARUO, T.; KATAYAMA, K.; BARNEA, E. R.; MOCHIZUKI M. A role for thyroid hormone in the induction of ovulation and corpus luteum function. **Hormone Research**, v. 37, p. 12-18, 1992 (a).

MARUO, T.; HIRAMATSU, S.; OTANI, T.; HAYASHI, M.; MOCHIZUKI, M. Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. **Acta Endocrinology**, v. 127, p. 152-160, 1992 (b).

MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; MARTINS, F. S.; SANTOS, R. R.; LUQUE, M. C. A.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.. Histological and ultrastructural features of caprine preantral follicles after in vitro culture in the presence or absence of indole-3-acetic acid. **Animal Reproduction**, v.3, p. 415-422, 2006.

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 (a).

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p. 433-442, 2007 (b).

MATTHEIJ, J. A. M.; SWARTS, J. J. M.; LOKERSE, P.; VAN KAMPEN, J. T.; VAN DER HEIDE, D. Effect of hypothyroidism on the pituitary-gonadal axis in the adult female rat. **Journal of Endocrinology**, v. 146, p. 87-94, 1995.

MAYER, L. P.; DEVINE, P. J.; DYER, C. A.; HOYER, P. B. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**, v.71, p.130-138, 2004.

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

MIKKELSEN, A. L.; HOSTAND, E.; LINDENBERG, S. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. **Reproduction**, v.122, p.481-486, 2001.

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

NUNES, M. T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. Review. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 639-643, 2003.

NUTTINCK, F.; COLETTE, L.; MASSIP, A. Histologic and autoradiographic study of the in vitro effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p.1235-1245, 1996.

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

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

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

PEPE, G. J.; BILLIAR, R. B.; ALBRECHT, E. D. Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.247, p.41-46, 2006.

PURVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. **Vida – A Ciência da Biologia**. Cap. 15 e 44. 6ª Ed. p. 279-293; 773-793, 2006.

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

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 783-790, 1993.

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

SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E.; RIBEIRO, A. F. C.; SILVA C. M.; Folliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, p. 258-264, 2001.

SHAW, J. M.; COX, S. L.; TROUNSON, A. O.; JENKIN, G. Evaluation of the longterm function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.161, p.103-10, 2000.

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 273–286, 2004 (a).

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 (b).

SILVA, C. M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T. S.; OCARINO, N. M.; NASCIMENTO, E. F.; NUNES V. A. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 628-639, 2004 (c).

SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L. R.; PINTO, L. C.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 83-89, 2010.

SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; ALLISON, V.; BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Role of gonadotrophins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 19-26, 1998.

TAMILMANI, G.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; MUTHARAO, M.; RAO, V. H. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 295-305, 2005.

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

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

TOURAINÉ, P.; BEAU, I.; GOUGEON, A.; MEDURI, G.; DESROCHES, A.; PICHARD, C.; DETOEUF, M.; PANIEL, B.; PRIEUR, M.; ZORN, J. R.; MILGROM, E.; KUTTENN, F.; MISRAHI, M. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1844-1854, 1999.

ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY, A. R.; BEITINS, I. Z. Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. **Endocrine Review**, v. 16, p. 765-787, 1995.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.

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

VENDITTI, P.; DIMEO, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 414-434, 2006.

WAKIM, A. N.; POLIZOTTO, S. L.; BUFFO, M. J.; MRRERO, M. A.; BURHOLT, D. R. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 1187-1190, 1993.

WAKIM, A. N.; PALJUG, W. R.; JASNOSZ, K. M.; ALHAKIM, N.; BROWN, A. B.; BURHOLT, D. R. Thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cells. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 531-534, 1994.

WAKIN, N. G.; RAMANI, N.; RAO, V. Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 156, p. 237-240, 1987.

WAKIN, A. N.; POLIZOTTO, S. L.; BUFFO, M. J.; MARRERO, M. A.; BURHOLD, D. R. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 1187-1190, 1996.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factor affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, 1996.

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

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1555–1562, 1999.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v.81, p. 1097-1142, 2001.

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

YU, Y. S.; LUO, M. J.; HAN, Z. B.; LI, W.; SUI, H. S.; TAN, J. H. Serum and follicular fluid steroid levels as related to follicular development and granulosa cells apoptosis during the estrous cycle of goats. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 57-65, 2005.

ZHANG, S. S.; CARRILLO, A. J.; DARLING, D. S. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 555–562, 1997

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