

SANELY LOURENÇO DA COSTA CALIMAN

**hFSH, T4 E IGF-I NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

C153h
2014

Caliman, Sanely Lourenço da Costa, 1974-
hFSH, T4 e IGF-I no desenvolvimento *in vitro* de folículos
pré-antrais caprinos / Sanely Lourenço da Costa Caliman. –
viçosa, MG, 2014.
xxiii, 198f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Caprino - Reprodução. 2. Tiroxina. 3. Ovários.
4. Hormônio folículo estimulante. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.3

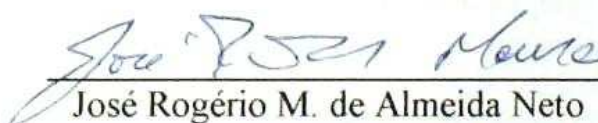
**hFSH, T4 E IGF-I NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

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

APROVADA: 13 de fevereiro de 2014.



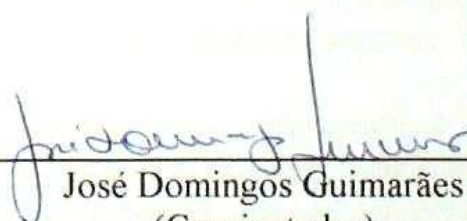
Cristina Mattos Veloso



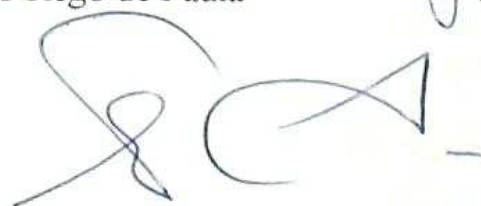
José Rogério M. de Almeida Neto



Tarcizio Antônio Rego de Paula



José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

Dedico,

*Aos meus pais, Maria Divina da Costa e
José Lourenço da Costa, por me darem
o que tem de mais precioso o seu amor,
carinho, respeito, conselhos e por me
ensinar a nunca perder a fé*

*Ao meu esposo, Cidnei Caliman, um
presente que DEUS colocou em minha
vida, com ele a cada dia aprendo o
significado da palavra “amor”*

*As minhas irmãs, Alessandra e Andréa
que fizeram com que minha infância
fosse tão especial e única, sou grata pelo
carinho que sempre tiveram por mim*

*Aos meus sobrinhos, Maria Luiza e Miguel
que tanto amo*

“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 vida e por toda a proteção que tem me concedido. Por me dar força e coragem de nunca desistir dos meus sonhos. 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 ao Programa de Pós-Graduação, em seus professores e funcionários, que juntos somam quase 6 anos colaborando com a minha formação profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Maturação de Ovócitos e Fertilização *In Vitro* (MoFIV) da UFV, por todo o suporte oferecido para realização dessa tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), muito obrigada por todo apoio financeiro, essa ajuda foi essencial para a realização deste trabalho. A CAPES pelo auxílio concedido em forma de bolsa de estudos.

Aos meus pais, Maria Divina da Costa e José Lourenço da Costa, por toda dedicação as filhas, pelo amor incondicional, carinho, educação, respeito e incentivo durante todos esses anos de minha vida. Por nunca me deixarem desistir e pela fé incondicional que os movem, agradeço a DEUS por ter me dado pais tão especiais. Obrigada por estarem sempre ao meu lado. Te amo mãe e te amo pai.

Ao meu esposo, Cidnei Caliman, pelo amor, carinho, respeito e companheirismo. Por estar ao meu lado, me apoiando e cuidando de mim. Por sonhar meus sonhos e me amar, acima de tudo e me fazer crer nesse amor cada dia mais.

Às minhas irmãs, Alessandra Lourenço da Costa e Andréa Giordana Lourenço da Costa e Favalessa, pelas orações, companheirismo, admiração e pelo estímulo positivo que sempre me deram.

Ao meu cunhado Enoildo Favalessa, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus sobrinhos Maria Luiza e Miguel Augusto pela alegria, carinho e amor que proporcionam a mim e toda a nossa família. E que a cada dia nos mostram a simplicidade da vida através de um sorriso. Titia ama muito vocês.

À minha sogra Isabel 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.

A minha querida Cássia Gomes da Silva pelos bons momentos de vida, pela amizade, pelo apoio e incentivo e acima de tudo por todo carinho e amor, te amo chuca.

A todos os meus outros familiares, pelos bons momentos de encontros compartilhados, apoio e incentivo.

Ao Professor Dr. Eduardo Paulino da Costa, agradeço sempre a DEUS por ter feito parte de sua equipe, me sinto honrada por ter sido sua orientada, por todos os ensinamentos, conselhos e acima de tudo, por ter acreditado em minha capacidade e potencial, para realização deste trabalho. Percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é o afeto e este elemento crucial nunca faltou durante nossa convivência, muito obrigada professor.

Ao Professor Dr. José Ricardo de Figueiredo sempre atencioso e paciente, obrigada por me deixar fazer parte de sua equipe por um tempo, lhe serei sempre grata por tudo que aprendi e por tudo que sou.

À minha coorientadora, Dra. Isabel Bezerra Lima Verde, pela amizade, pelo exemplo de profissional e competência, bem como por todo o acompanhamento bem próximo durante todas as fases do meu doutorado, sempre me ajudando quando eu mais precisei, e estimulando para que eu alcançasse meus objetivos. Realmente sem a sua ajuda, não teria chegado até aqui!

Ao Professor, coorientador e amigo Dr. Laércio dos Anjos Benjamim por sua colaboração em nossa pesquisa, por estar sempre de portas abertas para me escutar e ao mesmo tempo me aconselhar e me ajudar em muitos momentos. Mas que, além disso, mesmo quando estava longe, esteve sempre presente.

Ao Professor coorientador Dr. Jose Domingos Guimarães, por estar sempre pronto a ouvir e tirar minhas dúvidas, na sua calma que tranquiliza e principalmente pela humildade que me encantam os olhos. Agradeço por ter aceitado o convite e por colaborar com meu crescimento acadêmico.

Aos membros da banca examinadora, Professora Dra. Cristina Mattos Veloso pessoa que admiro e que tenho muito carinho, sempre atenciosa e disponível em ajudar, Professor Dr. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula mesmo com a pouca convivência, sempre me acolheu no que precisei, sou muito grata e ao Professor José Rogério Moura de Almeida Neto por todo o conhecimento compartilhado e por ter sido um amigo fiel.

Ao Professor Dr. Marcelo Teixeira Rodrigues que junto com seus orientados Tadeu e Magna fez com que fosse possível a realização deste trabalho, autorizando a entrega dos ovários, meu muito obrigada.

Aos Professores (as) Giovanni Carvalho, Cláudio Borela, Sérgio Barreto, Maria Scatamburlo, Ciro, George Kling, Aloízio, Juarez, Rita Flávia, Jackson, Joaquim Patarroyo, Ernani, Pacífico, Abelardo, Augusto Nero, que participaram de forma ativa da minha formação profissional e pessoal, me ensinando de forma sólida o sentido do saber e ao mesmo tempo querer correr atrás de meus objetivos, a todos vocês o meu aplauso.

Ao Professor Cláudio César Fonseca, que sempre esclareceu todas as minhas dúvidas referentes ao experimento. Ajudou-me muito emprestando produtos e materiais para minha pesquisa. Agradeço pelo apoio concedido.

Agradeço a Professora Dra. Marlene por ter me autorizado o uso de seu laboratório, em especial ao Adão e Cláudio por terem me ajudado sem vocês eu não teria conseguido concluir uma etapa importante da minha pesquisa.

Aos funcionários da UFV, José Cândido (Nenzinho), José Geraldo (Tuim), Carmem, Camilo, Divina, Andréa, Luiz Carlos, Dagoberto, Aloízio, Venâncio, Aline, Eloíza, Isabel, Beth, Celeste, Cleone, Fernanda, Sidnei, Vavá, Varnei, Aécio, Lucinda, Sônia, Celinho, Luciano, Ademir, Toninho, Divino, Marcos Salgado, Batalha, Renato, Divino Fontes, Graziela que sempre estenderam a mão nos momentos em que precisei, sempre com um sorriso, boa vontade, conselhos, consolo, amizade, tornando tudo mais fácil, a todos vocês o meu muito obrigada.

Ao meu amigo Geraldinho, atencioso, trabalhador, sempre disposto a ajudar a quem precisa muito obrigada pela sua amizade.

À minha amiga Rosinéia que é um anjo disfarçada de ser humano, sempre pronta a me aconselhar, me ajudar, me acalmar. Às vezes na vida convivemos com pessoas especiais e nem percebemos, eu percebi e nunca mais a larguei e a levo em meu coração para aonde quer que eu vá, com todo meu amor e carinho. Te amo Rosinha.

Ao meu amigo José Francisco da Silva (Juquinha), carinho deveria ser seu sobrenome, nunca conheci alguém tão iluminado e especial como você, fico feliz em saber que moro em seu coração, assim como você mora no meu.

À minha amiga Professora. Dra. Juliana Jales de Holanda Celestino, pela amizade, carinho e respeito que demonstra por mim, pela profissional competente e atenciosa que você se tornou, sempre me ajudando quando eu mais preciso. Te admiro muito Ju.

A minha amiga Renata de Souza Reis, que tanto me ensinou, me motivou a querer sempre mais, a melhorar sempre como estudante. Agradeço pelos bons momentos compartilhados, você terá sempre a minha eterna gratidão e meu muito

obrigada. Aos companheiros de aviário Regina, Eriane, Carlão, Michele, Lucas, Raquel, Estevão, Rodrigo, Cleverson, Livia, Débora, Jorge, Gabriel, Elízio, Roberta, Tamara, Léo, José Lino, Tião, Matheus, João, Tatiana Rocha, Mariele, Eliane, Marilu, Cleidida, Paola, Simone, Daniel, Roque.

Ao meu amigo Héder José D'ávila Lima pelos ensinamentos, valiosas sugestões, por sua alegria e pelas maravilhosas risadas que sempre compartilhamos.

Ao Jurandir Penitente Filho por toda sua capacidade de reflexão analítica e estatística, quando crescer quero ser igual a você. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos Emílio César Martins Pereira, por se doar tanto por mim e estar sempre ao meu lado, a sua entrega como amigo é fiel e forte e Giancarlo Magalhães dos Santos, pela prova de amizade que demonstrou por mim e por sempre me ajudar quando eu mais preciso. Sinto-me honrada de ter amigos tão especiais como vocês.

As amigas e amigos, Valdevane, Patrícia, Juliana, Giovana, Isabel, Laritza, Anelise, Anderson, Jamily, Ana Beatriz, Débora, Roberta, Viviane, Valesca, Hiedely, Cibele, Michele, Gerlane, Cleidson, Janduí, André, obrigada pelos bons momentos vividos, por todo o estímulo e apoio concedido durante a minha passagem por Fortaleza, além dos momentos difíceis os quais se tornaram mais fáceis de serem encarados devido à amizade verdadeira de vocês.

Agradeço a todos os meus amigos que de certa forma fizeram parte dessa conquista comigo, Alexandra, Marcão, Luciana, Márcio, Alice, Helinho, Fabiano que sempre me incentivaram a tentar e nunca desistir. Ana Estela, Daisy amigas que me hospedaram em suas casas durante a seleção do Mestrado, meu eterno carinho, Diogo meu companheiro de viagem rumo a este sonho, sempre com bons conselhos. E aos amigos que fiz durante minha vida acadêmica, Káterin, Emily, Fabrício Albani, Luiz Brito, Paulo Burlamaqui, Vívian Freitas, Pollyana Galvão, Charles, Madriano, Flávia Reis, Anderson Araújo, Bruna, Marcelo Milagres, Carlão, Moacir, Marcos Vinícius Rodrigues, Juliano, Ronaldo Silveira, Camila Silveira, Marli Cupertino, Júlio Dias, Fernanda Carvalho, Marcos Antônio Santos, Carol, Tatiana Duarte, Fabio Piere, André Ricardo, Juliana Milani, Fábio Ribeiro, Fabrício Valente, Paulo Zanchetta Passamani, Raísa, Eliciane, Polliana, Andréa Goulart, Elisângela, Mila, Lucas Marcon, Fausto, Diego, Amara, Grazianni, Rodrigo, Monique Araújo, Soninha, Daiane, Renata Sturião, Vanessa Pessin, Nilsa Hoffman, Felipe, Amanda, Conceição, Antônio, Simone Machado, Claiton, Clara, Erick, Carlos Alvim, Flávia Alvim, Gláucia, Dani Marques,

Claudete, Rafaela, Carolina Zoocaró, Rafael Otero, Joanna, Guilherme Pugliesi, Erly, Damares, Rogério, Hugo, Lina, Breno, Priscila, Luciana Bezerra, Raquel Burin, Monique Colombo, Alberto, Bjaude, Jhonata, Faider, Waleska, Rafael Viana, Fátima Souza, Karina Busato, Manuela Matta, Fernanda Fernandes, Martinha, Bruno Edésio, Natasha, Juliana Oliveira, Wagner Gonzaga agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram a seguir minha carreira acadêmica e pessoal, concretizando mais esta etapa da minha vida.

A toda equipe do Laboratório MoFIV, Talita Fernandes da Silva, Letícia Maria Pereira Sanglard, Vívian Rachel de Araújo Mendes, Ana Clara Fidélis, Layane Queiroz Magalhães, Pedro Paulo Teixeira Freitas e Mariana Silveira Molica pela ajuda na execução desse trabalho, o apoio de todos vocês foi de fundamental importância, muito obrigada.

Aos amigos Karla e Gilmar Valente por sempre estarem contribuindo para a utilização do Laboratório de Microscopia Eletrônica, por todos os momentos divertidos que passamos juntos, os quais funcionaram como um bálsamo durante o doutorado. Agradeço também Daiane, Rosângela e Lourenço pela alegria do convívio e pelas boas risadas. Muito obrigada pela amizade!

Aos meus queridos amigos, José de Oliveira e Hanna. Vocês foram fundamentais durante etapas importantes da minha vida, não tenho palavras para expressar a gratidão e o amor que tenho em meu coração por vocês. A única coisa que tenho a oferecer-lhes é uma amizade verdadeira e sólida. Muito obrigada. José obrigada por sempre dividir sua família comigo, um grande beijo para Lu e Sarinha.

A todos agradeço, profundamente, e dedico o resultado desse trabalho.

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 no Curso de Graduação na Faculdade de Castelo, na cidade de Castelo, Espírito Santo, graduando-se no curso de Medicina Veterinária em Dezembro de 2006.

No dia 03 de Março de 2008, iniciou no Programa de Pós-Graduação no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa em Minas Gerais, tendo defendido a Dissertação em 22 de Fevereiro de 2010, obtendo o título em 26 de Junho de 2010.

Em Março de 2010, iniciou o Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Reprodução Animal, submetendo-se aos exames finais de Defesa de Tese em 13 de Fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO.....	xx
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO.	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Ovário dos mamíferos	03
2.2. Oogênese e foliculogênese	03
2.3. Classificação dos folículos ovarianos	04
2.3.1. Formação e início do crescimento de folículos primordiais <i>in vivo</i>	04
2.3.2. Crescimento de folículos primários e secundários	05
2.3.3. Formação dos folículos antrais	06
2.4. População e atresia folicular	07
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos	08
2.6. Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	09
2.7. Importância da composição do meio de cultivo no desenvolvimento de folículos pré-antrais	10
2.7.1. Tiroxina - T ₄	11
2.7.2. Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-I - IGF-I	12
2.7.3. Hormônio Folículos Estimulante - FSH	14
3. JUSTIFICATIVA	16
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivos gerais	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
7. CAPÍTULO I	
Caracterização estrutural do Hormônio Folículo Estimulante e seu papel na fisiologia de células ovarianas	37

8. CAPÍTULO II

Papel da Tiroxina (T_4) e do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-I (IGF-I) na regulação da foliculogênese em mamíferos55

9. CAPÍTULO III

O Hormônio Folículo Estimulante Humano (hFSH) mantém a ultraestrutura normal de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*81

10. CAPÍTULO IV

Influência do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) sobre a sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos104

11. CAPÍTULO V

Hormônio Tiroxina (T_4) promove a sobrevivência, ativação e o crescimento durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos por sete dias127

12. CAPÍTULO VI

Associação entre Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-I, Tiroxina e Hormônio Folículo Estimulante sobre a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos149

13. CAPÍTULO VII

Meio contendo Hormônio Folículo Estimulante (hFSH) e Tiroxina (T_4) mantém a sobrevivência e promove o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos em cultivo de longa duração.....172

14. CONCLUSÕES197

15. PERSPECTIVAS198

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

Tabela 1. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of hFSH (concentrations in ng/mL).....88

Tabela 2. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of hFSH (concentrations in ng/mL).....90

Capítulo IV

Tabela 1. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of IGF-I (concentrations in ng/mL).....111

Tabela 2. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of IGF-I (concentrations in ng/mL).....114

Capítulo V

Tabela 1. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of T₄ (concentrations in ng/mL).....135

Tabela 2. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of T ₄ (concentrations in ng/mL).....	138
--	-----

Capítulo VI

Tabela 1. Different media tested for the <i>in vitro</i> culture of caprine preantral follicles.....	152
--	-----

Tabela 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after <i>in vitro</i> culture for 1 or 7 days in the absence or presence of T ₄ /IGF-I/FSH (concentrations in ng/mL).....	156
--	-----

Tabela 3. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7days in the absence or presence of interaction T ₄ /IGF-I/FSH (concentrations in ng/mL).....	160
--	-----

Capítulo VII

Tabela 1. Different means tested during <i>in vitro</i> culture of long duration.....	176
---	-----

Tabela 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after <i>in vitro</i> culture for 1, 7, 14, 21 or 28 days in the absence or presence of T ₄ /FSH (concentrations in ng/mL).....	180
--	-----

Tabela 3. Percentage (mean $\pm$ SEM) of primordial follicles and developing (intermediate, primary and secondary) in control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1, 7, 14, 21 or 28 days in the absence or presence of T₄/FSH (concentrations in ng/mL).....181

Tabela 4. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1, 7, 14, 21 or 28 days in the absence or presence of interaction T₄/FSH (concentrations in ng/mL).....182

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1. Estrutura esquemática da síntese e secreção de FSH.....40
- Figura 2. Representação esquemática dos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos.
Sinalização Autócrina: o hormônio produzido atua na própria célula.
Sinalização Parácrina: o hormônio secretado age nas células adjacentes.
Sinalização Endócrina: o hormônio produzido é transportado por meio da corrente sanguínea, agindo em células distantes do seu local de produção.....41

Capítulo II

- Figura 1. Ilustração do mecanismo de ação dos receptores tireoidianos.....63
- Figura 2. O Sistema IGF. Este sistema possui três componentes, os ligantes (IGF-1, IGF-2 e insulina), receptores de superfície celular que incluem (IGFR-1), (IGFR-2) e receptor de insulina (IR), assim como as IGFBPs.....69

Capítulo III

- Figura 1. Histological sections of ovarian fragments after Periodic Acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal (A) and degenerated (B) follicles after culture with 50 ng/mL hFSH after 7 days of culture. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell (Original magnification 400×). Scale bars represent 25 μ m.86

Figura 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of hFSH (concentrations in ng/mL). *Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$)......89

Figura 3. Ultrastructural analysis (A) of non-cultured preantral follicle (control; original magnification 4400x); (B) and follicle cultured for 7 days in medium containing 10 ng/mL hFSH (original magnification 4400x). Note the large nucleus of the granulosa cells in the control follicles and follicles cultured in 10 ng/mL of hFSH. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells; m: mitochondria; arrow-oocyte plasma membrane. (A and B = 5 μ m).91

Capítulo IV

Figura 1. Histological sections of ovarian fragments after Periodic Acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal follicles (A, control fresh; B and C of 100 ng/mL IGF-I after 1 and 7 days of culture respectively) and degenerated (D, α -MEM⁺ with 1 day of culture; E and F of 50 ng/mL IGF-I after 1 and 7 days of culture respectivamente). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell (Original magnification 400 $\times$). arrow-oocyte retracted of granulosa cells.110

Figura 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of IGF-I (concentrations in ng/mL). *Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ⁺ compared with α -MEM⁺ ($P<0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).112

Figura 3. Ultrastructural analysis of normal preantral follicles from fresh control (4400X) (a) and cultured for 1 (3000X) (b) and 7 days (3000X) (c) in medium containing like growth factor insulin-I (100 ng/mL). Homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded is characteristic of non-cultured follicles (3 a). Extreme vacuolization and great holes are present in the cytoplasm, indicative of degeneration (3 b and 3 c; solid arrow). (Nu) Oocyte nucleus; (GC) Granulosa cells; (m) Mitochondria; (er) Endoplasmic reticulum; (v) Vacuoles.....115

Capítulo V

Figura 1. Tested treatments according to supplementation of the medium for the *in vitro* culture of caprine ovarian tissues.....130

Figura 2. Representative image of normal preantral follicles from the fresh control (a) and after 1 or 7-day culture in the presence of 10 and 20 ng/mL of T₄ (b, c) and of degenerated follicles cultured for 7 days in α -MEM+ alone (d) or in 50 ng/mL of T₄ (e). Degenerated preantral follicles often displayed oocyte retraction (e, arrow) and disorganization of granulosa cell layers (d, arrow). Scale bars represent 20 μ m (a,b,c,d,e). o: oocyte; nu: oocyte nucleus; gc: granulosa cells (x400), PAS Hematoxilin.....134

Figura 3. Percentage (mean $\pm$ SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of T₄ (concentrations in ng/mL). * Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture (P<0.05); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment (P<0.05).....137

Figura 4. Ultrastructure of preantral follicles fresh control (A, 4.400x) and cultured for a (B, 3.000x) and seven days (C, 3.000x) in medium containing the hormone thyroxine (10 and 20 ng/mL). It is noted homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded characteristic of the fresh control follicles (A). Intense vacuolization are present in the cytoplasm, indicating degeneration (B). O: oocyte, Nu: nucleus of the oocyte, GC: granulosa cells, m: mitochondria.....139

Capítulo VI

Figura 1. Histological sections of ovarian fragments tissue after staining Periodic Acid-Schiff's hematoxylin showing morphologically normal follicles (A, fresh control), (B, T₄/FSH 20/10ng/mL) e (C, T₄/IGF-I 20/100ng/mL). The degenerate follicles were represented in the letters (D, α -MEM⁺); (E, IGF-I/FSH 100/10ng/mL) e (F, T₄/IGF-I/FSH 20/100/10ng/mL). O: oocyte, Nu: nucleus of the oocyte, GC: granulosa cells (Original magnification 400×). Scale bars represent 20 μ m.....155

Figura 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of primordial and developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured control (A) and cultured *in vitro* for 1 or 7 days in the absence or presence of interaction T₄/IGF-I/FSH (concentrations in ng/mL). * Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture (P<0.05); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment (P<0.05).....158

Figura 3. Ultrastructural analysis of preantral follicles from fresh control (A, 4.400x) and cultured for seven days (B, 3.000x) in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL). Note homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded, characteristic of the fresh control follicles (A and B). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells; M: mitochondria. (A and B = 5 μ m).....161

Capítulo VII

Figura 1. Histological sections of ovarian fragments tissue after staining Periodic Acid-Schiff's hematoxylin showing morphologically normal follicles (A, fresh control), (B, T₄/FSH - D7) e (C, T₄/FSH - D14). The degenerate follicles were represented in the letters (D, α -MEM⁺ - D28); (E, T₄/FSH - D21) e (F, T₄/FSH - D28). O: oocyte, Nu: nucleus oocyte, GC: granulosa cells (Original magnification 200×). Scale bars represent 20 μ m.....179

Figura 2. Ultrastructural analysis of preantral follicles from fresh control (A, 3.000x) and cultured for seven days (B, 4.400x) in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL). Note homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded, characteristic of the fresh control follicles (A and B). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells; M: mitochondria. (A and B = 5 μ m).....183

RESUMO

CALIMAN, Sanely Lourenço da Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **hFSH, T₄ e IGF-I no desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais caprinos.** Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Coorientadores: José Domingos Guimarães, Laércio dos Anjos Benjamin, Isabel Bezerra Lima Verde e Marcelo Teixeira Rodrigues.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da T₄, IGF-I e hFSH, isoladamente ou em associação, bem como o período de cultivo (1, 7, 14, 21 e 28 dias) sobre a sobrevivência, ativação e crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) caprinos. Para a Fase I, II e III, um fragmento/folículo foi retirado para histologia clássica e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) constituindo o controle fresco. Em seguida, os demais fragmentos/folículos foram cultivados *in situ* (inclusos em fragmentos de tecido ovariano) por 1 e 7 dias (Fases I e II) e 1, 7, 14, 21 e 28 dias (Fase III), (a 39°C em estufa e 5% de CO₂) em α -MEM⁺ na ausência ou presença de diferentes concentrações de T₄ (etapa 1), IGF-1 (etapa 2) e hFSH (etapa 3). Na Fase II, os fragmentos/folículos foram cultivados em placas contendo α -MEM⁺ suplementado com T₄, IGF-I e FSH, em associação nas melhores concentrações definidas na Fase I. Na Fase III, os fragmentos/folículos foram cultivados em α -MEM⁺ ou no (s) melhor (es) meio (s) obtido (s) na Fase II por 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Para os experimentos realizados na Fase I, os resultados mostraram que após sete dias de cultivo, 10 ng/mL de hFSH foi capaz de promover a ativação de folículos primordiais e manter a integridade ultraestrutural dos folículos cultivados por até sete dias. A adição de 100 ng/mL de IGF-I ao meio cultivo ativa os folículos em desenvolvimento com um dia de cultivo. Além disso, a utilização de 20 ng/mL de T₄ é eficaz na manutenção da sobrevivência, ativação e crescimento de folículos, durante sete dias de cultivo. Na Fase II, a interação de T₄, hFSH e IGF-I realizada durante o cultivo, demonstrou que a combinação de T₄/hFSH (20/10ng/mL) é benéfica para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais, durante a sobrevivência, o crescimento e aspectos ultraestruturais. Os resultados apresentados na Fase III demonstram que o cultivo de longa duração na concentração de 20/10 ng/mL de T₄/hFSH promoveu a sobrevivência, a ativação de folículos primordiais e o crescimento folicular durante sete dias de cultivo. Os resultados deste estudo mostraram que a utilização de hFSH (10ng/mL), IGF-I (100ng/mL) e T₄ (20ng/mL) promovem a manutenção da sobrevivência folicular e o desenvolvimento dos folículos

pré-antrais caprinos e que a associação de T₄ e hFSH assegurou a sobrevivência dos folículos e manteve o crescimento folicular. Os folículos cultivados por um período de longa duração (28 dias) se faz necessário para o conhecimento dos meios a serem utilizados durante o cultivo *in vitro*, demonstrando a necessidade de mais interações entre as substâncias, para a descoberta de um meio de cultivo que permita o desenvolvimento dos folículos durante a foliculogênese na fase pré-antral e antral.

ABSTRACT

CALIMAN, Sanely Lourenço da Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **hFSH, T₄ e IGF-I in the *in vitro* development of caprine preantral follicles.** Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: José Domingos Guimarães, Laércio dos Anjos Benjamin, Isabel Bezerra Lima Verde and Marcelo Teixeira Rodrigues.

The aim of this study was to evaluate the effect of T₄, IGF-I and hFSH, alone or in combination, as well as the culture period (1, 7, 14, 21 and 28 days) on survival, activation and *in vitro* growth of caprine preantral ovarian follicles (PAOF). For Phase I, II and III, a fragment/follicle will be removed for classic histology and Transmission Electron Microscopy (TEM) constituting the fresh control. Then, the remaining fragments/follicles will be cultured *in situ* (included in ovarian tissue fragments) for 1 and 7 days (Phase I and II) and 1, 7, 14, 21 and 28 days (Phase III), (at 39°C in a kiln and 5% of CO₂) in α -MEM⁺ in the absence or presence of different concentrations of T₄ (stage 1), IGF-1 (stage 2) and hFSH (stage 3). In Phase II, the fragments/follicles will be cultured on plates containing α -MEM⁺ supplemented with T₄, IGF-I and FSH, in combination at the best concentrations defined in Phase I. In Phase III, the fragments/follicles will be cultured in α -MEM⁺ or in the best medium (media) obtained in Phase II for 1, 7, 14, 21 and 28 days. For the experiments conducted in Phase I, the results showed that after seven days of culture, 10 ng/ml of hFSH is able to promote the activation of primordial follicles and to maintain the ultrastructural integrity of follicles cultured for up to seven days. The addition of 100 ng/ml of IGF-I to the culture medium activate the developing follicles with one day of culture. Furthermore, the use of 20 ng/ml of T₄ is effective in maintaining the survival, activation and growth of follicles during seven days of culture. In Phase II, the interaction of T₄, hFSH and IGF-I performed during the culture showed that the combination of T₄/hFSH (20/10ng/mL) is beneficial for the *in vitro* development of preantral follicles, during the survival, growth and ultrastructural aspects. The results presented in Phase III demonstrate that the long-duration culture at the concentration of 20/10 ng/ml of T₄/hFSH promoted the survival, activation of primordial follicles and follicular growth during seven days of culture. In conclusion, the results of this study showed that the use of hFSH (10ng/ml), IGF-I (100ng/ml) and T₄ (20ng/ml) promotes the maintenance of follicle survival and the development of caprine preantral follicles. Moreover, the association of T₄ and hFSH

ensured the survival of follicles and maintained follicular growth. Follicles cultured for a long duration period (28 days) is necessary for the understanding of the media to be used during the *in vitro* culture, demonstrating the need for further interactions between substances, for the discovery of a culture medium which allows the development of follicles during folliculogenesis in the preantral and antral stage.

1. INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm sido realizadas na área da reprodução animal, visando aumentar o potencial reprodutivo de caprinos e ovinos de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Segundo Figueiredo et al. (2008), para maximizar a eficiência reprodutiva de um determinado rebanho é necessário o desenvolvimento e a aplicação de biotécnicas da reprodução. Neste sentido, várias biotécnicas reprodutivas têm sido amplamente utilizadas, dentre elas podemos citar a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE) e a Fecundação *in vitro* (FIV). Mais recentemente, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) vem sendo desenvolvida, tendo esta biotécnica importância na pesquisa fundamental, sendo portanto, fundamental para compreensão da fisiologia ovariana e elucidação dos mecanismos e fatores envolvidos na foliculogênese na fase pré-antral.

A biotécnica de MOIFOPA tem como objetivo principal a recuperação de folículos pré-antrais (FOPA) do ovário para o cultivo *in vitro* até o estágio de maturação, prevenindo-os portanto, do processo de atresia que ocorre naturalmente *in vivo*. Neste sentido, vários pesquisadores têm testado diferentes substâncias, como hormônios (CORTVRINDT et al., 1997; FLAWS et al., 1997; MATOS et al., 2007a) e fatores de crescimento (SILVA et al., 2004c; MATOS et al., 2007b), com a finalidade de definir um sistema de cultivo que permita o crescimento e garanta a viabilidade folicular pré-antral *in vitro*. A proposta para o desenvolvimento de um sistema de cultivo folicular bem estabelecido é de fundamental importância. Esse sistema de cultivo permitirá a manutenção da fertilidade das fêmeas, através do fornecimento de oócitos para tecnologias de reprodução assistida, bem como para aprofundar a compreensão das interações oócito/células somáticas em espécies de crescimento folicular prolongado (McLAUGHLIN et al., 2010).

A identificação de fatores produzidos localmente em folículos ovarianos caprinos, bem como a avaliação do efeito destes fatores sobre o crescimento e a maturação oocitária poderá contribuir para uma melhor compreensão da foliculogênese. Sabe-se que em sistemas *in vivo* hormônios e fatores de crescimento agem harmonicamente controlando os mecanismos envolvidos na foliculogênese pré-antral. Dentre estes, deve-se citar o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Fator de Crescimento Semelhante a Insulina-I (IGF-I). Experimentos *in vitro* têm revelado que o FSH é indispensável para o desenvolvimento de folículos antrais, e que seu papel sobre

a foliculogênese inicial ainda não está claro (FORTUNE, 2003). O cultivo de pequenos FOPA bovinos (30-70 μm) por 7 dias utilizando o FSH aumentou a degeneração oocitária (NUTTINCK et al., 1996). No entanto, o FSH durante o cultivo *in vitro* de FOPA caprinos, manteve o crescimento, a ativação dos folículos primordiais e a integridade ultra-estrutural, observando-se então, que os resultados utilizando este hormônio ainda são controversos (MAGALHÃES et al., 2008). Entretanto, estudos utilizando o hormônio folículo estimulante humano (hFSH) em cultivo de FOPA caprinos são escassos. O IGF-I, adicionado durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, estimulou o crescimento folicular em ratos (ZHAO et al., 2001) e bovinos (VELAZQUEZ et al., 2009) em um experimento realizado *in vivo*.

Outro hormônio importante, que também tem sido estudado com relação à reprodução, é a tiroxina (T_4), sendo de grande importância no desenvolvimento dos folículos ovarianos (DICKSON, 1996). Entretanto, verifica-se que o efeito deste hormônio no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos, e sua possível interação com o FSH e IGF-I ainda não é bem conhecida.

No decorrer deste trabalho, serão abordados aspectos relacionados ao ovário mamífero, oogênese e foliculogênese, classificação dos folículos ovarianos, população e atresia folicular, cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, importância da composição do meio de cultivo sobre o desenvolvimento folicular, com enfoque para os fatores e hormônios avaliados na presente tese, que serão melhor detalhados nos capítulos subsequentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovário mamífero

O ovário dos mamíferos é o órgão funcional primário do sistema reprodutor das fêmeas e desempenha duas funções, uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos), e outra exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos) exercida pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991). É constituído pelas regiões vascular e parenquimatosa e é circundado por um epitélio superficial, conhecido como epitélio germinal (SILVA, 2005). Na região vascular, localizada mais internamente, estão contidos nervos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário. Já na região parenquimatosa estão contidos folículos ovarianos e corpos lúteos em diferentes estádios de desenvolvimento (HAFEZ, 2004). A função deste órgão durante a vida reprodutiva das fêmeas depende de uma associação entre alguns fatores parácrinos e endócrinos, que atuam coordenando o processo da foliculogênese ovariana.

2.2. Oogênese e foliculogênese

Os estádios iniciais do desenvolvimento ovariano em mamíferos, ainda no período intra-uterino, são desencadeados pela migração das células germinativas primordiais (CGP) para a gônada primitiva e sua posterior colonização (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Imediatamente após a diferenciação das gônadas, ocorre a transformação das CGP em oogônias meioticamente ativas, marcadas pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno, preparando a célula para divisão meiótica. Posteriormente, estas oogônias se diferenciam em oócitos primários ou imaturos, os quais sofrem uma parada no seu desenvolvimento (SUH et al., 2002) em prófase I no estágio de dictióteno ou vesícula germinal.

Os oócitos primários são circundados por uma camada de 4-8 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 oócitos 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 FSH e LH, originando assim os oócitos secundários ocorrendo uma nova parada, da meiose na fase de metáfase II. A meiose será retomada novamente somente após a fecundação do oócito pelo espermatozóide, originando o oócito haplóide fecundado, marcando assim o fim da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

No que se refere à foliculogênese, conforme anteriormente citada, esta inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo de DeGraaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

2.3 Classificação dos folículos ovarianos

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e é formado por vários tipos celulares, sendo composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais) (MAGOFFIN, 2005). Esses dois tipos celulares são responsáveis pela síntese de numerosos hormônios que promovem a complexa regulação do desenvolvimento folicular (SKINNER, 2005). Este processo pode ser dividido nas seguintes fases de desenvolvimento: 1) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento de folículos primários e secundários; 2) fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários e formação do folículo pré-ovulatório (SILVA et al., 2004a).

2.3.1 Formação e início do crescimento de folículos primordiais in vivo

Na espécie caprina, por volta do 62º dia de vida fetal, uma camada de células somáticas planas, conhecidas também como células da pré-granulosa, originárias do epitélio celômico, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais (BEZERRA et al., 1998). Os folículos primordiais possuem diâmetro médio de 35,23 µm; 18,00 µm e 33,00 µm 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 95% do total de folículos pré-antrais presentes no ovário (ERICKSON, 1986; SMITZ &

CORTVRINDT, 2002). Após a formação dos folículos primordiais, alguns podem ser estimulados a crescer imediatamente ou estas células da pré-granulosa podem parar de se multiplicar e entrar num período de quiescência até receberem sinais para entrar no *pool* de crescimento (McGEE & HSUEH, 2000). O início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da passagem dos folículos do *pool* de reserva para o *pool* de folículos em crescimento (primário, transição, secundário, terciário e pré-ovulatório) - (RÜSSE, 1983). As características morfológicas que marcam o início do crescimento dos folículos primordiais são: aumento do diâmetro oocitário, proliferação das células da granulosa e transformação da morfologia destas células de achatada para cúbica. Durante esta fase, os folículos que apresentam células da granulosa achatadas e cúbicas são denominados folículos de transição (SILVA et al., 2004a). Quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos são denominados primários (GOUGEON & BUSO, 2000). Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais são pouco conhecidos. Provavelmente, acredita-se que a sua ativação seja regulada por um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios originários do ovário (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

2.3.2 Crescimento de folículos primários e secundários

Os folículos primários de caprinos possuem diâmetro de aproximadamente 50 μ m e são primeiramente observados em ovários caprinos por volta do 71º dia de vida fetal (BEZZERRA et al., 1998). Durante o crescimento dos folículos primários, as células da granulosa sofrem proliferação e há um aumento do oócito no seu tamanho e conteúdo protéico (PICKTON et al., 1998; KNIGHT & GLISTER, 2006). Quando duas ou mais camadas de células da granulosa se desenvolvem e as células da teca podem ser evidenciadas do estroma circundante, os folículos secundários são formados (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Os folículos secundários são formados em ovários de fetos de cabras aproximadamente no 80º dia de gestação (BEZZERRA et al., 1998). Os fatores locais que têm sido envolvidos na transição de folículos primários para secundários são: Fator

de Diferenciação e Crescimento 9 (GDF-9) – (camundonga: DONG et al., 1996), Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) – (ovelha: GALLOWAY et al., 2000), Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (FGFb) – (vaca: NUTTINCK et al., 1996), Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β) – (camundonga: LIU et al., 1999) e Fator de Crescimento Epidermal (EGF) – (vaca: WANDJI et al., 1996b).

Os folículos secundários, com duas camadas de células da granulosa completas até a formação do antro inicial possuem diâmetros de 80 a 130 μm , respectivamente (BEZERRA et al., 1998). Dentre os componentes locais, incluindo os fatores intra-foliculares os quais estão envolvidos com o desenvolvimento dos folículos secundários destacam-se: ativina-A (rata: ZHAO et al., 2001, ovelha: THOMAS et al., 2003), Hormônio do Crescimento (GH) – (rata: LIU et al., 1998), EGF e IGF-I (vaca: GUTIERREZ et al., 2000), GDF-9 (camundonga: HAYASHI et al., 1999) e BMP-15 (ovelha: JUENGEL et al., 2002a). Gonadotrofinas como FSH (vaca: GUTIERREZ et al., 2000) e LH (camundonga: WU et al., 2000) podem também promover o crescimento de folículos secundários.

2.3.3 Formação dos folículos antrais

A próxima fase da foliculogênese, em que os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, é caracterizada pelo crescimento dos folículos secundários e pela organização das células da granulosa em várias camadas com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antro. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006).

Os folículos antrais ($>130 \mu\text{m}$) são primeiramente observados em ovários caprinos no 110º dia de desenvolvimento fetal (BEZERRA et al., 1998). O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, 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 manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006).

2.4. População e atresia folicular

Os Folículos Ovarianos Pré-Antrais (FOPA) representam cerca de 90% da população folicular ovariana e constituem o estoque de gametas femininos (LIU et al., 2001). Entretanto recentemente, trabalhos têm questionado se esse estoque é finito, haja vista que alguns autores sugeriram a formação, após o nascimento, de novas células germinativas em mulheres (BUKOVSKY et al., 2004) e camundongas (JOHNSON et al., 2004) adultas. Independente disso, a população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma forte variação individual (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), sendo de aproximadamente 1.500 folículos na camundonga (SHAW et al., 2000); 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999); 114.000 na gata (LIMA, 2006); 160.000 na ovelha (DRIANCOURT, 1991); 235.000 na vaca (BETTERIDGE et al., 1989) e 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). Apesar da grande população folicular presente no ovário mamífero, a maioria dos folículos (99,9%), não chega à ovulação, sendo eliminados por um processo natural denominado atresia (FIGUEIREDO et al., 2002). Esse processo de morte folicular pode ocorrer por via apoptótica (MARKSTRÖM et al., 2002) ou degenerativa (BRAS et al., 2005).

A atresia por apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo determinado geneticamente, ou seja, depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos e tem como característica marcante a fragmentação do DNA (HUSSEIN, 2005). De acordo com o estímulo apoptótico inicial, a apoptose pode ocorrer através de receptores de superfície celular, constituindo a via extrínseca, ou ainda através da mitocôndria, constituindo esta a via intrínseca (JOZA et al., 2002). Duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: a família das caspases e a família Bcl-2. As caspases são consideradas as executoras principais da via apoptótica e atuam ativando DNases, que são endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal a cada 180-200 pares de bases. A família Bcl-2 compreende tanto membros anti-apoptóticos, como o Bcl-2 e membros pró-apoptóticos, incluindo Bax, Bid, Bik (MARKSTRÖM et al., 2002).

Já no que se refere ao processo degenerativo (necrose), este é iniciado por uma perda da homeostase celular e é caracterizado pela lise e desintegração da célula (WIEGELE et al., 1998; BRAS et al., 2005). Geralmente, a degeneração é iniciada por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência de níveis de adenosina trifosfato – ATP (BATHIA, 2004) ou trauma, que levam a danos irreversíveis na célula

(McCULLY et al., 2004).

A atresia, seja por meio da apoptose ou por degeneração, é um processo que pode acometer qualquer estágio de desenvolvimento folicular, sendo, no entanto, predominante na fase antral (MARKSTRÖM et al., 2002). Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (MORITA & TILLY, 1999). Isto pode ocorrer após a formação da cavidade antral a qual altera toda a estrutura do oócito e células da granulosa, sendo observado as primeiras alterações de atresia nas células da granulosa inicialmente.

Apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz significativamente o número de oócitos que seriam ovulados, diminuindo assim o potencial reprodutivo do animal. Diante disso, visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários modelos de cultivo *in vitro* que possibilitam o estudo dos fatores que controlam a atresia e estimulam o crescimento folicular.

2.5 Cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

O objetivo principal do cultivo *in vitro* de FOPA é permitir o desenvolvimento folicular assegurando o crescimento e maturação dos oócitos, bem como a multiplicação e posterior diferenciação das células da granulosa inclusas nesses folículos (FIGUEIREDO et al., 2002). O cultivo de ovários 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 desenvolvimento de folículos primordiais (O'BRIEN et al., 2003).

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (FORTUNE, 2003). Em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível utilizar este modelo. Para estes animais, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos primários caprinos (SILVA et al., 2004a), bovinos (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997) e humanos (SCOTT et al., 2004 e ZHANG et al., 2004). Folículos humanos

permaneceram viáveis por quatro semanas quando cultivados em sistema *in situ* (HOVATTA et al., 1997). Durante o cultivo *in vitro* de FOPA caprinos (*in situ*), uma das substâncias mais utilizadas é o FSH, a concentração de 50 ng/mL demonstrou manter a integridade morfológica, além de estimular a ativação de folículos primordiais e o crescimento de FOPA caprinos após 7 dias de cultivo (MATOS et al. 2007a). O cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano tem a vantagem de manter a integridade estrutural folicular e as interações entre as células foliculares e células do estroma, facilitando a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1996; ABIR et al., 2006).

2.6 Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

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). A produção de embriões proveniente de oócitos derivados de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* foi relatada em ratas (DANIEL et al., 1989), porcas (WU et al., 2001) e, recentemente, em búfalas (GUPTA et al., 2008), ovelhas (ARUNAKUMARI et al., 2010) e cabras (MAGALHÃES et al., 2011). Em gatas (JEWGENOW & STOLTE, 1996), gambás (BUTCHER & ULLMAN, 1996) e macacas (FORTUNE et al., 1998) já foi observado o crescimento de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Nas espécies bovinas (ITOH et al., 2002), ovinas (CECCONI et al., 1999), caprinas (HUANMIN & YONG, 2000), humana (ROY & TREACY, 1993a) e canina (SERAFIM et al., 2010) observou-se apenas o desenvolvimento até o estágio antral a partir do cultivo de folículos secundários avançados.

Os maiores avanços do cultivo folicular foram alcançados em roedores, tendo sido obtido o nascimento de crias viáveis a partir do cultivo de oócitos provenientes de folículos pré-antrais de camundongas, em que o oócito adquiriu competência para maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (O' BRIEN et al., 2003; HASEGAWA et al., 2006). Tal crescimento foi obtido por meio de dois sistemas de cultivo (*in situ* e isolado), chamado de cultivo “em dois passos” (O'BRIEN et al., 2003). O primeiro passo consistiu no cultivo de ovários inteiros para obtenção da transição de primordial para primário. O segundo passo consistiu no isolamento e cultivo de folículos primários e secundários. Provavelmente essa estratégia é necessária para

promover o crescimento de folículos primordiais de espécies domésticas e primatas (SILVA et al., 2006). Esses diferentes resultados refletem diretamente, a dificuldade da técnica e a diferença entre as espécies.

O limitado conhecimento sobre a regulação das diferentes etapas da foliculogênese e das condições necessárias para o crescimento, diferenciação e maturação dos oócitos são as principais causas do limitado sucesso na obtenção de crias a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* em animais domésticos. Uma revisão mais detalhada sobre a regulação da foliculogênese em mamíferos é apresentada no Capítulo 2 da presente tese. O presente desafio é determinar condições de cultivo apropriadas para dar suporte à transição de folículos primários para secundários *in vitro*, visto que esta fase apresenta alta sensibilidade à degeneração em virtude da alta atividade biosintética e consumo de nutrientes, sendo a composição do meio um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (WANDJI et al., 1997).

2.7 Importância da composição do meio de cultivo no desenvolvimento de folículos pré-antrais

A composição do meio de cultivo é um importante fator para o sucesso do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e pode ser influenciada pela adição de diferentes substâncias, incluindo antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, monossacarídeos, etc.), diferentes fontes protéicas, antioxidantes, hormônios e diversos fatores de crescimento (FIGUEIREDO et al., 2008). Dentre os meios de cultivo de base comumente utilizados para folículos pré-antrais, destacam-se o Meio Essencial Mínimo (MEM) simples (MATOS et al., 2007a) ou alfa-modificado (α -MEM – SILVA et al., 2011), o Meio de Cultivo Tecidual 199 (TCM199 – RAJARAJAN et al., 2006), e os meios Waymouth (MURUVI et al., 2005) e McCoy's (TELFER et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que a adição de diferentes suplementos ao meio de cultivo, como piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), aumentou o percentual de folículos morfolologicamente normais e estimulou o crescimento folicular (SILVA et al., 2004a; DEMEESTERE et al., 2005). A insulina é normalmente adicionada ao meio de cultivo como fator de sobrevivência, permitindo

um melhor aproveitamento das fontes de energia do meio e aumentando os precursores metabólicos como aminoácidos e glicose (LIU et al., 2002). Os antioxidantes, selênio e transferrina, são relatados como importantes substâncias a serem adicionadas ao meio. Alguns autores sugerem que o processo de maturação folicular está relacionado aos altos níveis de transferrina e seus receptores na célula e que o selênio pode ser adicionado ao meio de cultivo para ativar enzimas envolvidas na detoxificação e eliminação de radicais livres (DEMEESTERE et al., 2005). Além disso, tem-se observado que o ácido ascórbico, importante antioxidante, também atua benéficamente sobre a foliculogênese, promovendo uma redução da apoptose em folículos pré-antrais de camundongos (MURRAY et al., 2001) e estimulando a manutenção da viabilidade folicular em caprinos (ROSSETTO et al., 2009) após cultivo de longa duração.

Além de todos os suplementos supracitados, estudos *in vivo* e *in vitro* têm destacado a grande importância da utilização de hormônios e fatores de crescimento no meio de cultivo folicular para a promoção do completo e eficiente desenvolvimento dos folículos pré-antrais *in vitro*. Tais substâncias podem ser adicionadas ao cultivo isoladamente ou associadas. Nesse contexto, e com o intuito de estudar o efeito de importantes fatores de crescimento e hormônios no desenvolvimento folicular em caprinos, experimentos com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais foram realizados nesta espécie utilizando as substâncias T_4 , IGF-I e hFSH, os quais serão abordados nos Capítulos 3 a 7 desta tese.

2.7.1. Tiroxina - T_4

A tiroxina também chamada de tetraiodotironina (T_4), é um importante hormônio tireoidal sintetizado pela glândula tireóide junto com a T_3 – triiodotironina (T_3). Cerca de 93% do hormônio liberado pela glândula tireóide consiste, normalmente, de tiroxina, enquanto a triiodotironina responde pelos outros 7%. Toda a síntese dos hormônios tireóideos é regulada pelo hormônio estimulante da tireóide, ou tireotropina (TSH), secretada pela hipófise anterior. Este hormônio é transportado pelo sangue, formando um complexo com as proteínas do plasma (liga-se 99% as proteínas plasmáticas, principalmente a globulina tireóidea) e é degradada no fígado. Os hormônios tireoideanos armazenam-se no interior dos folículos tireoideanos na forma de tireoglobulina. Posteriormente, a tireoglobulina se fragmenta em numerosos

fragmentos pequenos, liberando T_3 e T_4 na circulação. Os hormônios, então, ligam-se a proteínas plasmáticas e assim circulam em nossa rede vascular, atingindo quase todas as células do nosso corpo. (GUYTON & HALL, 2002).

A influência da tiroxina na foliculogênese ovariana já é conhecida (DICKSON, 1996). No entanto, seu efeito no desenvolvimento de folículos pré-antrais de animais domésticos, tem sido pouco investigado. TAMURA et al. (1998) relataram pela primeira vez que a tireoidectomia quando utilizada em camundongas imaturas melhora a secreção de inibina e estradiol durante o desenvolvimento ovariano induzido por Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG). Estudos *in vivo* mostraram que T_3 desempenha importante papel na regulação do crescimento folicular ovariano (DIJKSTRA et al., 1996). *In vitro*, ARUNAKUMARI et al. (2007), verificaram que a tiroxina quando associada ao FSH aumentou as taxas de desenvolvimento folicular, formação de antro e competência meiótica após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos por 6 dias. TAMILMANI et al. (2005) obtiveram oócitos meioticamente competentes pela primeira vez a partir de pequenos e grandes folículos pré-antrais em ovinos cultivado *in vitro* em meio suplementado com TGF- α e FSH. Entretanto, CECCONI et al. (2004) observaram que altas concentrações de T_3 no meio de cultivo de folículos pré-antrais de camundongas tem uma influência adversa no crescimento e subsequente maturação dos oócitos. Além disso, ARUNAKUMARI et al. (2007) relataram que a adição de T_4 anulou a influência positiva de TGF- α e que a resposta de grandes folículos a tiroxina é muito diferente que a dos folículos pré-antrais pequenos. Diante disso, alguns autores têm sugerido que níveis alterados de T_4 podem influenciar na fertilidade de mamíferos (CECCONI et al., 2004).

2.7.2. Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I - IGF-I

A regulação do funcionamento ovariano em mamíferos envolve a participação de diferentes elementos que compõem o sistema de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), a qual inclui os fatores I e II (IGF-I e IGF-II); os receptores do tipo I e II (IGFR-I e IGFR-II) para os IGFs e as proteínas ligantes (transportadoras – IGFBPs) para esses fatores de crescimento (ADASHI et al., 1985; GIUDICE, 1992; LeROITH et al., 1995). A biodisponibilidade e conseqüentemente a ação dos IGFs é regulada em parte por uma superfamília de proteínas homólogas denominadas de IGFBPs, que ligam

às IGFs com grande afinidade, designadas de IGFBP-1 até IGFBP-6 (RAJARAM et al., 1997).

O fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) é um polipeptídeo composto por 70 aminoácidos, estruturalmente e funcionalmente relacionado à insulina, conhecido por sua capacidade de promover o crescimento e a diferenciação celular. Embora tradicionalmente visto como um produto hepático, o IGF-I pode ser sintetizado em diversos tecidos, nos quais exerce importantes funções autócrinas e parácrinas (DAUGHADAY & ROTWEIN, 1989). O IGF-I foi inicialmente denominado de somatomedina C e identificado como um mediador da ação do hormônio do crescimento (GH) ou somatotrofina (ST), que ativa rapidamente a transcrição do gene do IGF-I e também regula alterações na estrutura da cromatina dentro do gene do IGF-I, delineando desta forma um alvo dentro da cromatina para a ação do GH (THOMAS et al., 1994).

Conforme citado acima, o sistema IGF é composto por dois tipos de receptores, o receptor do tipo I, ou seja, IGFR-I, e o receptor do tipo II (IGFR-II) ou IGF-II/manose-6-fosfato (IGF-II/M6P) (ADASHI, 1998). O IGFR-I é uma proteína tipo tirosina quinase transmembranária que consiste de duas subunidades α e duas β extracelular e possui uma expressiva homologia com o receptor da insulina (SILVA et al., 2009; IZADYAR et al., 1998, LeROITH et al., 1995). Em adição ao IGF-I, o receptor do tipo I de IGF também podem se ligar IGF-II e insulina, embora com menor afinidade, bem como parece interagir com as IGFBPs (MOHSENI-ZADEH; BINOUX, 1997). As IGFBP estão presentes em todos os fluidos biológicos e atuam inibindo ou potencializando a ação dos dois tipos de IGF nas células alvo (MONGET et al., 2002). Existem dois grupos de IGFBP: (1) IGFBP-1, -2, -4, -5, -6 (24-35 kDa) e (2) IGFBP-3 (150kDa) que é a forma mais predominante no soro (MONGET et al., 2002; SILVA, 2008). Os níveis de IGFBP-2, -4 e -5 em ruminantes, diminuem e aumentam dramaticamente durante o crescimento folicular na fase terminal e atresia, respectivamente. Em particular, a expressão do RNAm da IGFBP-2 diminui durante o crescimento folicular em ovários de ovinos, bovinos e suínos e a expressão de RNAm da IGFBP-5 aumenta em células da granulosa de folículos atresícos de bovinos e ovinos. Em ovários de suínos e roedores, o IGF-I tem sido localizado nas células da granulosa de folículos antrais saudáveis enquanto que o IGF-II foi encontrado nas células da granulosa de folículos saudáveis e atresícos (ZHOU et al., 1996). Em ovinos, ambos receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários,

secundários e antrais (MONGET et al., 1989). O IGF-I, adicionado durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, estimulou o crescimento folicular em humanos (LOUHIO et al., 2000), bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), ratos (ZHAO et al., 2001) e camundongos (LIU et al., 1998) em sinergia com o FSH. Experimentos de Zhou e Zhang (2005) mostraram que o IGF-I na concentração de 100 ng/L proporcionou o crescimento e a viabilidade de oócitos inclusos em folículos pré-antrais caprinos. Em folículos pré-antrais bovinos, a utilização de 50 ng/mL de IGF-I, durante seis dias de cultivo, promoveu o aumento do diâmetro folicular bem como a produção de estradiol (THOMAS et al., 2007). Em suínos, a utilização dessa mesma concentração de IGF-I resultou no crescimento folicular, no estímulo da proliferação das células da granulosa e na prevenção da apoptose de folículos pré-antrais cultivados por 4 dias na presença de soro. Em camundongos, o IGF-I (10, 50 e 100 ng/mL) aumentou a esteroidogênese de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por 6, 10 e 12 dias (DEMEESTERE et al., 2004). Em ratos, o IGF-I (1-100 ng/mL) estimulou o desenvolvimento de folículos secundários comprovado pelo aumento significativo do diâmetro folicular e do conteúdo do DNA.

2.7.3. Hormônio Folículo Estimulante - FSH

O hormônio gonadotrófico FSH é fundamental para a manutenção da função ovariana. A interação deste hormônio com seu receptor de superfície iniciam uma cadeia de reações intracelulares características de receptores acoplados à proteína-G, incluindo estimulação de adenilato ciclase e fosforilação de proteínas específicas (RICHARDS, 1994). A ligação do FSH ao seu receptor é restrita às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular, síntese de esteróides e expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Hormônio Luteinizante (LH).

A expressão de receptores para o FSH nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais bovinos, bem como em oócitos de folículos primordiais de animais de laboratório, reforçam a idéia da ação do FSH sobre o crescimento dos folículos pré-antrais (ROY, 1993b, WANDJI et al., 1992). Durante o cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70 μ m) bovinos, o FSH promoveu um aumento do diâmetro folicular (HULSHOF et al., 1995). Após seis dias de cultivo na presença de FSH, folículos primários e secundários (60-179 μ m), isolados enzimaticamente de

ovários de fetos bovinos, aumentaram o diâmetro, a sobrevivência folicular, bem como a secreção de progesterona e estradiol (WANDJI et al., 1996a). Gutierrez et al. (2000) isolaram folículos secundários bovinos e, após cultivo de 28 dias, observaram que o FSH promoveu o crescimento folicular e aumentou as taxas de formação de antro. Em suínos, o FSH está envolvido na proliferação e diferenciação de células da granulosa de folículos pré-antrais (HIRAO et al., 1994).

Em hamsters, pequenos folículos pré-antrais mostraram ser dependentes de FSH, pois esse hormônio reduziu significativamente a percentagem de folículos atrésicos (ROY & GREENWALD, 1989). Liu et al. (1999) observaram que o FSH estimulou o crescimento de folículos pré-antrais (95–120 μm) isolados de ovários de camundongas adultas. Nesta mesma espécie, o FSH promoveu a sobrevivência, a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a secreção de estradiol e inibina em folículos isolados (95–142 μm) (CORTVRINDT et al., 1997).

Matos et al. (2007a) mostraram que 50 ng/mL de FSH adicionado ao meio de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de caprinos foi responsável pela manutenção da viabilidade e da integridade ultra-estrutural dos folículos pré-antrais, e pelo aumento dos diâmetros folicular e oocitário. Contrariamente, o FSH não exerceu efeito sobre o diâmetro folicular e oocitário, bem como sobre o número de células da granulosa cultivadas em tecido ovariano de bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997). Além disso, não foi observado o efeito da adição de 5 ng/ml de FSH (DERRAR et al., 2000), ou de outras concentrações de FSH (1, 10 ou 100 ng/ml) sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos cultivados durante 7-14 dias (FORTUNE et al., 1998).

Através da indução da liberação de fatores de crescimento pelos grandes folículos antrais e células do estroma, o FSH pode exercer um efeito indireto sobre o desenvolvimento de folículos em fases iniciais, pois estudos evidenciaram que o FSH promove a proliferação de células da granulosa, aumentando a expressão de fatores parácrinos como o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e a ativina (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

3. JUSTIFICATIVA

Os folículos primordiais constituem o *pool* de reserva de folículos quiescentes e compreendem cerca de 95% de toda população folicular presente no ovário mamífero. No entanto, para que estes folículos possam entrar em fase de crescimento é preciso que sejam ativados. Neste contexto, sabendo-se do grande valor econômico que a espécie caprina representa em especial para o Nordeste Brasileiro, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo capaz de ativar esses folículos e assegurar seu posterior crescimento *in vitro*, otimizando o aproveitamento do potencial oocitário desses animais e incrementando a eficiência da reprodução animal. Os oócitos oriundos destes folículos crescidos *in vitro* poderiam ser utilizados em programas de produção *in vitro* e transferência de embriões e/ou criopreservação. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão sobre os fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral, necessários para a sobrevivência, a ativação e o início do crescimento folicular.

Estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais são escassos, especialmente em animais de produção, como os caprinos. Neste contexto, diversos autores têm investigado o efeito de diferentes fatores de crescimento e hormônios durante o cultivo de folículos pré-antrais de animais de laboratório e de animais domésticos como vaca, ovelha e cabra. Entretanto, os efeitos de diferentes concentrações de T₄, hFSH e IGF-I, que são importantes reguladores da foliculogênese, bem como suas interações ainda não haviam sido testados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Para este fim, além da técnica de histologia clássica, foi empregada a microscopia eletrônica de transmissão para determinar a qualidade de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* e, conseqüentemente, melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivo testados.

Com o desenvolvimento de um eficiente sistema de cultivo, será possível, no futuro, a utilização dos oócitos oriundos de uma numerosa população de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* em diversas biotécnicas reprodutivas, dentre elas a fecundação *in vitro*, contribuindo assim para a produção de embriões em larga escala.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto, formularam-se as seguintes hipóteses científicas:

- 1) A T_4 , IGF-I e o FSH, isoladamente ou em associação, mantém a viabilidade folicular, influenciam positivamente a ativação de folículos primordiais e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos após cultivo *in situ*.
- 2) Folículos pré-antrais caprinos crescem *in vitro* na presença dos referidos hormônios e fator de crescimento, mantendo a viabilidade, após cultivo de longa duração (28 dias).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos Gerais:

- 1) Estudar o efeito da T₄, IGF-I e FSH sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos *in situ* (Fase I);
- 2) Avaliar as taxas de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos *in situ* utilizando T₄, IGF-1 e FSH em associação nas melhores concentrações determinadas na Fase I - (Fase II);
- 3) Avaliar as taxas de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos *in situ* após cultivo de longa duração no (s) melhor (es) meio (s) de cultivo determinado na Fase II – (Fase III).

5.2 Objetivos Específicos:

- 1) Estabelecer a curva dose-resposta de T₄, IGF-I e FSH tendo como parâmetros a sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais (Fase I);
- 2) Analisar morfológica e ultra-estruturalmente os folículos pré-antrais caprinos *in situ* cultivados *in vitro* com T₄, IGF-I e FSH (Fase I);
- 3) Verificar o efeito da T₄, IGF-I e FSH em associação, sobre a sobrevivência, ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos *in situ* (Fase II);
- 4) Analisar morfológica e ultra-estruturalmente os folículos pré-antrais caprinos *in situ* cultivados *in vitro* com T₄, IGF-I e FSH, em associação nas melhores concentrações determinadas na Fase I – (Fase II);
- 5) Verificar o efeito do cultivo *in situ*, e do período de cultivo, sobre a sobrevivência, ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos após cultivo de longa duração (Fase III);

- 6) Analisar as características morfológicas e ultra-estruturais de folículos pré-antrais caprinos *in situ* após cultivo de longa duração (Fase III).

Nas páginas seguintes, após as referências bibliográficas serão apresentados os dois primeiros capítulos desta Tese, correspondendo a dois artigos de revisão que foram submetidos recentemente e estão sob revisão. Além disso, em seguida, serão apresentadas as metodologias e os resultados desta Tese na forma de cinco capítulos referentes a cinco artigos científicos. Vale salientar que os cinco artigos científicos encontram-se em fase de julgamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*, v. 21, p. 887-898, 2006.

ADASHI, E. Y.; RESNICK C. E.; D'ERCOLE A. J.; SVOBODA M. E.; VAN WYK J. J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine Review*, v. 6, n. 3, p. 400-420, 1985.

ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 39, p.13-19, 1998.

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. *J Small Rum Res*, v. 37, p. 269-277, 2000.

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.

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

BARNETT, K.R., SCHILLING, C., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*, v. 12, p. 537-355, 2006.

BHATIA, M. Apoptosis versus necrosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 284, p. F608–F627, 2004. Review.

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. J. Reprod. Fert, v. 109, p. 165-171, 1997.

BRAS, M., QUEENAN, B., SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. Biochemistry, v. 70, p. 231-239, 2005.

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

BUKOVSKY, 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*. Reprod Fert Develop, v. 8, p. 535-539, 1996.

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

CECCONI, S.; ROSSI, G.; COTCCHIO, G.; MACCHIARELLI, G.; BORINI, A.; CANIPARI, R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development *in vitro*. Fertility and Sterility, v. 81, p. 1, 2004.

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.

CORTVRINDT, R. SMITZ, J. VAN STEIRTEGHEM, A.C. Assesment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. Human Reprouction., 12:59-768, 1997.

DANIEL, S. A. J.; ARMSTRONG, D. T.; GORELANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. Gamete Res, v. 24, p. 109–121, 1989.

DAUGHADAY, W. H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. Endocrine Reviews, v.10, p. 68-92, 1989.

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.

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. 147-157, 2005.

DERRAR, N.; PRICE, C.A.; SIRARD, M. A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. Theriogenology, v. 54, p. 587-598, 2000.

DICKSON, W. M.; Endocrinology In: Swenson, M.J., Reece, W. O., Reproduction and Lactation. Ducke's Physiology of Domestic Animals. Panima Publishing Corporation, New Delhi, p. 629-710, 1996.

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

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v. 383, p. 531-535, 1996.

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

DRUMMOND, A.E. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 4, p. 1-11, 2006.

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

ERICKSON, G.F. Role of growth factors in ovary organogenesis. *J Soc Gynecol Investig*, v. 8, p. 13-16, 2001.

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, Roca: São Paulo, 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. *Biol Reprod*, v. 64, p. 1153-1159, 2001.

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.

FORTUNE, J.E., CUSHMAN, R.A., WAHL, C.M., KITO, S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, v. 163, p. 53-60, 2000.

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.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W.; BEATTIE, A.E.; DAVIS, G.H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, v. 25, p. 279-283, 2000.

GIUDICE, L. C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Review*, v. 13, n. 4, p. 641-69, 1992.

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

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, 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.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 10 ed, Rio de Janeiro, guanabara koogan, pp. 973, 2002.

HAFEZ, 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.

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA, K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, v. 86, n. 4, p. 1182-1192, 2006.

HAYASHI, M., McGEE, E.A., MIN, G., KLEIN, C., ROSE, U.M., VAN DUIN, M., HSUEH, A.J.W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early follicles. *Endocrinology*, v. 140, p. 1236-1244, 1999.

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

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

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*, 44:217-226, 1995.

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

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

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. *Biol Reprod*, v. 67, p. 1099-1105, 2002.

IZADYAR, F.; HAGE, W. G.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 49, p. 444-453, 1998.

JEWGENOW, K.N. & STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Anim Reprod Sci*, v. 44, p. 183-193, 1996.

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. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v. 122, p. 303-315, 2004.

JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genetic*, v.18, p. 142–149, 2002.

JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; READER, K.L.; LAWRENCE, S.B.; O’CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.E.; CRANFIELD, M.

GROOME, O.R.; McNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod*, v. 67, p. 1777-1789, 2002.

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

KNIGHT, P. G. GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 132, p. 191-206, 2006.

LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS, C. T. J. R. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology Review*, v. 16, p.143-163, 1995.

LIMA, A. K. F. Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. Fortaleza, CE, Universidade Estadual do Ceará, Tese de doutorado, 76 p., 2006.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v. 139, p. 2342-2347, 1998.

LIU, X., ANDOH, K., ABE, Y., KOBAYASHI, J., YAMADA, K., MIZUNUMA, H., IBUKI, Y. A comparative study on transforming growth factor- β and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*, v. 139, p. 2480-2485, 1999.

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.

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.

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

MAGALHÃES, D.M.; ARAUJO, V.R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SILVA, R.C.; LUCCI, C.M.; BAO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability *in vitro*. II International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR 2008).

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v.75, p. 182–88, 2011.

MAGOFFIN, D.A. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 37, p. 1344-1349, 2005.

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. Review.

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.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 15, p. 173-182, 2007a.

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; LOPES, C.A.P.; MARTINS, F.S.; SANTOS, K.D.B.; ROCHA, R.M.P.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 677-684, 2007b.

McCULLY, J.D.; WAKIYAMA, H.; HSIEH, Y-J.; JONES, M., LEVITSKY, S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart Circulation Physiology*, v. 286, p. H1923-H1935, 2004

McGEE, E.A, & HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.*,21:200-214, 2000.

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

MOHSENI-ZADEH, S.; BINOUX, M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. *Endocrinology*, v. 138, p. 5645-5648, 1997.

MONGET, P; MONNIAUX, D.; DURAND, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, v. 125, p. 2486-2493, 1989.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSSEN, J.M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, n.1-2, p. 139-154, 2002.

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

MURRAY, A. A.; MOLINEK, M. D.; BAKER, S. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F.; HILLIER, S. G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction*, v. 121, n. 1, p. 89-96, 2001.

MURUVI, W.; PICTON, H.M.; RODWAY, R.G.; JOYCE, I.M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology*, v. 64, p. 1357-1370, 2005.

NUTTINCK, F.; COLLETE, L.; MASSIP, A.; DESSY. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigation. *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. *Biol Reprod*, v. 68, p. 1682-1686, 2003.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v. 145, p. 27-37, 1998.

RAJARAM, S.; BAYLINK, D.J.; MOHAN, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocrine Reviews*, v.18, p. 801-831, 1997.

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

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. Endocrine Review, v. 15, p.725-751, 1994.

ROSSETO, R., LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T. ; SARAIVA, M. V. A. ; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. S.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; NAME, K. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. Domestic Animal Endocrinology, v. 37, n. 2, p. 112–123, 2009.

ROY, S.K.; GREENWALD G.S. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. Journal of Reproduction and Fertility, v. 87, p. 103-114, 1989.

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

ROY, S.K. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. Biology of Reproduction, v. 48, p. 552-557, 1993b.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat, v. 24, p. 77-92, 1983.

SAUMANDE, J. Oogênese et folliculogênese. Rec. Méd. Vét., v. 157, p. 29-38, 1991.

SCOTT, J.E., CARLISSON, I.B., BAVISTER, B.D., HOVATTA, O. Human ovarian tissue cultures: Extra cellular matrix composition coating density and tissue dimensions. Reprod. Biomedicine On Line., v. 9, p. 287-293, 2004.

SERAFIM, M.K.B.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.G.; ALMEIDA, A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, v. 74, p.749-755, 2010.

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

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, 2004a.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK; 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 culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81: 273–286, 2004b.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. V. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Molecular Reproduction and Development*, v. 70, p. 11-19, 2004c.

SILVA, J.R.V. Growth factors in gota ovarios and the role of ativina-A in the development of esrly-staged follicles. Phd Thesis. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 142, 2005.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote*, v. 14, p. 317-328, 2006

SILVA, J.R.V. Growth factors in gota ovarios and the role of ativina-A in the development of early-staged follicles.2005. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, 2005. Silva 2008.

SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. In press, 2009.

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

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v. 5, p. 461-471, 2005.

SMITZ, J.E.J. & CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, v. 123, p. 185-202, 2002.

SUH, C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v. 3, p. 5-12, 2002.

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

TAMURA, K; HATSUTA, M; WATANABE, G; TAYA, K; KOGO, H. Inhibitory regulation of inhibin gene expression by thyroid hormone during ovarian development in immature rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 242, p. 102-108, 1998.

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

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

THOMAS, M. J.; KIKUCHI, K.; BICHELL, D.P.; ROTWEIN, P. Rapid activation of rat insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone reveals no alterations in deoxyribonucleic acid- protein interactions within the major promoter. *Endocrinology*, v. 135, p. 1584-1592, 1994.

THOMAS, F.H., ARMSTRONG, D.G., TELFER, E.E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinology*, v. 1, p. 76, 2003.

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*, 63:1717-1751, 2005.

VELAZQUEZ, M. A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*, v.137, p.161-180, 2009.

WANDJI, S., FORTIER, M.A., SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 46, p. 1034-1041, 1992.

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, 1996a.

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

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

WIEGELE, G., BRANDIS, M., ZIMMERHACKL, L.B. Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK₁ and MDCK). Nephrology Dialysis Transplantation, v. 13, p. 1158-1167, 1998.

WU, J.; NAYUDU, P. L.; KIESEL, P. S.; MICHELMANN, H. W. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. Biology of Reproduction, v. 63, p. 320-327, 2000.

WU, J., BENJAMIN, R.E., CARRELL, D.T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. Biol Reprod, v. 64, p. 375-381, 2001.

ZHANG, P.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; HEINSSON, J.; TELFER, E.E.; HOVATTA, O. *In vitro* effect of cyclic adenosine 3',5'-Monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. Journal Assisted Reproduction Genetic. v. 21, p. 301-306, 2004.

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

ZHOU, J.; ADESANYA, O.O.; VATZIAS, G.; HAMMOND, J.M.; BONDY, C.M.; Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. Endocrinology, v. 137, p. 4893, 1996.

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

7. CAPÍTULO I

Caracterização estrutural do Hormônio Folículo Estimulante e seu papel na fisiologia de células ovarianas

(Structural Characterization of the Follicle Stimulating Hormone and its role in the physiology of ovarian cells)

Caracterização estrutural do Hormônio Folículo Estimulante e seu papel na fisiologia de células ovarianas

Structural Characterization of the Follicle Stimulating Hormone and its role in the physiology of ovarian cells

Resumo

O hormônio folículo estimulante (FSH) é uma glicoproteína heterodímera sintetizada e secretada na porção anterior da hipófise (adenohipófise). O FSH desempenha ações relevantes nos estádios mais avançados do desenvolvimento e maturação folicular. Desta forma, o foco da revisão foi examinar o papel do FSH e seu mecanismo de ação e receptores no desenvolvimento folicular ovariano. O FSH exerce múltiplas funções como a ativação de mais de 100 genes que codificam diferentes respostas. A ação do FSH está restrita as células da granulosa (CGs). Esta gonadotrofina atua por meio da ativação da enzima adenilciclase na membrana plasmática, a qual forma AMPc a partir de ATP. O AMPc promove as mudanças metabólicas que caracterizam a ação gonadotrópica, normalmente por meio da fosforilação de proteínas-quinases. Durante o processo fisiológico da ovulação, os estrógenos melhoram o efeito estimulador do FSH e provocam a liberação de FSH/LH necessária para a ovulação. O próprio folículo maduro é responsável pela ovulação, pois secreta estradiol, hormônio responsável pelo pico pré-ovulatório de LH, resultando na ovulação. Diante disso, a adição de FSH aos meios de cultivo caracteriza ações importantes, como, o desenvolvimento folicular e o processo de ovulação.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, FSH, ovulação, receptores.

Abstract

The follicle stimulating hormone (FSH) is a heterodimeric glycoprotein synthesized and secreted in the pituitary anterior portion (adenohypophysis). The FSH performs important actions in the later stages of follicular development and maturation. Thus, the focus of the review was to examine the role of FSH and its mechanism of action and

receptors in ovarian follicular development. The FSH exerts multiple functions such as the activation of more than 100 genes encoding different answers. The action of FSH is restricted to the granulosa cells (GCs). This gonadotropin acts through the activation of the enzyme adenylate cyclase in the plasma membrane, which forms AMPc from ATP. The AMPc promotes metabolic changes that characterize the gonadotropic action, usually through the phosphorylation of protein kinases. During the physiological process of ovulation, estrogens enhance the stimulatory effect of FSH and cause the release of FSH/LH required for ovulation. The mature follicle itself is responsible for ovulation, as it secretes estradiol, hormone responsible for the pre-ovulatory peak of LH, resulting in ovulation. Thus, the addition of FSH to the culture media characterizes important actions, as the follicular development and the ovulation process.

Keywords: *in vitro* culture, FSH, ovulation, receptors.

Introdução

No Brasil existem aproximadamente 10 milhões de caprinos, dos quais 93% encontram-se na região Nordeste. O desenvolvimento da caprinocultura no Brasil representa uma grande fonte de produtos comerciais que incluem a carne, o leite e a pele (IBGE, 2009). Visando aumentar o potencial reprodutivo dessa espécie, diversas biotecnologias reprodutivas vêm sendo utilizadas, como a Inseminação Artificial (IA), a Fecundação *in vitro* (FIV) e a Transferência de Embriões (TE). Outras biotécnicas vêm sendo desenvolvidas mais recentemente, destacando-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).

Tem-se conhecimento de que os ovários das diferentes espécies mamíferas, como a espécie caprina, contêm milhares de ovócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais, sendo esses folículos, portanto, uma fonte potencial de gametas fertilizáveis. Com isso, é de grande interesse assegurar o crescimento *in vitro* e permitir a aquisição da competência dos ovócitos provenientes destes folículos (MCLAUGHLIN et al., 2010).

Desta forma, a biotécnica de MOIFOPA tem por objetivo promover a recuperação de um grande número de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (FOPA), no intuito de permitir o seu crescimento e completa maturação utilizando

sistemas de cultivo *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2007a). No entanto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente é um ponto crucial para a ativação, ou seja, a transição dos folículos primordiais para intermediários, primários e secundários, permitindo, assim, o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais. Esse sistema poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos hormônios e fatores de crescimento implicados na foliculogênese inicial e no processo de atresia (FIGUEIREDO et al., 2008).

Estudos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de camundongas demonstraram que é possível a obtenção de crias vivas (HASEGAWA et al., 2006). Várias pesquisas com cultivo *in vitro* de FOPA revelaram importantes fatores de crescimento e hormônios envolvidos no desenvolvimento folicular (PICTON et al., 2008). Dentre as substâncias que participam da foliculogênese inicial, merece destaque o Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH no meio de cultivo promoveu a inibição de apoptose e a formação de antro em grandes folículos secundários isolados de diferentes espécies (murina: MCGEE et al., 1997; humana: WRIGHT et al., 1999; ovina: CECCONI et al., 1999; bovina: GUTIERREZ et al., 2000; suína: MAO et al., 2002).

Neste contexto, a presente revisão de literatura destacará os aspectos relacionados à expressão de FSH e seus receptores no ovário, as vias de sinalização celular do FSH e o efeito deste sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento folicular.

Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Existem diversas substâncias, dentre hormônios e fatores de crescimento, que estão envolvidas na foliculogênese. Dentre estes, destaca-se a atuação dos hormônios hipofisários, como Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), Hormônio do Crescimento (GH) e Tireotropina (TSH), que desempenham efeitos diretos ou indiretos na manutenção da viabilidade e estímulo ao crescimento e à maturação folicular (MATOS et al., 2007; SARAIVA et al., 2008).

O FSH é uma glicoproteína heterodímera sintetizada e secretada pelas células gonadotróficas (Fig.1) presentes na porção anterior da hipófise (adenohipófise). Este hormônio, bem como as outras gonadotrofinas, parece apresentar maior relevância nos estádios mais avançados do desenvolvimento folicular (SARAIVA et al., 2010). Esta

gonadotrofina é indispensável para o desenvolvimento e maturação das gônadas na puberdade e produção de gametas durante a fase fértil da vida, além de ser implicada na manifestação do estro e na ovulação.

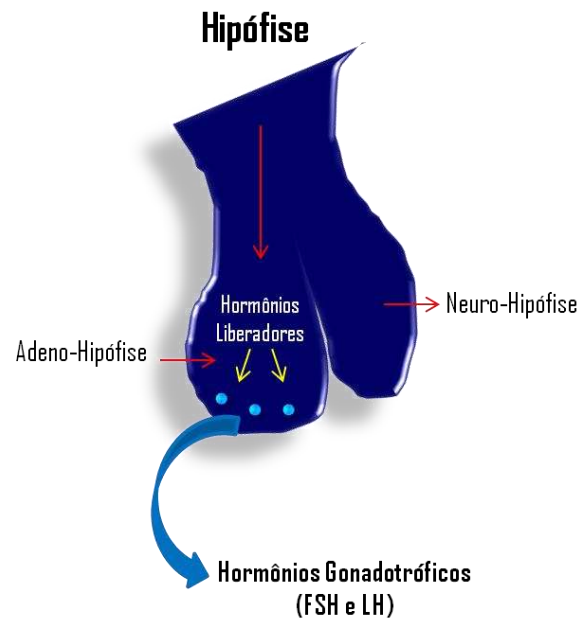


Figura 1. Estrutura esquemática da secreção de FSH

Mecanismo de ação do FSH na foliculogênese

A foliculogênese compreende todas as fases do desenvolvimento folicular, desde sua formação, ativação e crescimento até a completa maturação, sendo controlada por fatores endócrinos, parácrinos (Fig. 2) e autócrinos (MAGALHÃES et al., 2009). Ainda não estão bem elucidados os mecanismos pelos quais ocorre a regulação da fase inicial da foliculogênese, mas já é conhecido que o FSH atua sobre a ativação folicular (BETTERIDGE et al., 1989).

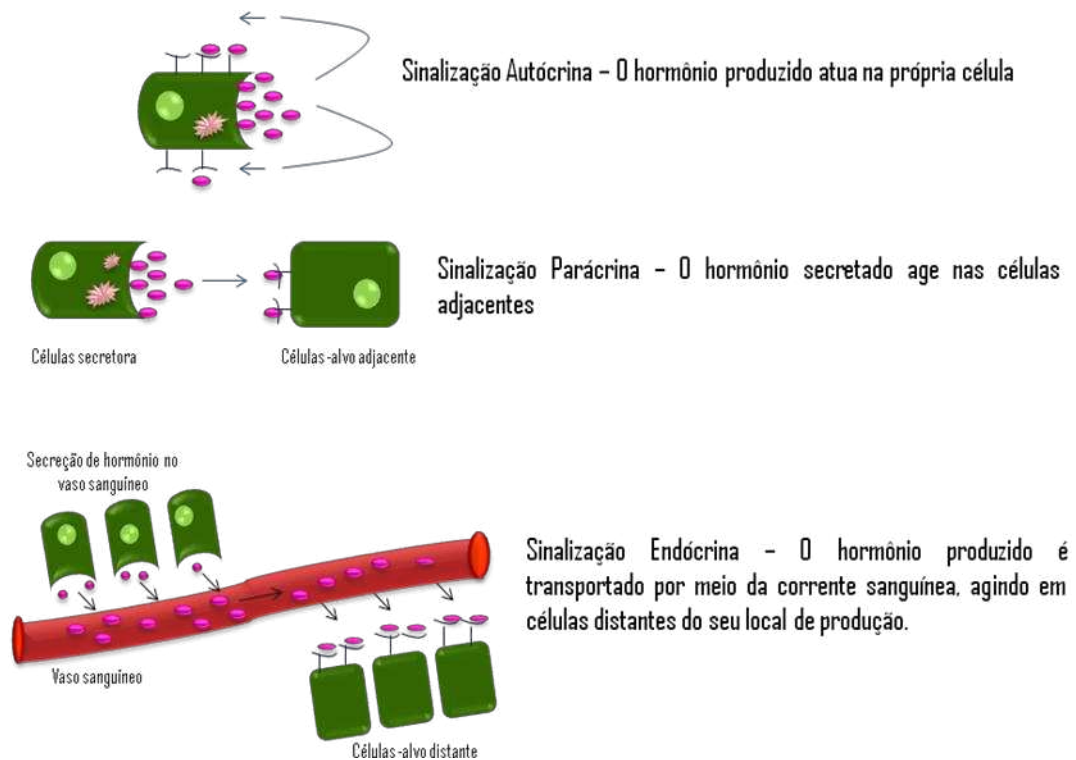


Figura 2. Representação esquemática dos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. Sinalização Autócrina: o hormônio produzido atua na própria célula. Sinalização Parácrina: o hormônio secretado age nas células adjacentes. Sinalização Endócrina: o hormônio produzido é transportado por meio da corrente sanguínea, agindo em células distantes do seu local de produção.

Alguns trabalhos demonstram ainda que o FSH é capaz de regular a expressão de diversos fatores de crescimento, tais como Kit Ligand (KL), Fator de Diferenciação do Crescimento 9 (GDF-9) e Proteína Morfogênética Óssea 15 (BMP-15). Estes, por sua vez, participam da ativação e do crescimento folicular (THOMAS et al., 2005). A passagem destes fatores ocorre por meio das junções comunicantes (gap junctions), que são canais de membrana que permitem a comunicação entre o ovócito e as células da granulosa (CGs), sendo necessários para o crescimento do gameta e aquisição da competência meiótica do citoplasma (CARABATSOS et al., 2000).

Após sofrerem a ativação, que compreende a transição do estágio de primordiais para primários, estes folículos entram em um curso pré-programado de desenvolvimento e maturação ou então sofrem o processo de atresia (FAIR, 2003). O FSH também parece

atuar neste momento, pois o mesmo promove a proliferação das CGs, a formação do antro e a inibição da atresia folicular (MAGALHÃES et al., 2009).

Em células da granulosa, o FSH mimetiza algumas ações do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) através da fosforilação e ativação da Proteína Quinase B (PKB). A ativação destas vias alternativas resulta em um controle mais preciso do estímulo do FSH à proliferação celular, esteroidogênese e apoptose nos ovários (ALAM et al., 2009).

O FSH atua por meio da sua ligação a seus receptores nas células alvo. No entanto, o mecanismo de ação e de sua transdução de sinal em células germinativas do ovário ainda não está totalmente elucidado (LIU et al., 2010). Tem sido considerado que esta transdução é mediada, principalmente, pela via Adenosina 3',5'-monofosfato Cíclico (cAMP) dependente da Proteína Quinase A (PKA) (YU et al., 2003). Trata-se de uma reação de primeira camada, em que o FSH controla a proliferação e diferenciação celular e a apoptose (LIU et al., 2010).

Nesta via, após a ligação do hormônio a um receptor específico, é desencadeada a ativação de uma enzima intracelular (adenilciclase). Esta enzima converte parte da Adenosina Trifosfato (ATP) intracelular em AMP-cíclico. Este, por sua vez, ativa a proteína Quinase dependente de cAMP, que fosforila uma série de outras proteínas, promovendo sua ativação ou inibição. Assim, o AMP-cíclico, direta ou indiretamente, executa uma série de alterações fisiológicas na célula, como ativação de enzimas, alterações da permeabilidade da membrana celular, ativação de síntese protéica e aumento de secreções (SILVA et al., 2009).

O sinal é transmitido por meio de vários mecanismos intracelulares, como a ativação de cAMP/Proteína Quinase A (PKA) e da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK). O Fator de Transcrição CREB é um dos seus substratos, o qual é responsável pela regulação da expressão de alguns genes relacionados à proliferação e esteroidogênese de células da granulosa (HUNZICKER-DUNN & MAIZELS, 2006).

É possível que o CREB atue como um mediador do efeito do FSH na proliferação das CGs. Neste caso, o FSH primeiramente estimula a produção de cAMP e/ou MAPK, que são ativadores de CREB (DAS et al., 1996). Este, por sua vez, pode ativar a proliferação de diferentes peptídeos, como ciclina D2 e ciclina B1, resultando na proliferação celular (LAUKOVÁ & SIROTKIN, 2007).

Durante a foliculogênese, os eventos referentes à multiplicação e diferenciação celular são dependentes de energia. Em condições *in vitro*, a glicólise é a principal fonte

de energia disponibilizada para os folículos pré-antrais de camundongas (BOLAND et al., 1994). O lactato é um produto originado da glicólise, sendo produzido *in vitro* pelos FOPA de camundongas. Esta substância aumenta de forma significativa, na medida em que os folículos se desenvolvem para o estágio antral. Tendo em vista que o FSH estimula a produção de lactato, este hormônio participa da metabolização da glicose, regulando desta forma o metabolismo energético dos FOPA (BOLAND et al., 1994).

Expressão de Receptores para FSH

Para a mediação da interação do FSH e dos fatores de crescimento com o ovário e suas estruturas, se faz necessário um conjunto de receptores. Estes são de extrema importância, pois na sua ausência a interação hormônio-ovário não ocorre (MÉDURI, et al., 2002). A interação do FSH com seu receptor desencadeia várias reações intracelulares que inclui a ativação de mais de 100 genes que codificam diferentes respostas (HUNZICKER-DUNN & MAIZELS, 2006), tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de esteróides e a expressão de receptores para o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), o IGF-I e o LH (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Este último estimula a expressão do gene que leva a codificação do receptor do FSH *in vitro* (MINEGISHI et al, 2000).

Os receptores de FSH (rFSH) pertencem a superfamília dos receptores que atuam pela proteína G. Esta desempenha um papel fundamental na tradução dos sinais, se ligando aos diversos receptores na superfície da membrana (SPIEGEL et al., 1996). A proteína G é heterodímera, sendo formada por subunidades (α , β e γ), composta por três domínios: um extracelular, um transmembrana (composto por sete hélices hidrofóbicas) e outro intramembranário.

A família dos receptores que atuam por meio da proteína G possui um N-terminal extracelular e um C-terminal intracelular (JOHNSON & DHANASEDARAN, 1989). Com a ativação do domínio extracelular, pela ligação do hormônio gonadotrófico, ocorrerá à ativação da proteína G pelo domínio intracelular, levando assim a uma cascata de eventos, os quais, ao final, determinarão os efeitos específicos do FSH (SIMONI et al., 1997).

A expressão do rFSH em CGs de folículos pré-antrais já foi detectada por meio de estudos a nível molecular (TISDALL et al., 1995; ZHENG et al., 1996) em ovócitos de suínos e de humanos (MÉDURI et al., 2002). Nas CGs de bovinos, os rFSH já foram

detectados em folículos primários, secundários e antrais e em ovócitos de folículos primordiais de animais de laboratório (ROY, 1993).

No intuito de determinar o estágio do folículo no primeiro momento em que ocorre a expressão do gene que codifica o rFSH, OKTAY et al. (1997) verificaram que o início da expressão do gene para este receptor ocorre em folículos com até duas camadas de CG. Os rFSH são funcionais em ovários de ratas recém-nascidas com idade de quatro a cinco dias (SOKKA & HUHTANIEMI, 1990) e a sua transcrição atinge o ápice após 10 dias de nascimento em camundongas (O'SHAUGHNESSY et al., 1997).

Influência do FSH na ovulação

O hormônio gonadotrófico FSH é crucial para a manutenção da função ovariana. A atuação do FSH é mais direcionada às CGs e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular e a síntese de esteroides (MARTINS et al., 2008). A fase folicular é definida como aquele período desde a regressão do corpo lúteo (CL) até a ovulação. O comportamento e a receptividade sexual das fêmeas durante o estro ocorrem pela produção de estradiol. Os estrógenos produzidos nestes animais também melhoram o efeito estimulador do FSH e provocam a liberação de FSH/LH necessária para a ovulação (DRIANCOURT et al., 1993).

Existem receptores nas células da teca interna e da granulosa que controlam a ação das gonadotrofinas. A ação do FSH está restrita às células da granulosa. As gonadotrofinas (FSH e LH) atuam através da ativação da enzima adenilciclase na membrana plasmática, a qual forma AMPc a partir de ATP. O AMPc promove as mudanças metabólicas que caracterizam a ação gonadotrópica, normalmente por meio da fosforilação de proteínas-quinases. O FSH estimula o complexo aromatase para produzir estradiol a partir de andrógenos. Entretanto, as CGs possuem baixa quantidade de andrógenos, tendo em vista a baixa concentração das enzimas que sintetizam estes hormônios (17 hidroxilases e C_{17,20} liases). Assim, os andrógenos devem ser fornecidos pelas células da teca interna, proveniente da estimulação pelo LH (DRIANCOURT et al., 1993).

Muitos fatores são produzidos por influência das gonadotrofinas (THOMAS et al., 2005), sendo que a passagem destes ocorre por meio da comunicação bidirecional entre o ovócito e as CGs. Esta comunicação ocorre durante todo o processo de desenvolvimento folicular por meio das junções *gap* (intercomunicantes; BUCCIONE

et al., 1990). Estas permitem a transferência de aproximadamente 85% dos metabólitos para o ovócito (BUCCIONE et al., 1990), bem como modulam a ação transcricional (De La FUENTE & EPPIG, 2001) e induzem modificações de diversas proteínas no ovócito.

Alguns estudos têm introduzido um novo conceito de que os sistemas de comunicação entre ovócitos e células foliculares somáticas são cruciais não apenas para o crescimento e a maturação dos ovócitos, mas também para a própria mitose e a diferenciação das células foliculares circundantes (MATZUK et al., 2002). Neste conceito, os ovócitos produzem fatores de crescimento, mais notavelmente a BMP-15, o KL e o GDF-9, que podem agir nas células da granulosa para regular a atividade do FSH e controlar a proliferação destas células (OTSUKA et al., 2005).

O crescimento do folículo até o estágio antral independe das gonadotrofinas. Entretanto, o folículo cresce e se desenvolve sobre a influência de LH e FSH. O FSH é o principal responsável pela formação do antro, estimulando a mitose das CGs e a secreção do fluido folicular. O FSH também aumenta a sensibilidade das CGs para o LH, mediante a estimulação da síntese de receptores para LH, o que prepara a luteinização das células da granulosa em resposta a onda pré-ovulatória de LH. O próprio folículo maduro é responsável pela ovulação, pois secreta estradiol, hormônio que provoca o pico pré-ovulatório de LH, resultando na ovulação e no desenvolvimento do CL (GINTHER et al., 1996).

Importância do FSH durante o cultivo *in vitro*

O desenvolvimento de meios de cultivos que permitam a manutenção da viabilidade ovocitária é fundamental, tanto para a produção de ovócitos aptos à fecundação “*in vitro*”, tanto para a compreensão da foliculogênese, mas também para a preservação das células germinativas das fêmeas. Diante do exposto, muitas pesquisas têm sido realizadas no intuito de desenvolver sistemas de cultivos que possibilitem o desenvolvimento e a sobrevivência de FOPA (MAO et al., 2002). Neste contexto, algumas gonadotrofinas e fatores de crescimento têm um papel importante na regulação da função ovariana e vêm sendo pesquisados como componentes para este meio de cultivo folicular.

O FSH é uma gonadotrofina fundamental no cultivo “*in vitro*” (KOBAYASHI et al., 2009), uma vez que a sua ausência pode comprometer a difusão de vários fatores químicos e físicos essenciais através da membrana basal. Estudos revelam que sistemas

de cultivo sem a presença do FSH resultaram na extrusão do ovócito (CORTVRINDT et al., 1997), causado por uma deficiência ou redução do número de junções comunicantes (gap junctions; HSUEH et al, 1994).

Informações geradas por meio de estudos com ratos revelaram que a ausência de FSH no meio de cultivo resultou na morte das células foliculares e comprometimento da vitalidade das CGs. Por outro lado, a adição de FSH ao meio de cultivo de FOPA promoveu o crescimento, a sobrevivência e a formação do antro (CORTVRINDT et al., 1997). Também em humanos, o FSH promove a formação de antro e a produção de estrogênio no cultivo *in vitro* (ABIR et al., 1997). Estes dados reforçam o papel vital deste hormônio na manutenção do crescimento saudável do folículo e do ovócito (MAO et al., 2002).

Alguns estudos experimentais revelam que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados utilizando FSH estimula a proliferação de células da granulosa e a formação do antro (ANDRADE et al., 2005). MAO et al. (2002) relataram maior crescimento e proporção de folículos com antro (83,3%) em folículos cultivados na presença de FSH, quando comparados aos cultivados na ausência do hormônio.

Durante a foliculogênese, poucos FOPA entram em atresia. Porém, ao atingirem a fase antral, a maioria deles sofre este processo. Alguns estudos sugeriram que a apoptose (morte celular programada) é um mecanismo subjacente da atresia folicular, sendo o FSH apontado como regulador deste processo. A apoptose pode ser induzida por alguns fatores oxidantes, sendo que a adição ao meio de cultivo de FSH e de fatores antioxidantes, como ácido ascórbico, inibem esta resposta (TILLY E TILLY, 1995, ROSSETTO et al., 2009).

Foi relatado que o uso de FSH associado ao EGF estimula o crescimento dos folículos pré-antrais em caprinos, tendo em vista que promove o crescimento do ovócito (SILVA et al., 2004; ANDRADE et al., 2005). A adição de EGF e FSH durante o cultivo *in vitro* de FOPA reduz a porcentagem de células foliculares atrésicas e aumenta a taxa de proliferação das CG (SAHA et al., 2000). Em bovinos, o rápido crescimento de FOPA para a fase antral ocorre durante um longo período de cultivo de até 28 dias (GUTIERREZ et al., 2000), com a adição de FSH e EGF (ANDRADE et al., 2005).

O estrogênio atua como um regulador positivo na ação do FSH durante a diferenciação das CGs. Estudos em seres humanos e ratos demonstraram que as interações funcionais entre a ação estrogênica e o FSH são necessárias para o estabelecimento de folículos dominantes no ovário. No entanto, os mecanismos

celulares e moleculares deste sinergismo permanecem desconhecidos. Pesquisas demonstraram que a comunicação entre os ovócitos e as células foliculares somáticas é essencial, não só para o crescimento e a maturação do ovócito, mas também para a mitose e diferenciação de células foliculares somáticas adjacentes (OTSUKA et al. 2005).

Já foi comprovado que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, como o GDF-9 e a BMP-15, os quais são produzidos pelo ovócito e têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (OTSUKA et al. 2005). Pesquisas anteriores mostraram que o GDF-9 produzido pelo ovócito atua na regulação do crescimento do folículo pré-antral *in vitro* (ORIZAKA et al., 2010). Durante o período pré-ovulatório, o FSH estimula as células da granulosa e do *cumulus* a sintetizar ácido hialurônico, resultando em efeitos dissociativos (EPPIG, 1979). Talvez o FSH em excesso possa provocar uma diminuição prematura das junções comunicantes entre as células do *cumulus* e o ovócito, o que impediria a transferência de nutrientes das CGs ao ovócito, resultando na morte do mesmo (ANDRADE et al., 2005).

DRIANCOURT et al. (1995) pesquisaram o papel das gonadotrofinas na regulação da foliculogênese na espécie suína utilizando a técnica de hipofisectomia ou o tratamento com antagonista de GnRH, o qual bloqueia a secreção de LH pulsátil, sem contudo interferir na secreção do FSH. Estes autores demonstraram que o crescimento de folículos de 0,19 a 1,1 mm é independente de gonadotrofinas, enquanto que o crescimento de 1,1 a 2 mm é dependente de FSH e os maiores que 2 mm dependente de LH.

Do ponto de vista bioquímico, como os folículos desenvolvem de duas a três camadas de células da granulosa e a teca interna e externa começam a se diferenciar, receptores de FSH manifestam-se nas células da granulosa de folículos pré-antrais em suínos (YUAN et al., 1996) e os folículos se tornam dependentes de gonadotrofinas. Segundo MAO et al. (2002), os FOPA poderiam responder a quantidades crescentes de FSH, o que implica que o cultivo destes fornece uma abordagem consistente para o estudo da regulação folicular precoce pelo FSH.

Sabe-se que o FSH aumenta o crescimento folicular pré-antral *in vitro* (ORIZAKA et al., 2010). Embora ele sozinho seja capaz de estimular o crescimento folicular pré-antral, um aumento adicional e significativo no crescimento dos folículos ocorre quando os mesmos são cultivados juntamente com T₃ (KOBAYASHI et al.,

2009). Em um de seus trabalhos, KOBAYASHI et al. (2009) demonstraram pela primeira vez que o T₃, embora ineficaz sozinho, promove sinergismo com FSH em folículos pré-antrais de ratos durante o desenvolvimento *in vitro*.

Pelo exposto anteriormente, a presença de FSH é fundamental para o crescimento de folículos pré-antrais na espécie humana (HSUEH et al., 1994) e no rato (NAYUDU & OSBORN, 1992) por meio de diversos mecanismos de ação. Outro fator importante a ser considerado é a utilização de uma concentração adequada do hormônio para que este desenvolvimento ocorra (MAO et al., 2002).

Considerações Finais

O desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* que permita a ativação e o desenvolvimento de um grande número de FOPA é de grande interesse, por permitir a elucidação de mecanismos envolvidos na foliculogênese e possibilitar a conservação de material genético de fêmeas com interesse econômico.

Assim, o FSH tem sido apontado como um hormônio fundamental no meio de cultivo, por apresentar atividades como a regulação da expressão de diversos fatores de crescimento que, por sua vez, participam da ativação e do crescimento folicular. Todos estes eventos são imprescindíveis para a obtenção de ovócitos competentes durante o cultivo *in vitro*. Além disso, este hormônio promove a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a inibição da atresia folicular.

Referências Bibliográficas

ABIR, R. et al. Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles. *Fertility and Sterility*- Vol. 68, No. 4, October, 1997.

ALAM, H.; WECK, J.; MAIZELS, E.; PARK, Y.; LEE, E. J.; ASHCROFT, M.; HUNZICKER-DUNN, M. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, v. 150, p. 915-928, 2009.

ANDRADE, E. R. et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology* 64, 1104–1113, 2005.

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*. J Reprod Fertil, v.38, p.87-98, 1989.

BOLAND, N. I.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J. GOSDEN RG. The effect of glucose metabolism in murine follicle development and steroidogenesis *in vitro*. Hum Reprod, v.9, p.617-623, 1994.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biol Reprod, v.43, 543-547, 1990.

CARABATSOS, M. J.; SELLITTO, C.; GOODENOUGH, D. A.; ALBERTINI, D. F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. Dev Biol. 226(2):167-79, 2000.

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

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

DAS, S.; MAIZELS, E. T.; DEMANNO, D.; ST CLAIR, E.; ADAM, S. A.; HUNZICKER-DUNN, M. A stimulatory role of cyclic adenosine 3,5-monophosphate in follicle-stimulating hormone-activated mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat ovarian granulosa cells. Endocrinology, vol. 137(3), p.967-74, 1996.

DE LA FUENTE R, EPPIG JJ. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. Dev Biol, v.229, p.224-236, 2001.

DRIANCOURT, M. A.; GOUGEON, A., et al. Ovarian Function. Reproduction in mammals and man. C. Thibault, M. C. Levasseur, R. H. Hunter (eds) Paris: Ellipses, 1993.

DRIANCOURT, M. A. et al. Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. Reprod Nutr Dev 5:663– 673,1995.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction 122, 829–838, 1979.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Anim Reprod Sci, v.78, p.203-216, 2003.

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

FIGUEIREDO J.R., RODRIGUES A.P.R., AMORIM C.A. & SILVA J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, p. 303-327, 2008.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol. Reprod, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

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*. Biol Reprod, v.62, p.1322-1328, 2000.

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA, K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. Fertility and Sterility, v. 863, n. 4, p. 1182-1192, 2006.

HSUEH A. J. et al. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev 15:707–724, 1994.

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

IBGE, 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil.

JOHNSON, G. L.; DHANASEDARAN, N. The G protein family and their interactions with receptors. Endocr Rev., v. 10, p. 317–331, 1989.

KOBAYASHI et al., Growth Differentiation Factor-9 Mediates Follicle-Stimulating Hormone-Thyroid Hormone Interaction in the Regulation of Rat Preantral Follicular Development. Endocrinology, v. 10, 2009.

LAUKOVÁ, M.; SIROTKIN, M.; A. V. Follicle-stimulating hormone: Effects and possible mechanisms of action in rabbit ovarian cells. Slovak J. Anim. Sci., 40, (2): 66 – 71, 2007.

LIU, H.; ZENG, W.; CAO, A.; ZHANG, C. Follicle-stimulating hormone promotes proliferation of cultured chicken ovarian germ cells through protein kinases A and C activation. J Zhejiang Univ Sci B. 11(12): 952–957, 2010.

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

MAO et al., Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation *In Vitro*. Biology of Reproduction, 67, 1197–1203, 2002.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. Rev Bras Reprod Anim, v.32, p.36-49, 2008.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D. B.; ROCHA, R. M. P.; SILVA, J. R. V.; BAO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle Stimulating Hormone and Fibroblast Growth Factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. Reproduction, Fertility and Development, v. 19, p. 677-684, 2007.

MATZUK MM, BURNS KH, VIVEIROS MM, EPPIG JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. Science, v.296, p. 2178-2180, 2002.

MC GEE, E. et al. 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.

MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F. & TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. Mol. Hum. Reprod, v. 16, p. 644-653, 2010.

MÉDURI, G., CHARNAUX, N., DRIANCOURT, M. A, COMBETTES, L., GRANET, P., VANNIER, B., LOOSFELT, H., MIGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes. J Clin Endocrinol Metab, v.87, p.2266-2276, 2002.

MINEGISHI, T., HIRAKAWA, T., KISHI, H., ABE, K., ABE, Y., MIZUTANI, T., MIYAMOTO, K. A role of insulin-like growth factor I for folliclestimulating hormone receptor expression in rat granulosa cells. Biol Reprod, v. 62 p. 325-333, 2000.

NAYUDU, P. L. e OSBORN, S. M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. Reprod. Fert. 95, 349-362, 1992.

O'SHAUGHNESSY, P. J; McLELLAND, D; McBRIDE, M. V. Regulation of Luteinizing Hormone Receptor and Follicle-Stimulating Hormone-Receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse. Biology of Reproduction, v. 57, p. 602-608, 1997.

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, n°. 11, p. 3748- 3751, 1997.

ORIZAKA, M. et al. Growth Differentiation Factor 9 Is Antiapoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. Molecular Endocrinology, 2456-2468, 2010.

OTSUKA F, MOORE RK, WANG X, SHARMA S, MIYOSHI T, SHIMASAKY S. Essencial role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. Endocrinology, v.146, p.3362-3367, 2005.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, n. 6, p. 703-715, 2008.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L.R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; NAME, K.P.O.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H.. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 37, p. 112–123, 2009.

ROY, S. K. Epidermal growth factor and transforming growth factor- β modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol Reprod*, v.48, p.552-557, 1993.

SAHA, S. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 63, 27–39, 2000.

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

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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.4, p.206-221, 2010.

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

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 2, 453-462, 2009.

SIMONI M, GROMOLL J, NIESCHLAG E. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. *Endocr Rev*, v.18, p.739-773, 1997.

SOKKA, T.; HUHTANIEMI, I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclicAMP production in the neonatal rat ovary. *Journal Endocrinology*, v. 127, p. 297-303, 1990.

SPIEGEL A M. Mutations in G proteins and G protein coupled receptors in endocrine disease. *J Clin Endocrinol Metab*, v .81, p. 2434-42, 1996.

THOMAS FH, ETHIER JF, SHIMASAKI S, VANDERHYDEN BC. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, v.146, p.941-949, 2005.

TILLY J.L. & TILLY K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136, 242–252, 1995.

TISDALL, D. J.; WATANABE, K.; HUDSON, N. L.; SMITH, P.; MCNATTY, K. P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Endocrinol*, v.15, p.273–281, 1995.

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.

WRIGHT, C. S. et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction* vol.14 no.6 pp.1555–1562, 1999.

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*, 60(9):1691–1704, 2003.

YUAN, W. et al. Messenger ribonucleic acid for insulin like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein- 2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol Reprod* 55:1045–1054, 1996 .

ZHENG, W., MAGID, M. S., KRAMER, E. E, CHEN, Y. T. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol*, v.148, p.47-53, 1996.

8. CAPÍTULO II

Papel da Tiroxina (T_4) e do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) na regulação da foliculogênese em mamíferos

*(Role of Thyroxine (T_4) and the Insulin- like Growth Factor I (IGF-I) in the regulation
of folliculogenesis in mammals)*

Papel da Tiroxina (T₄) e do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) na regulação da foliculogênese em mamíferos

*Role of Thyroxine (T₄) and the Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) in the regulation of
folliculogenesis in mammals*

Resumo

A foliculogênese é coordenada por diversos fatores de crescimento e hormônios responsáveis por garantir o sucesso do desenvolvimento folicular e ovocitário. Para a obtenção de ovócitos competentes, é necessária uma perfeita interação entre as células somáticas foliculares e o ovócito, sendo esta potencialmente regulada por fatores parácrinos produzidos no ovário. Dentre estes fatores, destaca-se o de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I), um polipeptídeo composto por 70 aminoácidos, sintetizado no fígado, o qual exerce a função de um hormônio endócrino sendo conhecido por promover o crescimento e a diferenciação celular. Além do IGF-I, o hormônio Tiroxina (T₄) é importante para o crescimento e desenvolvimento de vários tecidos e órgãos. Seu efeito na foliculogênese e esteroidogênese ovariana está relacionado à diferenciação das células da granulosa e estimulação da ovulação. Este artigo de revisão tem como objetivo verificar o importante papel do IGF-I e da Tiroxina na foliculogênese, enfocando suas características, sítios de expressão, receptores e vias de sinalização, bem como a interação entre estas duas substâncias

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, foliculogênese, IGF-I, ovário, T₄.

Abstract

The folliculogenesis is coordinated by various growth factors and hormones responsible for ensuring the success of the follicular and oocyte development. In order to obtain competent oocytes, it is required a perfect interaction between the follicular somatic cells and the oocyte, which is potentially regulated by paracrine factors produced in the ovary. Among these factors, the insulin-like growth factor -I (IGF-I) outstands, which is a polypeptide consisting of 70 amino acids, synthesized in the liver, that exerts the role

of an endocrine hormone being known for promoting cell growth and differentiation. The Thyroxine (T₄) is an important hormone for the growth and development of various tissues and organs. Its effect on folliculogenesis and ovarian steroidogenesis is related to the differentiation of granulosa cells and stimulation of ovulation. This article reviews the important role of IGF-I and Thyroxine in folliculogenesis, focusing on its features, sites of expression, receptors and signaling pathways, as well as the interaction between these two substances.

Keywords: *in vitro* culture, folliculogenesis, IGF-I, ovary, T₄.

Introdução

O ovário é uma das estruturas dos órgãos genitais das fêmeas e é constituído de diferenciados tipos de células, sendo dividido em duas regiões: uma vascular, que é composta por nervos, artérias e veias; e uma parenquimatosa, que contém corpos lúteos (CL), *albicans* e folículos ovarianos em vários estádios de desenvolvimento (DELLMANN & BROWN, 1982).

Este desenvolvimento compreende a foliculogênese, um processo que se inicia com a formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos. Este processo tem início durante a vida pré-natal, na maioria das espécies (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um ovócito circundado por células somáticas (células da granulosa e teca). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e em antrais, que são reconhecidos pela presença de uma área preenchida por fluido folicular, sendo a partir desse momento subclassificados como terciários e pré-ovulatórios.

Os folículos pré-antrais (FOPA) representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Na espécie mamífera, 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 (FORTUNE, 2003).

O desenvolvimento de um meio de cultivo eficiente para a produção de ovócitos viáveis à fertilização é muito importante, não só para a compreensão da foliculogênese,

mas também para a preservação das células germinativas das fêmeas. Diante do exposto, pesquisas recentes têm buscado desenvolver sistemas de cultivos que permitam estabelecer o desenvolvimento e a sobrevivência de folículos pré-antrais como fonte segura de uma grande quantidade de ovócitos, a fim de serem utilizados durante o cultivo *in vitro* (MAO et al., 2002).

No decorrer desta revisão, serão abordados aspectos relacionados à foliculogênese de mamíferos e à importância de hormônios e fatores de crescimento no desenvolvimento folicular ovariano e cultivo *in vitro*.

Foliculogênese

O folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional dos ovários dos mamíferos, responsável por promover um ambiente adequado para o crescimento e maturação do ovócito (GOSDEN et al., 1993).

Classificação e caracterização estrutural dos folículos ovarianos

Nas fêmeas, os gametas ficam armazenados em estado de quiescência na forma de folículos primordiais, constituídos de um ovócito imaturo circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (HUTT et al., 2006).

A população de folículos presente no ovário é bastante heterogênea. De acordo com os aspectos morfológicos, estes podem ser classificados como pré-antrais ou não cavitários (primordiais, primários e secundários) e antrais ou cavitários (terciários, De Graaf ou pré-ovulatórios; HULSHOF et al., 1994).

Crescimento dos folículos ovarianos

O início do crescimento folicular ocorre por meio da passagem dos folículos do *pool* de reserva, ou folículos quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios), processo que também é conhecido como ativação (RUSSE, 1983). Entende-se como o primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais a retomada da proliferação das células da granulosa (CGs). Nesta fase, estes são denominados folículos de transição, pois apresentam CGs com ambos formatos (pavimentoso e cúbico). Logo em seguida, estas mesmas células vão se

diferenciar em folículos primários, quando o ovócito passa a ser circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico. A origem e os mecanismos responsáveis pela ativação dos folículos primordiais, assim como os fatores envolvidos na variação do período que dá início ao crescimento folicular, ainda não foram totalmente elucidados e representam uma das maiores questões relacionadas à função ovariana (FORTUNE et al., 2001).

Com a progressão do crescimento folicular, inicia a síntese das proteínas responsáveis pela formação da zona pelúcida (ZP). Há ainda a alteração na multiplicação das células da granulosa, com o desenvolvimento de várias camadas destas ao redor do ovócito, originando assim os folículos secundários. Durante este estágio, a ZP é claramente evidenciada ao redor do ovócito (PARROT E SKINNER, 1999), inicia-se a formação das células da teca externa a partir do estroma intersticial e os folículos passam a ser sensíveis ao Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

A fase antral da foliculogênese é representada pela caracterização e organização das células da granulosa em várias camadas e com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular (antro). O fluido folicular presente no antro é composto por água, eletrólitos, proteínas séricas e uma elevada concentração de hormônios esteróides secretados pelas CGs (BARNETT et al., 2006). Os folículos antrais com diâmetro acima de 3 mm contêm células da granulosa diferenciadas em células do *cumulus* e células murais, uma grande camada de células tecais, uma grande cavidade contendo líquido folicular e um ovócito (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O folículo pré-ovulatório é considerado a última etapa do desenvolvimento folicular, o qual contém um ovócito circundado pelas células do *cumulus*. A presença do Hormônio Luteinizante (LH) cessa a multiplicação das CGs desses folículos, iniciando assim o processo final de diferenciação, a luteinização.

Importância da Tiroxina (T₄), e do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) no controle da foliculogênese

Os aspectos da proliferação, da diferenciação e da morte celular relacionados à foliculogênese são resultados de um conjunto de fatores locais e endócrinos (SILVA et al., 2006). Nesse contexto, vale ressaltar a grande importância da utilização de hormônios, assim como fatores de crescimento, para a sobrevivência e crescimento dos

folículos ovarianos (LEVI-SETTI et al., 2004). A seguir, serão relatados os efeitos da T_4 , e IGF-I durante o processo da foliculogênese, destacando-se principalmente os seus mecanismos de ação, os receptores e o cultivo *in vitro* de folículos na presença do hormônio e do fator de crescimento ora citado.

Tiroxina ou Tetraiodotironina (T_4)

Características estruturais e sítios de expressão da Tiroxina (T_4)

Os Hormônios Tireoidianos são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários tecidos e órgãos. A Triiodotironina (T_3) e a Tetraiodotironina, ou Tiroxina (T_4) circulam no plasma sanguíneo ligadas a proteínas carreadoras específicas, como a Globulina Ligante de Hormônios Tireoidianos (TBG), a Pré-albumina Ligadora de Tiroxina (TBPA) ou transtirretina, e a albumina (SUDA et al., 2000). Somente uma pequena fração corresponde ao hormônio livre disponível para o tecido alvo, sendo a T_3 considerada até 10 vezes mais potente que a T_4 (ZHANG et al., 1997).

Conforme relatado, a maior parte dos Hormônios Tireoideanos (HTs) que estão no plasma encontram-se ligados às proteínas e apenas uma pequena parcela está livre para interagir com receptores na célula do tecido alvo. Isso ocorre para que haja distribuição regular dos hormônios aos tecidos alvo e para aumentar a sua meia-vida (BARRA et al., 2004).

Em humanos, 0,03% de T_4 e 0,3% de T_3 estão livres, enquanto que em cães um pouco menos que 1% de T_4 e um pouco a mais de 1% de T_3 . Isso mostra que existe diferenças entre espécies e estas ocorrem principalmente devido à afinidade das proteínas ligadoras (GRECCO & STABENFELDT, 2004). No tocante à importância desses hormônios na vida adulta, está inteiramente relacionado às funções de crescimento, de diferenciação e de regulação da atividade metabólica em vários tecidos e órgãos (NUNES, 2003).

A hipófise anterior é responsável pela secreção do Hormônio Estimulante da Tireóide, a tireotropina (TSH). Este, por sua vez, regula a síntese dos hormônios tireóideos, a Tetraiodotironina (Tiroxina ou T_4) e a Triiodotironina (T_3). Após a liberação na circulação sanguínea, estes hormônios se ligam a proteínas plasmáticas e a partir de então circulam pelo organismo (GUYTON & HALL, 2002). As proteínas

carreadoras se dissociam dos hormônios antes dos mesmos entrarem em contato com as células-alvo (ALBERTS et al., 2004).

Já é bem conhecida a influência que as gonadotrofinas possuem sobre o desenvolvimento folicular. Entretanto, mais recentemente tem sido constatada a participação dos hormônios da tireóide (T_3 e T_4), na fertilidade de mamíferos (CECCONI et al., 2004). Os efeitos destes hormônios na foliculogênese e esteroidogênese ovariana estão relacionados à promoção da diferenciação das células da granulosa (SILVA et al., 2004) e estimulação da ovulação (SERAKIDES et al., 2001). Assim, o eixo hipotalâmico-hipofisário-tireóideo e o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal agem simultaneamente no controle da foliculogênese, sendo que os hormônios da tireóide podem promover diversos efeitos na função ovariana (SARAIVA et al., 2010).

O fato de que o ovócito, as células do *cumulus* e as células de pequenos folículos expressam RNAm para os receptores da tireóide (JIANG et al., 2000) faz com que se acredite na participação da T_3 e T_4 na ativação folicular. Corroborando com este fato, está a maior capacidade de ligação da T_3 pelas CGs no início da maturação folicular (MARUO et al., 1992). Além disto, Slebodzinski (2005) relata que, durante o desenvolvimento folicular, ocorre um aumento significativo nas concentrações de T_3 no fluido folicular.

Além da sua influência no desenvolvimento, na proliferação e na diferenciação celular, os hormônios tireoidianos parecem atuar também na formação e degradação de vários outros 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 T_4 participa ainda na síntese do Hormônio do Crescimento (GH), que pôde ser constatada quando a deficiência nos receptores de GH resultou na redução da taxa de ovulação, na quantidade de folículos antrais e no aumento de folículos atresícos (BACHELOT et al., 2002). O GH por sua vez, é um hormônio de grande importância na regulação das diversas etapas do desenvolvimento folicular (MAGALHÃES et al., 2012).

Síntese dos Hormônios Tireoideanos (HTs)

Duas moléculas são essenciais para que ocorra a síntese dos HTs, a tirosina e o iodo. O iodo da alimentação é transformado em iodeto (I^-) no trato gastrointestinal e então absorvido. Na corrente sanguínea este iodeto é eliminado por via renal, com uma pequena quantidade também sendo eliminada por meio da expiração e da pele, sendo o restante captado pela glândula tireoide. A tireóide, após a captação, concentra o iodeto dentro da mesma através de um mecanismo de bombeamento próprio, dependente de energia e ativado pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH). Isto permite que a concentração intracelular de iodeto seja de 25 a 200 vezes maior que as concentrações extracelulares (GRECCO & STABENFELDT, 2004).

A tirosina é um aminoácido que está presente em uma grande molécula chamada de tireoglobulina (TG), sendo esta formada nas células foliculares e secretada para o interior do lume folicular. A tireoglobulina possui cerca de 140 resíduos de tirosina. Estes possuem estruturas anelares, o anel tirosil, que incorporam os iodetos através de um processo chamado de organização do iodeto. Esse processo é catalizado pela enzima tireoperoxidase em conjunto com um oxidante, o peróxido de hidrogênio (GRECCO & STABENFELDT, 2004).

Cada anel tirosil só pode interagir com duas moléculas de iodeto. No entanto, se apenas uma molécula de iodeto se acoplar, esta estrutura é chamada de moniodotirosina (MIT). Entretanto, se duas moléculas de iodeto vierem a se acoplar, ele é chamado de diiodotirosina (DIT). A união de duas moléculas de tirosina iodada resulta na formação dos principais HTs. Assim, duas moléculas de DIT formam T_4 e uma molécula de MIT, juntamente com uma molécula de DIT, formam T_3 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Receptores de T_3 e T_4

Os hormônios T_3 e T_4 têm como uma das formas de atuação o aumento do metabolismo de diversas células, que se dá por meio da síntese de proteínas e aumento da glicólise (ALBERTS et al., 2004). Sua sinalização ocorre através de Receptores Tireoidianos (TRs) localizados no interior das células. Quando são internalizados no núcleo celular, ligam-se aos denominados elementos responsivos ao hormônio, que são sequências específicas de DNA (MAGLICH et al., 2001). O processo de ligação ao receptor ocorre mesmo na ausência do ligante, sendo as respostas dos hormônios

determinadas pela natureza das células-alvo e da molécula sinalizadora (ALBERTS et al., 2004).

O acesso dos Hormônios Tireoidianos (HTs) às células ocorre principalmente por meio de transportadores específicos situados na membrana plasmática. Entretanto, este processo ocorre em menor quantidade. Outra maneira para que este transporte ocorra é através da difusão passiva (RIBEIRO et al., 1998). Os HTs, quando atingem o interior da célula, se ligam a receptores específicos para os hormônios T_3 e T_4 (RTs), os quais se localizam no núcleo das células. A ativação destes receptores, pelos HTs é realizada por meio da transcrição de genes específicos do DNA, os quais regulam a transcrição em todos os tecidos de mamíferos (RIBEIRO et al., 1998).

Já foi detectada a presença dos RTs em células do complexo *cumulus ooforus*, da granulosa, em ovócitos e em CL (ZHANG et al., 1997; MARUO et al., 1992). Sendo assim, os HTs podem interferir de maneira direta na função dos ovócitos, se ligando aos receptores presentes nos mesmos, ou então de forma indireta, se ligando às células dos *cumulus* (ZHANG et al., 1997).

Maruo et al. (1992) avaliaram a afinidade e quantidade de receptores de T_3 presentes no cultivo de folículos em crescimento na espécie suína. Os autores observaram que a afinidade dos RTs não foi alterada durante o crescimento dos folículos. Entretanto, o número de receptores para T_3 foi maior em CGs de pequenos folículos.

A ligação do T_3 ao RT provoca mudanças de conformação na estrutura do receptor, favorecendo a dissociação das proteínas co-repressoras e a ligação a proteínas co-ativadoras. Estas proteínas co-ativadoras não são específicas e associam-se a superfamília dos receptores nucleares. Os co-ativadores, por possuírem atividade histona acetil transferase (HAT), estimulam a transcrição ao acetilarem as histonas (YEN, 2001). A hiperacetilação das histonas relaxa a cromatina e facilita o acesso dos fatores de transcrição basal ao promotor do gene alvo, estimulando a atividade transcricional (WU et al, 2000).

Outra forma de atuação consiste no mecanismo não genômico, em que há independência de RTs nucleares, uma vez que pode interagir com receptores de membrana. Porém, outros mecanismos também o diferem, como o tempo de desencadeamento do efeito biológico que, no caso da ação genômica, é suficientemente longo para permitir a transcrição gênica. Em relação à ação não genômica, verifica-se que os efeitos são desencadeados preferencialmente por T_3 , enquanto as ações não

genômicas ocorrem tanto por ação do T_3 , T_4 , como também por rT_3 e T_2 , que são formas consideradas biologicamente inativas por não possuírem afinidade com os RTs (DAVIS & DAVIS, 1996).

Davis et al. (2008) salientaram que ações iniciadas não genomicamente pelos HTs através de receptores na superfície celular (integrina $\alpha v \beta 3$), podem culminar num evento nuclear ou celular. Assim, pode haver interação dos mecanismos genômico e não genômico pelo HTs. Uma forma de interação é a fosforilação da Ser-142 da isoforma do RT $\beta 1$, promovida pela forma não genômica, resultando em alteração na atividade transcricional, devido a diminuição de afinidade pela proteína co-repressora e aumento pela co-ativadora (DAVIS et al., 2000). Dentre os eventos celulares relacionados aos HTs através da membrana plasmática, pode-se citar a proliferação de células endoteliais e certas células tumorais (DAVIS et al., 2004).

Quando as ações dos HTs são iniciadas dentro da célula, porém fora do núcleo, o mecanismo não genômico pode envolver um derivado citoplasmático do receptor tireoidiano $\alpha 1$, o RT $\Delta \alpha 1$, que regula o estado da actina, convertendo-a de estado solúvel para estado fibroso, regulando então a motilidade celular. Esses efeitos são bem característicos nas células do sistema nervoso central (FARWELL et al., 1999, 2005). Esse mecanismo e outros anteriormente citados estão representados na Figura 1.

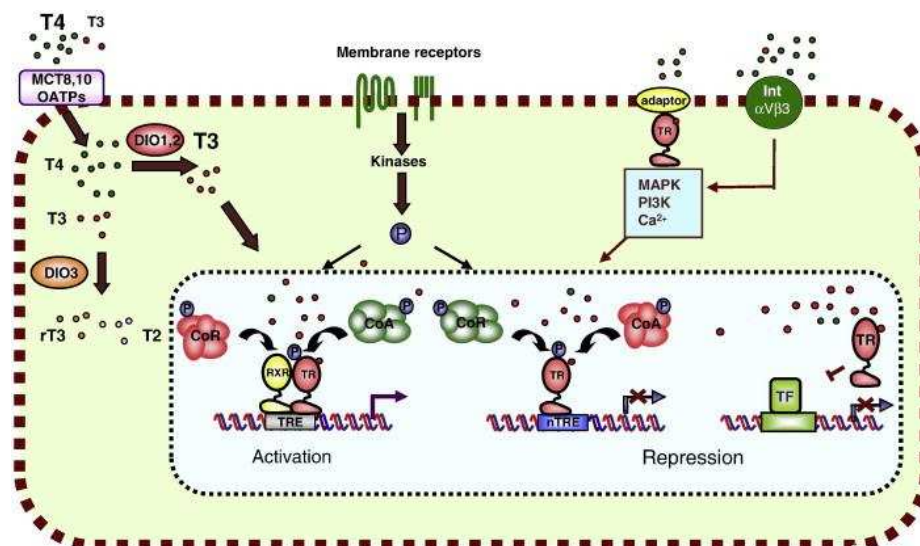


Figura 1. Ilustração do mecanismo de ação dos receptores tireoidianos. Adaptado de Pascual & Aranda (2012).

Papel da T₃ e T₄ na foliculogênese e fertilidade

A T₃ está diretamente ligada ao desenvolvimento de folículos ovarianos e à maturação do *complexo cumulus-ovócito* (COCs; ZHANG et al., 1997). Tanto a T₃ quanto a T₄ estão envolvidas no processo de pós-implantação de embriões por serem conhecidas como reguladoras essenciais, sendo também detectadas no fluido folicular de diversas espécies de mamíferos (SLEBODZINSKI, 2005) incluindo os seres humanos (WAKIM et al., 1993). Nesse sentido, as pesquisas dos últimos anos indicam que estes hormônios participam do funcionamento reprodutivo normal dos animais (ASHKAR et al., 2010), embora alguns autores relatem que o desenvolvimento dos órgãos genitais femininos durante a vida fetal e início da vida pós-natal pareça ser independente do uso de T₃ (LONGCOPE, 1991).

O desenvolvimento dos folículos presente nos ovários de mamíferos também pode ser regulado pela comunicação bidirecional entre ovócitos e células foliculares somáticas (KNIGHT & GLISTER, 2003). Mesmo sendo o FSH o hormônio mais conhecido por estimular o crescimento dos folículos durante o cultivo *in vitro*, esta resposta se torna mais elevada na presença do Fator de Diferenciação do Crescimento-9 (GDF-9) e T₃ (TONETTA & DI ZEREGA, 1989). Estas pesquisas confirmam que a adição de FSH e T₃ ao meio de cultivo *in vitro* promovem o crescimento de folículos pré-antrais e que esta interação é mediada por meio do aumento na expressão de RNAm para receptores de FSH (rFSH) através de um mecanismo GDF-9 dependente. Acredita-se que estes dois hormônios (FSH e T₃) interagem sinergicamente inibindo a apoptose de células da granulosa em pequenos folículos pré-antrais (ASAHARA et al., 2003).

Apesar dos receptores de hormônios da tireóide estarem presentes em ovócitos, o mecanismo de como os mesmos regulam a expressão de GDF-9 ainda não está esclarecido (KOBAYASHI et al., 2009). Além disso, a T₃ está diretamente ligada a ação do FSH e LH sobre a biossíntese de esteróides em suínos (MARUO et al., 1987) e de CGs em humanos durante o cultivo *in vitro* (CECCONI et al., 1999).

As CGs, por sua vez, têm um importante papel na foliculogênese, na esteriodogênese e na formação do líquido folicular. Vale ressaltar que os hormônios esteróides liberados por estas células são essenciais para o desenvolvimento apropriado do folículo presente no ovário (TONETTA & DI ZEREGA, 1989). Pesquisas demonstraram que o uso de T₃ em cultivo provoca uma queda brusca na atividade da aromatase, estimulada pelo FSH em CGs de camundongas imaturas e adultas. É

importante salientar que, em CGs de ovários imaturos, esta ação inibitória foi evidenciada após seis dias com o tratamento hormonal (T_3). Entretanto, em CGs de ovários de adultos, uma inibição significativa da atividade da aromatase pelo uso de T_3 só foi observada após dois dias de cultivo. Uma das hipóteses para este fato é a de que os receptores para T_3 são expressos diferencialmente em CGs imaturas em relação às adultas (CECCONI et al., 1999).

Vários estudos revelaram a capacidade de T_3 em regular as gonadotrofinas induzidas pela atividade esteroidogênica, no cultivo de células da granulosa. No entanto, os resultados apresentados parecem ser bastante controversos nas diferentes espécies. Segundo Maruo et al. (1987), foi observado que nas CGs de folículos pequenos e médios de suínos, existe um número maior de sítios de ligação para T_3 em relação aos presentes nessas células de folículos antrais. Além disso, as diferentes espécies animais analisadas e/ou as diferentes condições de cultivo utilizadas podem ser responsáveis pelas observações discordantes.

A T_3 é responsável por modular de maneira dose-dependente a capacidade de resposta do FSH das células da granulosa de suínos e de seres humanos, a atividade esteroidogênica, a morfologia celular e a expressão do receptor de hCG (MARUO et al., 1987). A exposição do complexo *cumulus-ovócito* de ratos a doses crescentes de T_3 durante a maturação *in vitro* não afeta a expansão do *cumulus* estimulado por FSH ou a habilidade do ovócito de retomar e completar a maturação meiótica até a metáfase II (MII), representado pela emissão de um corpúsculo polar (CECCONI et al., 2004).

Foi observado por Serakides et al. (2001) uma correlação positiva entre a população de folículos primários e as concentrações plasmáticas de T_4 -livre, sugerindo, portanto, uma participação ativa deste hormônio no desenvolvimento dos folículos primordiais. Segundo Maruo et al. (1992) as células da granulosa de pequenos folículos apresentam maior número de receptores para T_3 do que os folículos bem desenvolvidos. Assim, como o desenvolvimento destes até folículos secundários independe da ação das gonadotrofinas (SALHA et al., 1998), a participação dos hormônios da tireóide no recrutamento de folículos primordiais não deve ser descartada.

A diferenciação celular é essencial à esteroidogênese e consequente formação do antro folicular, característica dos folículos terciários (GUYTON & HALL, 2002), sendo altamente influenciada pelos hormônios tireoidianos. Fitko & Szlezzyngier (1994), ao observarem menor peso e quantidade de receptores para FSH e LH nos ovários de ratas com hipertireoidismo, sugeriram que a hiperfunção tireoidiana induz a menor

responsividade do ovário às gonadotrofinas, ao contrário dos resultados obtidos *in vitro*. Nestes, a conclusão foi de que o aumento da função ovariana foi promovido pelo sinergismo entre hormônios da tireóide e o FSH. Assim, a correlação positiva das concentrações plasmáticas de T₄-livre, e o número total de folículos não atresícos e de folículos primários, secundários e terciários, aponta para a participação direta dos hormônios tireoidianos no desenvolvimento folicular.

Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I)

Características estruturais e sítios de expressão de IGF-I

Dentre as substâncias que participam na regulação das funções ovarianas está o sistema de Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina (IGF). Este inclui os fatores 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), os receptores do tipo I e II (IGFR-I e IGFR-II) e as Proteínas Ligantes para estes fatores (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6) (ADASHI et al., 1987).

O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) é um polipeptídeo composto por 70 aminoácidos, sendo conhecido por sua capacidade de promover o crescimento e a diferenciação celular. É produzido predominantemente no fígado e exerce a função de um hormônio endócrino. Entretanto, ele também pode ser sintetizado por tecidos-alvo, desempenhando suas funções de forma parácrina e autócrina (MARTINELLI & AGUIAR-OLIVEIRA, 2005).

O sistema IGF atua no crescimento folicular por estimular a proliferação das células da granulosa e promover a diferenciação das células foliculares por meio do sinergismo com os hormônios gonadotróficos. Foi demonstrado que o IGF-I interage com o FSH para estimular a produção de estradiol pelas CGs (GUTIERREZ et al., 1997). Além disso, parece também desempenhar um papel importante no recrutamento, seleção e dominância folicular (LEITÃO et al., 2009).

O IGF-1 originado pelas CGs estimula o desenvolvimento de folículos nas fases pré-antral e antral (ARMSTRONG & BENOIT, 1996). Os FOPA não expressam os ligantes (IGF-1 ou IGF-2), mas expressam receptores (IGFR-1) e proteínas ligantes (IGFBP -2 e -3), os quais mediam a ação e regulam a disponibilidade local de IGF-I (WEBB et al., 2003). Na maioria das espécies animais, o IGF-I parece não ser

necessário para a ativação folicular. Entretanto, promove o crescimento de folículos secundários e a formação de antro.

São conhecidos dois grupos de IGFBP, as IGFBP-1, -2, -4, -5, -6 e a IGFBP-3, que é a forma que predomina no soro (MONGET et al., 2002; SILVA, 2008). A expressão do RNAm da IGFBP-2 reduz durante o crescimento folicular em ovários de ovinos, de bovinos e de suínos. Já a expressão de RNAm da IGFBP-5 aumenta em CGs de folículos atresicos de bovinos e ovinos (ZHOU et al., 1996). Em caprinos, a proteína e o RNAm para IGF-I são expressos em todas as categorias foliculares, mas as células da granulosa e da teca de folículos antrais são as principais responsáveis pela produção de IGF-1 nesta categoria folicular (SILVA et al., 2007).

Há evidências de que o FSH atue regulando as concentrações de IGFBP-2 em nível de expressão gênica de RNAm. Isto porque este hormônio foi responsável pela inibição da expressão de RNAm no cultivo de CGs de folículos bovinos (ARMSTRONG et al., 1998). Foi observada ainda a presença do RNAm para IGFBP-4 em células da teca de folículos antrais saudáveis, sendo estimulado pelo LH em culturas destas mesmas células. Isto sugere que a concentração desta proteína (IGFBP-4) pode ser regulada através de uma degradação proteolítica (FORTUNE et al., 2001).

Corroborando com estes achados, Mihm et al. (2000) observaram concentrações reduzidas da IGFBP-4 em folículos dominantes de bovinos. Assim, é possível deduzir que isto resultou da elevada ação proteolítica da Proteína Plasmática Associada à Gestação (PAPP-A). Esta degradação aumenta a biodisponibilidade de IGF que, por sua vez, vai mediar o aumento da capacidade do folículo dominante em produzir estradiol (FORTUNE et al., 2001).

Assim, de maneira geral, as IGFBPs regulam as atividades dos IGFs das seguintes formas: atuando como proteínas de transporte no plasma, prolongando a meia-vida dos IGFs por regular sua depuração metabólica e modulando diretamente a interação dos IGFs com seus receptores (MAGALHÃES et al., 2012).

Receptores e vias de sinalização celular do IGF-I

O IGFR-I é uma proteína tipo tirosina quinase transmembrana que consiste de duas subunidades α e duas β extracelular, possuindo uma expressiva homologia com o receptor da insulina (SILVA et al., 2009). Em adição ao IGF-I, o receptor do tipo 1 também pode-se ligar à GF-2 e insulina, embora com uma afinidade menor, bem como

parece interagir com as IGFBPs (MOHSENI-ZADEH & BINOUX, 1997). O IGFR-I é o principal mediador das ações semelhantes à somatomedina, tanto do ligante IGF-1 como do IGF-2 (SILVA et al., 2009). Os eventos após a ligação com este receptor, similares aos do receptor da insulina, incluem a fosforilação da tirosina da subunidade β do receptor e das proteínas IRS (Insulin Receptor Substrate), a interações com a fosfoinositol-3 quinase e a ativação da MAP-quinase (LeROITH et al., 1995). Ambos receptores de IGF estão presentes em CGs de folículos primários, secundários e antrais (MONGET et al., 1989).

Utilizando a técnica de Real-Time PCR, Zhao et al. (2001), detectaram a presença do IGFR-1 nos ovócitos e em células somáticas de folículos pré-antrais, sugerindo que o sistema de receptores de IGF tipo 1 é o regulador local de desenvolvimento destes folículos. Contudo, Armstrong et al. (2000) ao realizarem uma pesquisa semelhante, também detectaram o receptor IGF tipo 1 nas células da granulosa.

Para que as ações dos IGF sejam exercidas, é necessário sua interação com os receptores do tipo 1, presentes nas CGs de folículos primários, secundários e antrais (MONGET et al., 1989). Esta ligação aos receptores é modulada pelas IGFBP. Estas podem ser encontradas nos fluidos biológicos e possuem a capacidade de inibir ou potencializar a ação dos IGFs nas células-alvo. Desta forma, alterações nas concentrações das IGFBP no interior dos folículos podem provocar mudanças na biodisponibilidade de IGF e, assim, regular a ação das gonadotrofinas nas células foliculares (FORTUNE et al., 2001). Durante o desenvolvimento de pequenos folículos antrais para o estágio pré-ovulatório, há uma redução progressiva nas concentrações de IGFBP. Isto ocorre devido a alterações nos processos de síntese e/ou degradação das mesmas (MONGET et al., 2002) por meio da atividade de enzimas específicas, as IGFBPs proteases. Em compensação, em folículos que estão em processo de atresia, as concentrações de IGFBPs são elevadas, como consequência da redução do processo de degradação (BESNARD et al., 1997). Esse mecanismo e outros citados anteriormente estão representados na Figura 2.

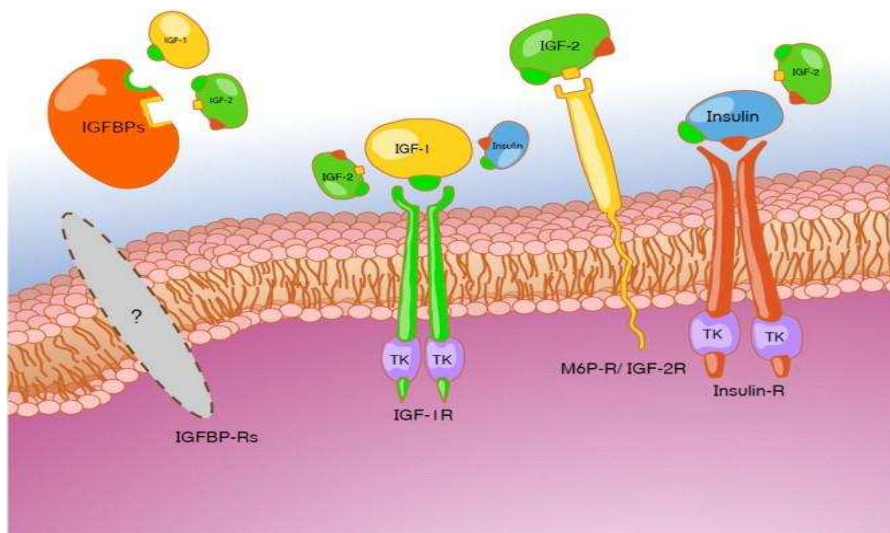


Figura 2. O Sistema IGF. Este sistema possui três componentes, os ligantes (IGF-1, IGF-2 e insulina), receptores de superfície celular que incluem (IGFR-1), (IGFR-2) e receptor de insulina (IR), assim como as IGFBPs. (Adaptado de Li & Geng, 2010).

Interação do IGF-I durante a ovogênese e o desenvolvimento folicular

Uma comparação entre espécies demonstra diferenças significativas na expressão de IGF nos folículos antrais (WEBB et al., 2003). Em espécies com poliovulação, quando dois ou mais ovócitos são liberados pelo ovário, como suínos e roedores, prevalece a produção de IGF-1 pelas CGs. Entretanto, em mono-ovuladores, como ruminantes e humanos, o IGF-2 derivado da teca é o principal ligante intrafolicular. Tem-se demonstrado que, mesmo entre duas espécies estritamente relacionadas, como ratas e camundongas, há diferenças significativas na expressão de IGFBP-2 e 4 nos folículos antrais (ADASHI et al., 1987). Em camundongas, o IGF-1, nas concentrações de 10, 50 e 100 ng/mL aumenta a esteroidogênese de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por seis, 10 e 12 dias (DEMEESTERE et al., 2004). Estudos têm demonstrado que, *in vitro*, tanto o crescimento quanto a ultraestrutura de folículos pré-antrais são regulados pelo IGF. (GUTIERREZ et al, 2000; LOUHIO et al, 2000; AMSTRONG, 2002).

A participação do IGF-1 no desenvolvimento folicular é sugerida pela presença de seus receptores (IGFR-1) no ovário (DEMEESTERE et al., 2004). Em ovários de suínos e roedores, o IGF-1 tem sido localizado nas células da granulosa de folículos antrais saudáveis (ZHOU et al., 1996), estando seu receptor presente em CGs de

folículos primários, secundários e antrais (MONGET et al., 1989). O RNAm que codifica o receptor de IGF-1 foi detectado no ovócito e em CGs de folículos antrais, mas não em folículos pré-antrais. Esses resultados sustentam a hipótese de que o IGF-1 regula o crescimento dos folículos em crescimento através de mecanismos endócrinos (ARMSTRONG, 2002).

Quando adicionado durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, este fator de crescimento, em sinergia com o FSH, estimula o crescimento folicular em humanos (LOUHIO et al., 2000), bovinos (GUTIERREZ et al., 2000) e em ratos (ZHAO et al., 2001). Em ovinos, ele estimula a proliferação das CGs de pequenos folículos (1-3 mm), mas não de grandes (> 5 mm). Por outro lado, favorece a secreção de Progesterona (P₄) pelas CGs apenas de folículos grandes (MONGET & BONDY, 2000).

Em caprinos, a proteína e o RNAm para IGF-I são expressos em todas as categorias foliculares, mas as CGs e da teca de folículos antrais são as principais responsáveis pela produção de IGF-1 nesta classe folicular (HASTIE & HARESIGN, 2006). A adição de IGF-1 ao meio de cultivo mantém a sobrevivência dos ovócitos e estimula o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais de caprinos, tendo sua ação reforçada pelo Fator de Crescimento Epidermal (EGF) (ZHOU & ZHANG, 2005). Em equinos, o aumento da concentração de IGF-I está associado ao aumento da esteroidogênese em folículos em desenvolvimento (SPICER et al., 2005). Além disso, pesquisas demonstraram que a adição de IGF-I ao meio de cultivo de grandes folículos secundários promove o aumento da incidência de dominância folicular e ovulação (GINTHER et al., 2008). Também já foi comprovado que a adição de IGF-1 ao meio de maturação *in vitro* promove a capacidade de desenvolvimento de ovócitos e aumenta a produção de blastocistos, após fertilização *in vitro* em roedores (DEMEESTERE et al., 2004; LEITÃO et al., 2009).

O IGF-1 estimula a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa cultivadas *in vitro* de diferentes espécies (GUTHRIE et al., 1998). Estes resultados apoiam a hipótese de que o IGF-1 atua em sinergia com FSH na indução do desenvolvimento das CGs, pela regulação da expressão de receptores para FSH. Além disso, o FSH foi descrito como o hormônio que estimula o aumento dos receptores de IGF-1 durante o cultivo *in vitro* de CGs, sugerindo que alguns efeitos de FSH poderiam ser mediados via IGF-1 (ADASHI et al., 1985).

As microvilosidades existentes entre o ovócito e as CGs, assim como as junções comunicantes entre as células foliculares, também aumentaram de tamanho quando

foram cultivados na presença de IGF-I, sugerindo que este auxilia na promoção da integridade funcional dos folículos (ZHAO et al., 2001). No entanto, ainda não estão esclarecidos os efeitos do IGF-I durante o crescimento folicular pré-antral, a maturação do ovócito subsequente, o processo da fecundação e desenvolvimento do embrião, (DEMEESTERE, 2004). Foi observado um aumento significativo no diâmetro folicular quando o IGF-1 foi adicionado ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA de ratos em conjunto com o FSH (LIU et al., 2010).

Um fator importante a ser considerado nos componentes de um meio de cultivo é a concentração ideal do fator de crescimento a ser utilizado. Neste contexto, nenhum efeito benéfico adicional foi observado sobre a esteroidogênese quando doses elevadas de IGF-1 (100 ng/mL) foram adicionadas durante o cultivo de folículos pré-antrais. Estes resultados sugerem uma saturação do seu efeito quando se adiciona uma dose superior a 50 ng/mL, na presença de FSH. Esta observação também foi feita por Zhao et al. (2001), que demonstraram que o IGF-1, associado ao FSH, induz um aumento significativo no diâmetro folicular quando é adicionado durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em ratos, nas concentrações de 1 e 10 ng/mL. Entretanto, o uso de 100 ng/mL não apresentou efeito adicional. Em CGs de suínos, estudos mostraram que a taxa de apoptose durante o cultivo *in vitro* diminui na presença de IGF-1 e FSH. No entanto, o efeito anti-apoptótico de IGF-1 é elevado quando se utiliza uma dose de 50 ng/mL, sendo que nenhum efeito adicional é observado quando se utiliza concentrações entre 50 e 250 ng/mL (GUTHRIE et al., 1998).

Experiências em laboratórios com o uso de CGs de folículos de bovinos demonstraram um efeito dose-dependente de IGF-1 na secreção de vários hormônios (estradiol, progesterona, inibina A, activina A,). Entretanto, na presença de FSH, a estimulação da produção hormonal diminuiu quando altas doses de IGF-1 foram adicionadas ao meio de cultivo (GLISTER et al., 2001). Uma das hipóteses para este efeito dose-dependente é a luteinização precoce das CGs, induzida pelo aumento da ação de FSH por meio do IGF-I. (DEMEESTERE et al., 2004).

Segundo ZHAO et al. (2001), o número de *cumulus*-ovócito recolhido após a maturação não é alterado na presença de IGF-1. No entanto, o número de ovócitos degenerados após a fertilização é reduzido quando os folículos são cultivados e maturados na presença de IGF-I. Este fato sugere que, além de um efeito estimulante sobre o esteroidogênese, o IGF-I pode ter influência na taxa de sobrevivência dos ovócitos. Este efeito poderia ser mediado pelas células dos grânulos, possivelmente pelo

aumento do número de junções comunicantes essenciais para manutenção da integridade funcional dos folículos.

Alguns fatores podem ainda influenciar a disponibilidade de IGF-I no organismo. O RNAm que codifica o receptor deste fator de crescimento tem sido detectado em folículos pré-antrais de bovinos (ARMSTRONG et al., 2002). Ainda, baixas concentrações de IGF-I foram associadas a diminuição do tamanho do folículo ovulatório e do CL em novilhas de corte com restrição de nutrientes (BOSSIS et al., 1999). Assim, percebe-se uma interação entre as condições do organismo, as gonadotrofinas e os fatores de crescimento para o estímulo do desenvolvimento dos folículos ovarianos (GUTIERREZ et al., 1997).

Considerações Finais

A Tiroxina (T_4) e o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) têm sido apontados como importantes substâncias que auxiliam na regulação da foliculogênese em mamíferos, durante o cultivo *in vitro* de FOPA.

Os efeitos de T_3 e T_4 sobre a foliculogênese e esteroidogênese ovariana estão relacionados à diferenciação das células da granulosa e estimulação da ovulação. Além disso, atuam na síntese e degradação de vários outros hormônios e fatores de crescimento. Também estão diretamente ligadas ao desenvolvimento de folículos ovarianos e à maturação do *complexo cumulus-ovócito*.

O IGF-I possui a capacidade de promover o crescimento e a diferenciação celular. O sistema IGF atua no crescimento folicular por estimular a proliferação das células da granulosa e promover a diferenciação das células foliculares, por meio do sinergismo com os hormônios gonadotróficos. Além disso, parece também desempenhar uma papel importante no recrutamento, seleção e dominância folicular.

Referências Bibliográficas

- ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; TWARDZIK, D. R. Transforming growth factor- α attenuates the acquisition of aromatase activity by cultured rat granulosa cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.33, p.1-13, 1987.
- ADASHI, E.Y. et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6:400–420,1985.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*, 4 ed, p. 831- 906, 2004.
- ARMSTRONG, D. G. et al. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 123, 789–797, 2002.
- ARMSTRONG, D. G., GUTIERREZ, C. G., BAXTER, G., GLAZYRIN, A. L., MANN, G. E., WOAD, K. J., HOGG, C. O., WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 165, p. 101–113, 2000.
- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C. G.; HOGG, C. O.; GLAZYRIN, A. L.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 mRNA expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*, v.139, p.2146-2154, 1998.
- ARMSTRONG, J. D.; BENOIT, A. M. Paracrine, autocrine, and endocrine factors that mediate the influence of nutrition on reproduction in cattle and swine: an *in vivo*, IGF-I perspective. *J Anim Sci*, v.74, p.18-35, 1996.
- ASAHARA, S.; SATO, A.; ALI ALJONAI, A, and MARUO, T. Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles *Kobe J. Med. Sci*, v. 49, p. 107-116, 2003.
- ASHKAR, F. A.; BARTLEWSKI, P. M.; SINGH, J.; MALIK, P. S.; YATES, K. M.; SINGH, T.; KING, W. A. Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows. *Exp. Biol Med*, v. 235, p. 215-221, 2010
- BACHELOT, A.; MONGET, P.; IMBERTBOLLORE, P.; COSHIGANO, K.; KOPCHICK, J. J.; KELLY, P. A.; BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology*, v. 143, p. 4104-4113, 2002.
- BARNETT KR., SCHILLING CCR, GREENFELD CR, TOMIC D, FLAWS JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod*, v.10, p.1-19, 2006.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, S. M. G.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, L. A.; NEVES, F. A. R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. Review. Arq Bras Endocrinol Metab, v. 48, p. 25-39, 2004.

BESNARD, N.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D.; MONGET, P. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. Biology of Reproduction. v.56, p.1050-1058, 1997.

BOSSIS, I. et al. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. J Anim Sci, 77:1536-1546, 1999.

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

CECCONI, S.; ROSSI, G.; COTICCHIO, G.; MACCHARELLI, G.; BORINI, A.; CANIPARI, R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development *in vitro*. Fertil Steril, v. 81, p. 919-924, 2004.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Non-genomic actions of thyroid hormone. Thyroid, v. 6, p. 497-504, 1996.

DAVIS, P. J.; SHIH, A.; LIN, H. Y.; MARTINO, L. J.; DAVIS, F. B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. J Biol Chem, v. 275, p. 38032-38039, 2000.

DAVIS, F. B.; MOUSA, S. A.; O'CONNOR, L.; MOHAMED, S.; LIN, H. Y.; CAO, H. J.; DAVIS, P. J. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. Circ Res, v. 94, p. 1500-1506, 2004.

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Front Neuroendocrinol, v. 29, p. 211-218, 2008.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. Histologia Veterinária, 1ª ed, Editora Guanabara Koogan, 1982.

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.

FARWELL, A. P.; DUBORD-TOMASETTI, S. A. Thyroid hormone regulates the expression of laminin in the developing rat cerebellum. Endocrinology, v. 140, p. 4221-4227, 1999.

FARWELL, A. P.; DUBORD-TOMASETTI, S. A.; PIETRZYKOWSKI, A. Z.; STACHELEK, S. J.; LEONARD, J. L. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. Brain Res Dev Brain Res, v. 154, p. 121-135, 2005.

FIGUEIREDO J.R., RODRIGUES A.P.R., AMORIM C.A. & SILVA J.R.V. 2008. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, pp. 303-327.

FITKO, R. & SZLEZYNGIER, B. Role of thyroid hormone in controlling the concentration of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in rat ovaries. *Eur J Endocrinol*;130:378-80, 1994.

FORTUNE JE. The early stages of follicular development, p. activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*, v.65, p.648-654, 2001.

GINTHER, O. J. et al. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. *Animal Reproduction Science*. 105: 417–423, 2008.

GLISTER, C. et al. Interactions Between Follicle-Stimulating Hormone and Growth Factors in Modulating Secretion of Steroids and Inhibin-Related Peptides by Nonluteinized Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 65, 1020–1028, 2001.

GOSDEN RG, BOLAND NI, SPEARS N, MURRAY AA, CHAPMAN M, WADE JC, ZOHDY NI. The biology and technology of follicular oocyte development *in vitro*. *Reprod Med Rev*, v.2, p.29-152, 1993.

GRECO, D.; STANBENFELDT, G. H. endocrinologia In: Cunningham, JG. Tratado de Fisiologia Veterinária. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Cunningham, 2004.

GUTHRIE, H. D.; GARRETT, W. M.; COOPER, B. S. Follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod*, v.58, p.390-396, 1998.

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. *Biol Reprod*, v.56, p.608-616, 1997.

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*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 10 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 973, 2002.

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

HULSHOF SCJ, FIGUEIREDO JR, BEKERS JF, BEVERS MM, VAN DEN HURK R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart*, v.2, n.16, p.78-80, 1994.

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

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.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KNIGHT, P. G. & GLISTER, C. Local roles of TGF-superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science* 78, 165–183, 2003.

KOBAYASHI, N. et al. Growth Differentiation Factor-9 Mediates Follicle-Stimulating Hormone-Thyroid Hormone Interaction in the Regulation of Rat Preantral Follicular Development. *Endocrinology*. First published ahead of print October 15, 2009.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.37, n.3, p.215-224, 2009.

LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS, C. T. J. R. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology Review*, v. 16, p.143-163, 1995.

LEVI-SETTI PE, CAVAGANA M, BAGGIANI A, ZANONNI E, COLOMBO GV, LIPRANDI V. FSH and LH together in ovarian stimulation. *J Obst Gynecol Reprod Biol*, v.115, p.34-39, 2004.

LI, YANGXIN; GENG, YONG JUNG. A potencial role for insulin-like growth factor signaling in induction of pluripotent stem cell formation. *Growth Hormone e IGF Research*. v.20, n.6, p. 391-398, 2010.

LIU, H.; ZENG, W.; CAO, A.; ZHANG, C. Follicle-stimulating hormone promotes proliferation of cultured chicken ovarian germ cells through protein kinases A and C activation. *J Zhejiang Univ Sci B*. 11(12): 952–957, 2010.

LONGCOPE, C. The male and female reproductive system in hypothyroidism. In: Ingbar SH, Braverman LE (eds) *The Thyroid*. Lippincott, Philadelphia, pp 1052–1055, 1991.

LOUHIO, H. et al. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular Human Reproduction* vol. 6, no. 8, pp. 694-698, 2000.

MAGALHÃES, D. M.; SALES, E. T.; PADILHA, R. T.; SILVA, T. F. P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses *in vivo* e *in vitro*. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.36, n.1, p.32-38, 2012.

MAGLICH, J. M.; SLUDER, A.; GUAN, X.; SHI, Y.; McKEE, D. D.; CARRICK, K.; KAMDAR, K.; WILLSON, T. M.; MOORE, J. T. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. Genome Biology, v. 2, 2001.

MAO et al., Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. Biology of Reproduction, 67, 1197–1203, 2002.

MARTINELLI, C. E. JR.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Crescimento normal: avaliação e regulação endócrina. In: Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M (Ed.). Neuroendocrinologia básica e aplicada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.366-389, 2005.

MARUO, T. et al. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of folliclestimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. Endocrinology 121:1233–1241, 1987.

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 Endocrinol, (Copenh), v. 127, p. 152-160, 1992.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. Biol Reprod, v.63, p.811-819, 2000.

MOHSENI-ZADEH, S.; BINOUX, M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. Endocrinology, v. 138, p. 5645-5648, 1997.

MONGET, P. & BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. Mol. Cel. Endoc., v.163, p.89-93, 2000.

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

MONGET, P.; MONNIAUX, D.; DURAND, P. Localization, characterization, and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. Endocrinology. 125: 2486-2493, 1989.

NUNES, M. T. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. Review. Arquivo Brasileiro de Endocrinology e Metabologia, v. 47, p. 639-643, 2003.

PARROT JA, SKINNER MK. Kit ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. Endocrinology, v.140, p.4262-4271, 1999.

PASCUAL, A. ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. Biochimica et Biophysica Acta, 2012.

RIBEIRO, R. C. J. , APRILETTI, J. W., WAGNER, R. L., WEST, B.L., FENG, W., HUBER, R. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. Recent Prog Horm Res, v. 53, p. 351-94, 1998.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat, v.24, p.77-92, 1983.

SALHA, O. Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. Human Reproduction Update, Vol. 4, No. 6, pp. 816-832, 1998.

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. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.34, n.4, p.206-221, 2010.

SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E.; RIBEIRO, A. F. C.; SILVA C. M.; Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. Arquivo Brasileiro de Endocrinology e Metabologia, v. 45, p. 258-264, 2001.

SILVA JRV, THARASANIT T, TAVERNE MAM, VAN DER WEIJDEN GC, SANTOS RR, FIGUEIREDO JR, VAN DEN HURK R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. J Endocrinol, v.189, p.113-125, 2006.

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

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

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.

SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. Theriogenology. In press, 2009.

SLEBODZINSKI, A. B. Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid. The enigma of the thyroid ovary interaction. Domestic Animal Endocrinology, v. 29, p. 97–103, 2005.

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

SUDA, S. A.; GETTINS, P. G. W.; PATSTON, P. A. Linkagen between the hormone binding site and the reactive center loop of thyroxine binding globulin. Archives of Biochemistry and Biophysics., v. 384, p. 31-36, 2000

TONETTA, S. A. & DI ZEREGA, G. S. 1989 Intraovarian regulation of follicular maturation. Endocr Rev 10:205–229, 1989.

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.

WAKIM, A. N., et al. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. Fertil Steril ;59:1187–1190,1993.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. Reproduction Suppl, n.61, p.71-90, 2003.

WU, J.; NAYUDU, P. L.; KIESEL, P. S.; MICHELMANN, H. W. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. Biol Reprod, v.63, p.320-327, 2000.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiological Reviews. v. 81, p. 1097-142, 2001.

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 n.7 p. 555–562, 1997.

ZHAO, J., TAVERNE, M.A.M., G.C. WEIJDEN, VAN DER., BEVERS, M.M., R. HURK, VAN DEN. Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) Stimulates the Development of Cultured Rat Pre-Antral Follicles. Molecular Reproduction and Development v. 58, p. 287-296, 2001.

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.

ZHOU, J.; ADESANYA, O. O.; VATZIAS, G.; HAMMOND, J. M.; BONDY, C. A. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. Endocrinology, v.137, p.4893-4901, 1996.

9. CAPÍTULO III (Fase I)

O Hormônio Folículo Estimulante Humano (hFSH) mantém a ultraestrutura normal de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*

(The Human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) keeps the normal ultrastructure of caprine preantral follicles cultured in vitro)

O Hormônio Folículo Estimulante Humano (hFSH) mantém a ultraestrutura normal de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*

The Human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) keeps the normal ultrastructure of caprine preantral follicles cultured in vitro

Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do FSH humano (hFSH) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Fragmentos do córtex ovariano foram cultivados em α -MEM⁺ suplementado com 0, 10, ou 50 ng/mL de hFSH por um ou sete dias. Pequenos fragmentos de tecido ovariano não cultivado bem como daqueles cultivados foram processados para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram uma redução no percentual de folículos normais, após um ou sete dias de cultivo em todas as concentrações contendo ou não hFSH. A taxa de sobrevivência folicular foi semelhante entre si, dentro de cada dia de cultivo. O meio contendo 10 ng/mL de hFSH reduziu o percentual de folículos primordiais no dia um e sete de cultivo, não elevando o percentual nos folículos em desenvolvimento. Observou-se que o diâmetro folicular de tecido ovariano cultivado em meio α -MEM⁺ e meio acrescido de 10 ng/mL de hFSH não alterou, quando comparado com o controle (não cultivado). As análises ultraestruturais confirmaram a integridade de folículos cultivados por sete dias em meio contendo 10 ng/mL de hFSH. Em conclusão, o hFSH (10 ng/mL) é capaz de promover a ativação de folículos primordiais e manter a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* por até sete dias.

Palavras-chave: Caprino, folículos pré-antrais, hFSH, sobrevivência.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of human FSH (hFSH) on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. Fragments of the ovarian cortex were cultured in α -MEM⁺ supplemented with 0, 10, or 50 ng/ml of hFSH for one or seven

days. Small fragments of non-cultured ovarian tissue as well as those cultured were processed for classic histology and transmission electron microscopy. The results showed a reduction in the percentage of normal follicles, after one or seven days of culture at all the concentrations containing or not hFSH. The follicular survival rate was similar to each other, within each day of culture. The medium containing 10 ng/ml of hFSH reduced the percentage of primordial follicles on the culture days one and seven, not increasing the percentage in the developing follicles. It was observed that the follicular diameter of ovarian tissue cultured in α -MEM⁺ medium and medium supplemented with 10 ng/mL of hFSH did not change, when compared to the control (non-cultured). The ultrastructural analysis confirmed the integrity of follicles cultured for seven days in a medium containing 10 ng/mL of hFSH. In conclusion, the hFSH (10 ng/mL) is capable of promoting the activation of primordial follicles and maintaining the ultrastructural integrity of caprine preantral follicles cultured *in vitro* for until seven days.

Keywords: Caprine, preantral follicles, hFSH, survival.

Introduction

The mechanisms which control the initiation of ovarian follicular development, that is, the activation of the primordial follicles that are quiescent in the ovary, are still not completely known, as well as the time necessary for its growth and differentiation (FORTUNE et al., 2003). It is known that the follicular development is a complex process regulated by several autocrine, paracrine and endocrine factors in the ovary (RICHARDS, 1994). Among the endocrine factors, the Follicle Stimulating Hormone (FSH) is one of the most cited, which is a heterodimeric glycoprotein synthesized and secreted by gonadotropic cells present in the pituitary anterior portion (BROWN & MCNEILLY, 1999). There are several ways of extracting FSH, as from the urine of postmenopausal women, constituting the human menopausal gonadotropin (hMG), highly purified urinary FSH (uFSH), pituitary extract of domestic animals, especially swine (pFSH) and sheep (oFSH). In addition to these, recent studies have used the recombinant DNA technology, using hamster ovary cells producing the recombinant FSH (rFSH) (CALDER et al., 2003).

Some researches using molecular biology techniques have confirmed the expression of FSH receptors in granulosa cells (ZHENG et al., 1996) and in oocytes of swine (MÉDURI et al., 2002) and human follicles, in which it was observed FSH receptors in follicles with a layer of cubic granulosa cells (OKTAY et al., 1997), suggesting the action of FSH on the growth of preantral follicles (ROY & TREACY, 1993).

Studies about the *in vitro* culture of preantral follicles showed that the addition of FSH to the culture medium promotes the inhibition of apoptosis in large secondary follicles isolated in different species, such as murine (MCGEE et al., 1997), human (WRIGHT et al., 1999), ovine (CECCONI et al., 1999), bovine (GUTIERREZ et al., 2000) and porcine (MAO et al., 2002). An even more recent study confirmed the efficacy of porcine FSH to maintain the morphological integrity, promote the activation and growth of caprine preantral follicles cultured for seven days (MATOS et al., 2007a; MAGALHÃES et al., 2009a). However, despite several FSH sources as the porcine and ovine have already been used for the follicular development of domestic species, little is known about the *in vitro* effects of human FSH in goats. Promising results, in the context of the *in vitro* culture of caprine preantral follicles, assume a character of importance, considering the great economic importance of this species as the production of milk, meat and skin, providing an important protein source for the population of the tropics (RAHMAN et al., 2008). Thereby, the aim of the present study was to investigate the effect of human FSH on the survival, activation and growth of caprine preantral follicles, after the *in vitro* culture of ovarian tissue.

Materials and Methods

Source of ovaries

Ovaries (n = 16) from 8 adult non-pregnant mixed-breed goats (1-3 years of age) were collected from a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds and then washed again in MEM supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported to the laboratory in MEM at 4 °C within 1 h postmortem (CHAVES et al., 2008). Unless otherwise mentioned, human FSH and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Experimental protocol

In the laboratory, the ovaries were stripped of surrounding fat and fibrous tissue, and the ovarian cortex was recovered, placed in MEM supplemented with HEPES and divided into 7 pieces/ovary of approximately 3 x 3 mm (1 mm thick) in size using a needle and scalpel under sterile conditions. For each animal, one slice of tissue was randomly selected and immediately fixed for histological and ultrastructural analyses (fresh control: day 0). The remaining slices of ovarian cortex were cultured individually in 1 mL of culture medium in 24-well tissue culture dishes and incubated at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. The basic control medium, hereafter referred to as α -MEM⁺, consisted of α -MEM (pH 7.2 – 7.4) supplemented with ITS (insulin 10 μ g/mL, transferrin 5.5 μ g/mL and selenium 5 ng/mL), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, and 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA). The medium was supplemented with human FSH at different concentrations (0, 10 ou 50 ng/mL). Ovarian slices from each animal were cultured for 1 or 7 days in media supplemented with different concentrations of human FSH and each treatment was repeated eight times. The culture media was stabilized at 39 °C for 1 h prior to use and was replenished every second day in the tissue cultures.

Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

Fresh control and cultured tissues were fixed in Carnoy for 4 h and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), the wax blocks containing the caprine tissues were completely and serially sectioned (7- μ m sections), mounted on individual glass slides and stained with Periodic Acid Schiff–hematoxylin (PAS staining system; Sigma). Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined under a microscope (Olympus, Japan) at 100 and 400 magnification by a single observer. Care was taken to count each follicle only once as we have previously done in our earlier studies (MATOS et al., 2007b). Each follicle was examined in every section and matched with the same follicle on adjacent serial sections in order to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once regardless of its size.

The developmental stages of follicles have been defined previously (SILVA et al., 2004) as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or developing follicles. Developing follicles can be subdivided into intermediate (both flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte) and secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). In the current study, follicles were individually classified as histologically normal even when an intact oocyte was present, and the follicle was surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and had no pyknotic nucleus (Fig. 1A). Atretic (degenerated) follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane (Fig. 1B). Overall, 240 preantral follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment for one repetition $\times$ eight repetitions = 240 follicles). The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated on day 0 (fresh control) and after culture at each concentration of hFSH.

To evaluate follicular activation and growth, only intact follicles with a visible oocyte nucleus were recorded, and the proportion of primordial and growing follicles were calculated at day 0 (fresh control) and after 1 or 7 days of culture in the various culture conditions tested. In addition, using only normal follicles, major and minor axes of each oocyte and follicle were measured using a light microscope fitted with an eyepiece micrometer (Zeiss, Cologne, Germany) under 400 $\times$ magnification. The average of these two measurements was used to determine the diameters of each oocyte and follicle.

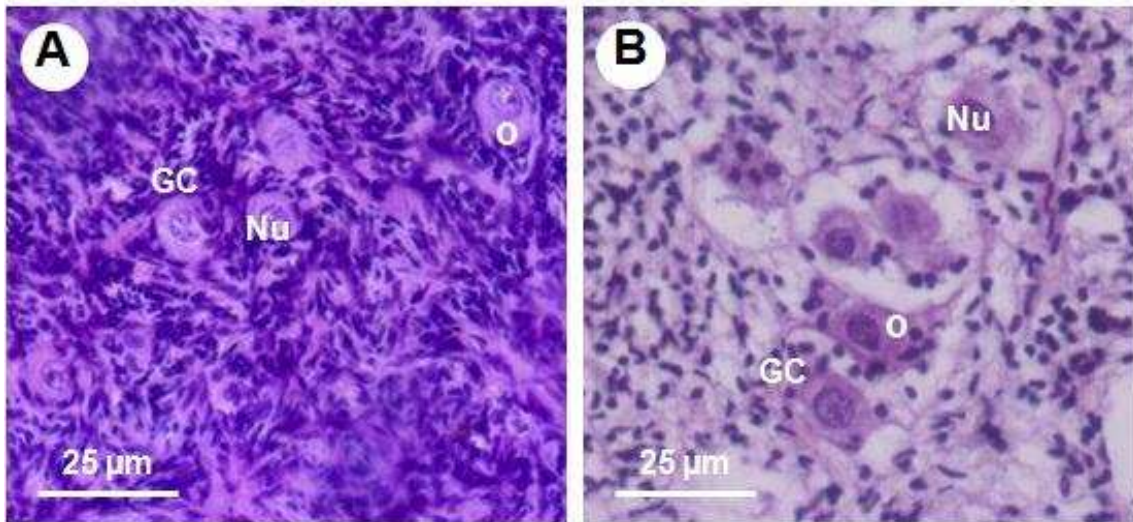


Figure 1. Histological sections of ovarian fragments after Periodic Acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal (A) and degenerated (B) follicles after culture with 50 ng/mL hFSH after 7 days of culture. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell (Original magnification 400×). Scale bars represent 25 µm.

Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles

For better evaluation of follicular morphology, ultrastructural studies were carried out on fragments of fresh control tissues and those tissues with the best results obtained from histological analysis after 1 and 7 days of culture. Briefly, 1-mm³ pieces of goat ovarian tissues were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 4 h at room temperature. After fixation, fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide, and in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated through an acetone gradient, and the tissues were embedded in Epon 812 resin. For light microscopy studies, sections of 3-µm thickness were cut on an ultramicrotome (MT2-B, Sorvall, USA) and stained with toluidine blue. Ultra-thin sections of 60–70 nm thickness were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a EM 109 Zeiss (EM, Berlin, Germany) transmission electron microscope (TEM). The density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, as well as vacuolization and basement membrane integrity, were evaluated.

Statistical analysis

The variables were submitted to Normality (Lilliefors) and Homoscedasticity (Cochran) tests and posteriorly to the analysis of variance at a probability of 5%. In case a significance was presented, the Tukey test was carried out (PROC ANOVA; SAS, 2002).

Results

Effect of human FSH on follicular survival

1,680 preantral follicles were analyzed in the present study, using classic histology. The percentages of morphologically normal follicles in fresh control (non-cultured tissue) and after one or seven days of *in vitro* culture, in the absence or presence of FSH, are presented in Table 1. After the *in vitro* culture period, a reduction ($P < 0.05$) on the percentage of normal follicles in all the treatments was confirmed, when compared to the fresh control (93.8%). However, there was no difference ($P > 0.05$) on the normal follicles rate of the different treatments (0, 10 and 50 ng/mL of human FSH) with one and seven days of culture. With the progression of the *in vitro* culture period from one to seven days, there was a reduction ($P < 0.05$) on the percentage of normal follicles at the concentrations of 10 and 50 ng/mL of FSH (72.1 and 72.1 % respectively), which did not occur for the follicles cultured in a medium without FSH, in which the percentage of normal follicles (77.5%) was maintained ($P < 0.05$).

Table 1. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of hFSH (concentrations in ng/mL).

Control	93,8 ± 1,0	
	Normal	
Treatments	Day 1	Day 7
hFSH 0	80,4 ± 4,2 ^{*aA}	77,5 ± 2,1 ^{*aA}
hFSH 10	80,8 ± 1,5 ^{*aA}	72,1 ± 1,7 ^{*aB}
hFSH 50	78,8 ± 2,1 ^{*aA}	72,1 ± 1,8 ^{*aB}

*Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture (P<0.05); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment (P<0.05).

Activation of caprine primordial follicles after in vitro culture

The percentages of normal primordial and developing follicles in fresh tissues or for one or seven days in different culture conditions are presented in Figure 2. The fresh ovarian tissues contained predominantly primordial follicles (55.4%) and also presented developing follicles (38.3%). There was a reduction (Fig. 2, P <0.05) in the percentage of primordial follicles, after one day of culture, when the FSH at the concentration of 10 ng/mL was used, compared to the fresh control, occurring the same to the other treatments, after seven days of culture. However, concerning the percentage of developing follicles, no difference (Figure 2, P <0.05) of the treatments was observed when compared to the fresh control.

The addition of human FSH in *in vitro* cultured tissues had no effect on the percentage of primordial and developing follicles when compared to the tissues cultured in a medium without FSH (P> 0.05). With the progression of the culture period from one to seven days, a decrease in the percentage of primordial follicles in the tissues cultured with 10 and 50 ng/mL of FSH (Figure 2, P <0.05) was observed. However, as for the developing follicles, no difference (P> 0.05) was observed in the different tested treatments (Fig. 2).

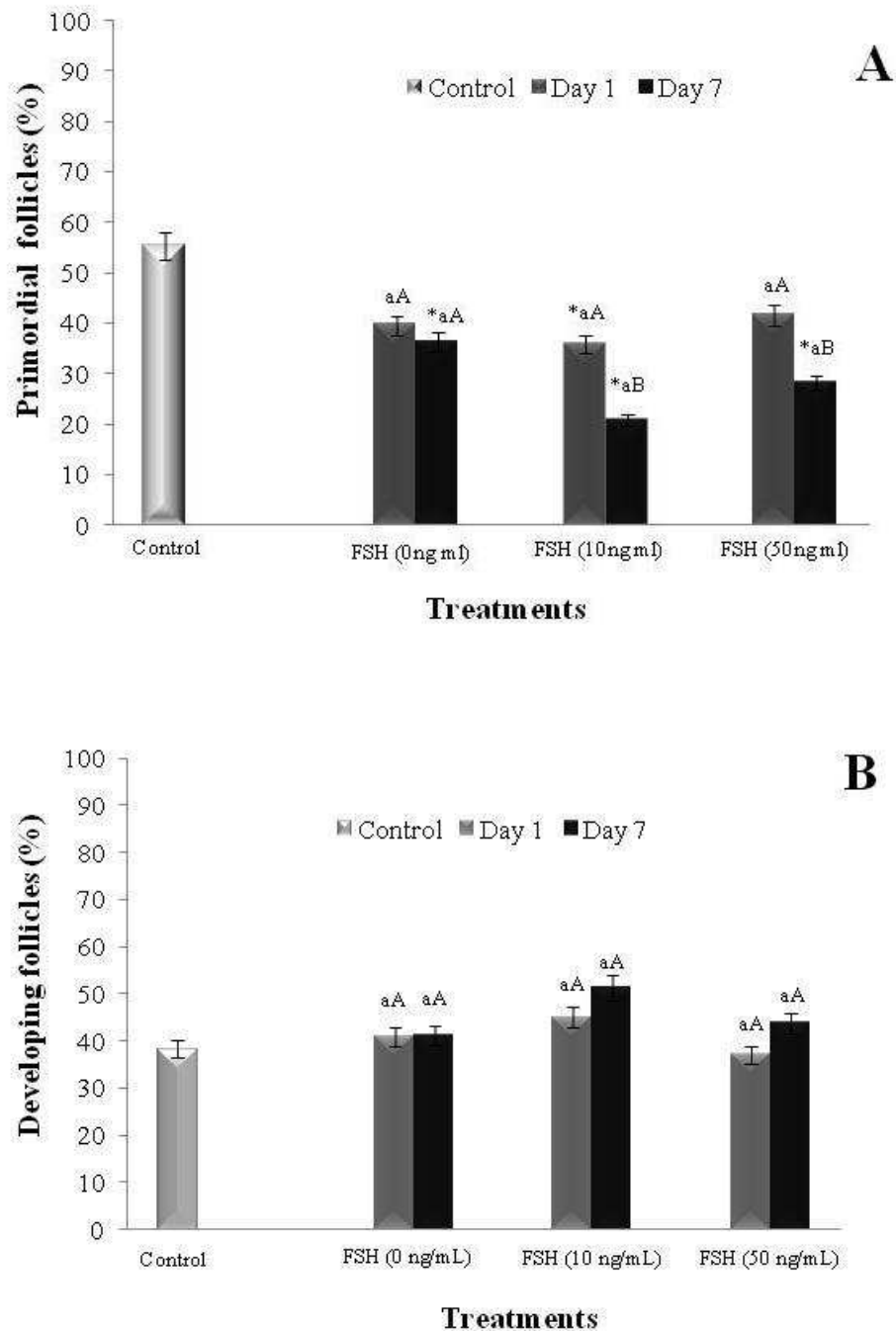


Figure 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of hFSH (concentrations in ng/mL). *Differs significantly from control follicles ($P < 0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P < 0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P < 0.05$).

Evaluation of oocyte and follicular cell diameters in fresh and cultured tissues

The oocyte and follicular cell diameters were measured and are presented in Table 2. In relation to the oocyte cell diameter, there was a reduction ($P < 0.05$) after one and seven days of culture in all the treatments, when compared to the non-cultured control. This decrease in the oocyte cell diameter was higher ($P < 0.05$) in tissues cultured with 50 ng/mL of hFSH, when compared to the other treatments. This reduction was more accentuated ($P < 0.05$) in the follicles cultured for seven days with 50 ng/mL of hFSH.

The tissue culture in a medium with 50 ng/mL of hFSH promoted a reduction ($P < 0.05$) in the follicular cell diameter, after one and seven days of culture, when compared to the fresh control, as well as to the other treatments. With the progression of the culture period, the addition of hFSH (10 and 50 ng/mL) led to a reduction ($P < 0.05$) in the follicular cell diameter, being the diameter maintained in the treatment in which hFSH (0 ng/mL) was not added.

Table 2. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of hFSH (concentrations in ng/mL).

Oocyte diameter (μm)			Follicle diameter (μm)	
Control	29,6 $\pm$ 0,8		37,9 $\pm$ 1,4	
Treatments	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
hFSH 0	25,6 $\pm$ 0,7 ^{*aA}	25,5 $\pm$ 0,8 ^{*aA}	35,2 $\pm$ 1,0 ^{aA}	35,3 $\pm$ 1,6 ^{aA}
hFSH 10	27,2 $\pm$ 0,7 ^{*aA}	25,4 $\pm$ 0,6 ^{*aA}	38,2 $\pm$ 1,0 ^{aA}	34,3 $\pm$ 1,1 ^{aB}
hFSH 50	20,0 $\pm$ 0,5 ^{*bA}	18,6 $\pm$ 0,5 ^{*bB}	27,5 $\pm$ 0,7 ^{*bA}	23,7 $\pm$ 0,5 ^{*bB}

*Differs significantly from control follicles ($P < 0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P < 0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P < 0.05$).

Ultrastructural features of cultured follicles

The ultrastructural analysis was performed on non-cultured tissues (control, day 0, Fig 3A) and in tissues cultured with 10 ng/mL of hFSH (Fig. 3B) for seven days. The ultrastructural features of the follicles from the fresh control tissue or from tissues

cultured for seven days with 10 ng/mL of hFSH were similar and exhibited intact oocytes and basement and nuclear membranes (Figure 3A and 3B, respectively) and descondensed chromatin (Fig. 3A). Furthermore, the follicles exhibited uniformly distributed organelles in the cytoplasm, especially the endoplasmic reticulum and mitochondria. The granulosa cells were ultrastructurally normal and well organized around the oocyte, revealing a large and elongated nucleus.

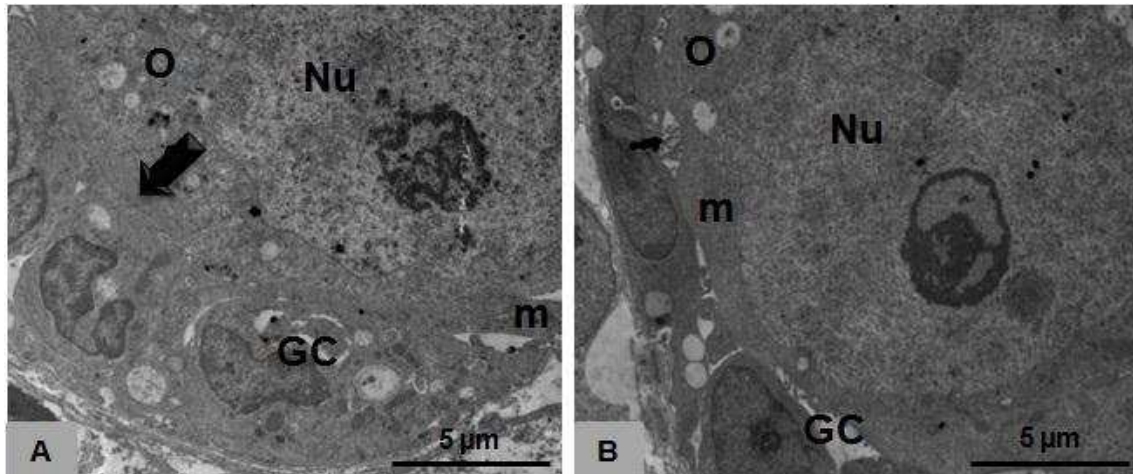


Figure 3. Ultrastructural analysis (A) of non-cultured preantral follicle (control; original magnification 4400x); (B) and follicle cultured for 7 days in medium containing 10 ng/mL hFSH (original magnification 4400x). Note the large nucleus of the granulosa cells in the control follicles and follicles cultured in 10 ng/mL of hFSH. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells; m: mitochondria; arrow-oocyte plasma membrane. (A and B = 5 µm).

Discussion

Many researches are conducted to elucidate all the hormonal mechanisms that control the ovarian development. However, more recently, attention was fixed on which substances could and should be tested and used to identify the pathways that regulate folliculogenesis in its initial stage, promoting a suitable microenvironment for ovarian development, thereby contributing to the reproductive competence of the animals. However, few studies are conducted using human FSH in the addition of *in vitro* culture media in animal research. In this study, two different human FSH concentrations (10

and 50 ng/mL) were used during one and seven days of culture, these treatments were compared to evaluate the influence of this hormone on the survival and *in vitro* growth of goat preantral follicles. In other researches the use of porcine and recombinant FSH were used during the *in vitro* culture by Matos et al. (2007a) and Magalhães et al. (2009a), respectively, to evaluate the influence of FSH on the survival and *in vitro* growth of goat preantral follicles.

With the progression of the culture period from one to seven days, the α -MEM⁺ without hFSH maintained the percentage of normal follicles. It is known that the composition of the medium is an important factor for the success during the *in vitro* culture of preantral follicles. The α -MEM⁺ used in the present study is one of the richest MEM formulas and is composed by 21 essential amino acids, vitamin B complexes, vitamins C and D, inorganic salts, and pyruvate. This medium was also supplemented with glutamine, hypoxanthine, BSA, and ITS. According to Silva et al. (2004), the addition of hypoxanthine and energy substrates such as glutamine and pyruvate, as well as BSA and ITS for the base culture medium (MEM) significantly increases the follicle cell survival in the culture. Additionally, the reduction in the percentage of normal follicles with the progression of the culture in the presence of hFSH may have occurred due to the type of FSH used. This hormone is obtained from human pituitary, which may present traces of contamination of LH activity, with 15 to 20% of contamination (BARROS & NOGUEIRA, 2005; BARUSELLI et al., 2006).

One of the most relevant factors that change the hormone bioactivity is the purity degree after its preparation (CLOSSET & HENNEN, 1989; BOUSFIELD et al., 2008). The α -MEM⁺ medium without the presence of hFSH during the culture was able to maintain the percentage of normal follicles until the day seven of culture. According to Magalhães et al. (2009a), the higher the purity degree of the hormone (recombinant FSH) to be used, the better is the efficiency of this hormone in maintaining the viability of the preantral follicle after the *in vitro* culture. This suggests that the isoforms are influenced by the presence or absence of other proteins, such as LH. It has been reported that the LH associated to the FSH results in degeneration of caprine preantral follicles cultured *in vitro*, with numerous vacuoles in the cytoplasm (SARAIWA et al. 2008). These vacuoles are the first signs of degeneration observed in atretic follicles and can represent a dilated endoplasmic reticulum or altered mitochondrial development (goats: SILVA et al., 2002; sheep: JORIO et al., 1991). The presence of 15 to 20% of

LH in the FSH composition may explain why the treatments of 10 and 50 ng/mL of FSH could not maintain the survival of preantral follicles up to seven days of culture.

As it is known, LH is indispensable for the final growth of the follicles and for the complete maturation of oocytes, in the antral phase (MELO et al., 2004). However, its role in the initial phase (preantral follicles) is not clearly defined (SALVETTI et al., 2007). Corroborating with the results in the present study, researchers showed that swine FSH induces the degeneration in small bovine preantral follicles (NUTTINCK et al., 1996). In agreement to these observations, Silva et al. (2004) did not observe a significant effect of pFSH on follicular survival, after five days of culture.

Unlike the found results, Magalhães et al. (2009a), using 10 ng/mL of swine FSH, verified that 65% of the caprine preantral follicles were morphologically normal, after one day of culture. When 50 ng/mL of recombinant FSH was used in the culture medium, the follicular cell survival was maintained during the culture for seven days (71%). Similar results were found by Matos et al. (2007a) during the *in vitro* culture of caprine preantral follicles with 10 ng/mL and 50 ng/mL of swine FSH (64% and 66% respectively), for one and seven days. These contradictions may be due to differences between the species, the hormones used during the culture, the concentrations tested, as well as the experimental model used.

Regarding the follicular activation (that is, the transition from primordial to developing follicles, BETTERIDGE et al., 1989), the addition of 10 ng/mL of human FSH from one day of culture led to a decrease in the percentage of primordial follicles compared to the fresh control. These results are in agreement with those previously obtained in *in vitro* studies with goats (MAGALHÃES et al., 2009b), in which the addition of 10 ng/mL of Folltropin was able to provide satisfactory activation rates at day one of culture. Another study also conducted by Magalhães et al. (2009a) showed that the addition of 10 ng/mL of recombinant FSH (rFSH) and 10 ng/mL of swine FSH stimulated the follicular activation for one and seven days of culture. In this study it was also verified that, with the progression of the culture from one to seven days, the addition of FSH to the culture medium at both concentrations, that is, 10 or 50 ng/mL, led to a decrease in the percentage of primordial follicles, which did not happen when the α -MEM⁺ base medium without hFSH was used. However, in relation to the developing follicles, no effect was observed in the different treatments when compared to the fresh control. Studies indicate that FSH can act directly in the follicle by binding to its receptor located in the granulosa cells (XU et al., 1995; ULLOA-AGUIRRE et al.,

1995; O'SHAUGHNESSY et al., 1996) or indirectly (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005), through the stimulation of some growth factors, such as Kit Ligand (KL), Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15), and Growth and Differentiation Factor-9 (GDF-9), that are essential for the follicular activation and development (NILSSON & SKINNER, 2001; CELESTINO et al., 2010).

Comparing the results at day seven of culture, an expected evolution would be a decrease in the number of primordial follicles, with a consequent increase in the number of developing follicles. However, this condition was not found in the present experiment. It is probable that the FSH has not been able to prevent the degeneration of the developing follicles after their activation. According to Nuttinck et al. (1996), the addition of FSH in a culture medium increases the oocyte degeneration rate of small bovine preantral follicles, during seven days of culture. However, this condition was not verified by Derrar et al. (2000), when adding 5 ng/mL of FSH. Also Fortune et al. (1998) did not find negative effect with the addition of 1, 10 or 100 ng/mL of FSH in the culture medium.

In the present study, the *in vitro* culture in the different media did not provide an increase in the oocyte cell diameter, even after seven days of culture. Furthermore, the medium containing 50 ng/mL of hFSH led to a lower diameter when compared to the other treatments. A decrease in the diameter with the progress of culture from one to seven days also occurred. It is probable that this occurred due to the oocyte degeneration in larger preantral follicles during the culture period, since in the preantral phase, the oocyte is more sensitive to degeneration than the granulosa cells (SILVA et al., 2002).

In addition, Joyce et al. (1999) reported that FSH stimulates the expression of mRNA of the Kit Ligand (KL) in granulosa cells of preantral follicles. The KL has been shown to be essential for the oocyte growth (EPPIG, 2001; NILSSON & SKINNER, 2001) during the initial stages of follicular development (mice: KLINGER & De FELICI, 2002; rabbit: HUTT et al., 2006). However, for the oocyte growth to occur, it is necessary the contact of the KL with the granulosa cells (THOMAS & VANDERHYDEN, 2006), the action exerted by KL is modulated by the presence of gap junctions (KLINGER & De FELICI, 2002) according to the phase of the oocyte. The explanation for not occurring the oocyte growth is that the FSH used in the present experiment has failed to stimulate the mRNA for the KL, for the action to happen. It is possible that the lack of human FSH effect on the oocyte growth occurred due to the

deficiency of some substance produced by the ovary, needed for the signal of the follicular development. During the conditions of the culture system, this substance may be absent or its expression changed, not succeeding to increase the oocyte size (EPPIG, 2001).

In relation to the follicular diameter (Table 2), the addition of hFSH (10 and 50 ng/mL) to the culture medium led to a reduction in this diameter, with the progression of culture from one to seven days. Moreover, this diameter was lower than the control, with the addition of 50 ng/mL of hFSH to the medium. These results differ from the results observed by Magalhães et al. (2009a) and Matos et al. (2007a), which showed an increase in the growth of follicles and oocytes in goats cultured for seven days at the concentrations of 50 ng/mL of recombinant FSH (rFSH) and 50 ng/mL of pFSH, respectively. Other authors have also shown that rFSH increased the diameter of follicular and oocyte cells in cattle, after 13 days of culture (ITOH et al., 2002). In addition, it was reported that the expression of FSH receptors developed progressively during the transition from primordial to primary and secondary follicles (OKTAY et al., 1997). Méduri et al. (2002) detected the presence of FSH receptors in oocytes from porcine and human follicles. Since there are FSH receptors in oocytes, it is possible that FSH has to act in both cell types for promoting follicular development and growth (MÉDURI et al. 2002).

Previous studies have reported that, after the culture with human preantral follicles, it was found that FSH increased the follicular cell diameter, suggesting that this hormone has an antiapoptotic and mitogenic effect (WRIGHT et al., 1999). The reduction of the follicular and oocyte cell diameter observed in the present experiment may be attributed to the culture medium employed, that may not be adequate enough to maintain the survival of larger preantral follicles. Consequently, as only the morphologically normal follicles were considered for the diameter evaluation, the reduction in the number of larger follicles by the end of the culture period leads to a decrease in the average value for this parameter. Another possible explanation would be the fact that, even the FSH receptors being expressed in oocytes and granulosa cells in humans, it is believed that the same receptors that are expressed in humans do not make the same effect as those expressed in goats.

Several studies have demonstrated that the TEM analysis, after the *in vitro* culture of preantral follicles, is an important tool for the knowledge of the ultrastructural features of the follicles (ZHAO et al., 2000; SALEHNIA et al., 2002), because it reveals

more information about the quality of follicles and oocytes and can detect damage to cell membranes and organelles (LUCCI et al., 2001). In this study, TEM revealed that the follicles cultured for seven days in α -MEM⁺ with 10 ng/mL of hFSH presented an ultrastructurally normal aspect, which confirms the results observed in the light microscopy analysis. Using the TEM, it was observed that only the tissues of the fresh control and tissues cultured for seven days in the presence of 10 ng/mL of hFSH were preserved. Thereby, it was observed that mitochondria, endoplasmic reticulum and granulosa cells were intact, as well as the basal membranes and nuclear envelope. The normal follicles in this study showed an ultrastructure similar to the caprine follicles previously described (LUCCI et al., 2001), as well as bovine and ovine follicles (CRAN et al., 1980).

Conclusions

The results found in the present experiment permit to conclude that several FSH preparations affect differently the *in vitro* culture performance of caprine preantral follicles. This study with caprine preantral follicles showed that the concentration of 10 ng/mL of hFSH is capable of promoting the activation of primordial follicles. Moreover, the results showed the vital role of hFSH in the maintenance of the ultrastructural integrity of caprine preantral follicles cultured *in vitro* for until seven days.

Acknowledgments

To CNPq for the financial support to the research. To CAPES for providing the scholarship to the Doctorate student. To the core of Microscopy and Microanalysis of UFV for the support in the ultrastructural analysis.

References

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. Embryo Transfer News Letter., v. 23, p. 5-9, 2005.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v. 65, p. 77-88, 2006

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*. *J Reprod Fertil*, v.38, p.87-98, 1989.

BOUSFIELD, G. R.; BUTNEV, V. Y.; BIDART, J. M.; DALPATHADO, D.; IRUNGU, J.; DESAIRE, H. Chromatofocusing Fails To Separate hFSH Isoforms on the Basis of Glycan Structure. *Biochemistry*, v. 47, p. 1708-1720, 2008.

BROWN, P.; MCNEILLY, A. S. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Rev Reprod*, v.4, p.117-124, 1999.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulusoocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.14, n. 14, p. 1-12, 2003.

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

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B., et al. Steady-state level of Kit Ligand mRNA in goat ovaries and the role of Kit Ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v. 77, p. 231-240, 2010.

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

CLOSSET, J.; HENNEN, G: Biopotency of highly purified porcine FSH and human LH on gonadal function. *Journal of Endocrinology*, v.120, p.89–96, 1989.

CRAN, D. G.; MOOR, R. M.; HAY, M. F. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J Reprod Fertil*, v. 59, p. 125–132, 1980.

DERRAR, N.; PRICE, C. A.; SIRARD, M. A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. *Theriogenology*, v.54, p.587-598, 2000.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829–38, 2001.

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

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.

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*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.

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. *Biol Reprod*, v. 75, p. 421–433, 2006.

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.1099–105, 2002.

JORIO, A.; MARIANA, J. C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdit shee. J. Reprod. Fert, v. 26, p. 239-250, 1991.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K. & EPPIG, J. J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. Dev. Biol, v. 214, p. 342-353, 1999.

KLINGER, F. G.; DE FELICI, M. *In vitro* development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: Stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. Dev Biol, v. 244, p. 85-95, 2002.

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 Rumin Res, 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. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*, Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 46, p. 378-386, 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. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. Biocell, v. 33, p. 91-97, 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 follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. Biol Reprod, v.67, p.1197-1203, 2002.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; B'AO, S. N.; LUCCI, 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.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D. B.; ROCHA, R. M. P.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle Stimulating Hormone and Fibroblast Growth Factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 677-684, 2007(b).

MCGGEE, E. A.; 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.

MÉDURI, G., CHARNAUX, N., DRIANCOURT, M. A., COMBETTES, L., GRANET, P., VANNIER, B., LOOSFELT, H. & MIGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 87, p. 2266–76, 2002.

MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; MONTEIRO, F.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. *Acta Sci Vet.*, v.32, p.208, 2004.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular Interactions That Control Primordial Follicle development and Folliculogenesis. *J Soc Gynecol Invest*, v. 8, p. 17-20, 2001.

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

OKTAY, K., BRIGGS, D. & GOSDEN, R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 82, p. 3748–51, 1997.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; DUDLEY, K. & RAJAPAKSHA, W. R Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. Mol. Cell. Endocrinol, v. 125, p. 169–75, 1996.

RAHMAN, A. N. M. A.; ABDULLAH, R. B.; WAN KHADIJAH, W. E. A review of reproductive biotechnologies and their applications in goat. Biotechnology, v. 7, p. 371-384, 2008.

RICHARDS, J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. Endocr Rev 15:725–751, 1994.

ROY, S. K. & TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human pre-antral follicles. Fert. Steril, v. 59, p. 783–91, 1993.

SALEHNIA, M.; MOGHADAN, E. A.; AND VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. Fert Steril, v. 78, p. 644-645, 2002.

SALVETTI, P.; THEAU-CLÉMENT, M.; BECKERS, J. F.; HURTAUD, J.; GUÉRIN, P. NETO, V.; FALIÈRES, J.; JOLY, T. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. Theriogenology, v. 67, p. 1185-1193, 2007.

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

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

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 preantral 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. M.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; DE 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.

THOMAS, F. H.; VANDERHYDEN, B. C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 19, p. 1–8, 2006.

ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY, A. R. JR.; BEITINS, I. Z. & PADMANABHAN, V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev*, v. 16, p. 765–87, 1995.

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.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W, et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*, v. 53, p. 951–957, 1995.

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.

ZHAO, J.; DORLAND, M.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; AND VAN DEN HURK, R. *In vitro* culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Mol. Reprod. Develop*, v. 55, p. 65-74, 2000.

ZHENG, W.; MAGID, M. S.; KRAMER, E. E, et al. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am. J. Pathol*, v. 148, p. 47-53, 1996.

10. CAPÍTULO IV (Fase I)

Influência do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

(Influence of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) on the survival and the in vitro development of caprine preantral follicles)

Influência do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

*Influence of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) on the survival and the *in vitro* development of caprine preantral follicles*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) na sobrevivência, ativação (transição de folículos primordiais para primários) e crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. Fragmentos de córtex ovariano foram cultivados por um e sete dias na ausência ou presença de IGF-I (0, 50 e 100 ng/mL). Os tecidos não cultivados e cultivados foram processados e analisados por histologia e microscopia eletrônica de transmissão. O cultivo por um dia em meio com 100 ng/mL de IGF-I apresentou 86,7% de folículos morfolologicamente normais. Estes resultados foram semelhantes ($P>0,05$) ao percentual de folículos normais encontrados no controle (96,7%). Verificou-se ainda que este meio aumentou o percentual de ativação folicular (folículos em desenvolvimento) com um dia de cultivo. Os diâmetros ovocitário e folicular mantiveram-se semelhantes ao controle ao cultivar por um dia em meio contendo 100 ng/mL de IGF-I. As análises ultraestruturais não confirmaram a integridade folicular dos fragmentos em meio contendo IGF-I (100 ng/mL) após um e sete dias de cultivo. Em conclusão, esse estudo demonstrou que a adição de 100 ng/mL de IGF-I no meio de cultivo ativa o desenvolvimento de folículos pré-antrais de caprinos com um dia de cultivo. Entretanto, não é suficiente para manter a integridade folicular e a taxa de sobrevivência folicular após sete dias de cultivo.

Palavras-chave: Caprino, cultivo, folículos pré-antrais, IGF-I, ovário.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of the insulin-like growth factor -I (IGF-I) on survival, activation (transition from primordial to primary follicles) and growth of caprine preantral follicles cultured *in vitro*. Fragments of ovarian cortex were

cultured for one and seven days in the absence or presence of IGF-I (0, 50 and 100 ng/ml). The non-cultured and cultured tissues were processed and analyzed by histology and transmission electron microscopy. The culture for one day in a medium with 100 ng/ml of IGF-I showed 86.7% of morphologically normal follicles. These results were similar ($P > 0.05$) to the percentage of normal follicles found in the control (96.7%). It was also found that this medium increased the percentage of follicular activation (developing follicles) with one day of culture. The oocyte and follicular diameters remained similar to the control by culturing for one day in a medium containing 100 ng/ml of IGF-I. The ultrastructural analysis did not confirm the integrity of the follicular fragments in a medium containing IGF-I (100 ng/ml) after one and seven days of culture. In conclusion, this study demonstrated that the addition of 100 ng/ml of IGF-I in the culture medium enables the development of preantral follicles of goats with one day of culture. However, it is not sufficient to maintain the follicular integrity and the follicular survival rate after seven days of culture.

Keywords: Caprine, culture, preantral follicles, IGF-I, ovary.

Introduction

The mechanisms which control the initiation of follicular development (the activation of primordial follicles) and the time required for their growth and development are still poorly known (Fortune, 2003). Therefore, it is necessary to develop an efficient culture system that allows the activation and the development of preantral follicles to later stages of growth. Furthermore, the *in vitro* culture may provide a better understanding of the factors involved in folliculogenesis in the initial (preantral) phase. Among these factors, the insulin-like growth factor I (IGF-I) can be highlighted.

Some growth factors involved in the process of preantral follicular growth have already been studied during the *in vitro* culture. Thus, Armstrong et al. (1998) and Woad et al. (2000) showed the role of IGF-I in the control of follicular growth. The action of IGF-I is controlled by its association with IGF binding proteins (IGFBPs), which can inhibit or facilitate the action of IGF (Monget & Bondy, 2000). The IGF-I acts as an amplifier of the hormonal action of the gonadotropins. This growth factor

enhances the binding between the granulosa, theca and interstitial cells (Adashi, 1998), assuming a greater effect on follicular development (Monget et al., 2002). The IGF type I receptor (IGF-IR) is expressed in the theca and granulosa cells in preantral and antral follicles of cattle, being the expression in granulosa cells higher in comparison to the theca cells (Armstrog et al., 2000). It occurs also the expression of IGF-IR in the corpus luteum, which is not influenced by the estrous cycle phase (Woad et al., 2000). In cattle and sheep follicles an expression of significant levels of IGF was not found (Perks et al., 1995). However, in goats the mRNA for IGF-I was expressed in all the follicular categories, being the granulosa and the theca cells of antral follicles the main responsible for the IGF-I production in this follicular class (Hastie & Haresign, 2006).

The responsiveness of IGF-I in the follicles has been demonstrated through several *in vitro* studies. The addition of IGF-I during the *in vitro* culture maintains the oocyte survival and stimulates the growth of bovine (Gutierrez et al., 2000), human (Louhio et al., 2000) and murine (Zhao et al., 2001) preantral follicles. During the *in vitro* culture of preantral follicles of mice it was observed a significant increase in the follicular diameter when IGF-I was added to the culture medium, along with FSH. In addition, a synergism between IGF-I and FSH was also observed in the follicular inhibin secretion (Liu et al., 1998). These results support the hypothesis that IGF-I acts in synergy with FSH in inducing the development of granulosa cells, by the regulation of the expression of receptors for FSH. Additionally, FSH was described as the hormone that stimulates the increase of IGF-I receptors during the *in vitro* culture of granulosa cells (Pawshe, 1998), suggesting that some FSH effects could be mediated via IGF-I (Adashi, 1985). Although IGF-I has a stimulatory effect on follicular growth in the preantral phase, McCaffery et al. (2000) highlighted the importance of its regulatory mechanism, showing that the inadequate exposure of IGF-I in bovine preantral follicles has a negative effect on the oocyte development.

However, very little is known about the involvement of IGF-I in the regulation of preantral follicular development of goats. The present study was designed in order to investigate the possible influence of IGF-I in the culture medium, at different concentrations (0, 50 and 100 ng/mL), on survival, activation and growth of preantral follicles enclosed in caprine ovarian tissue.

Materials and Methods

Ovaries

Ovaries (n=16) from eight adult (1 – 3 years old), non-pregnant mixed breed goats were collected at a local slaughterhouse. The animals were cyclic and in good body condition. Immediately after death of the animals, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds and then washed again in MEM supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported to the laboratory in MEM at 4 °C within 1 h postmortem (Chaves et al., 2008).

In vitro culture of ovarian tissue

In the laboratory, the ovarian cortex of each pair of ovaries was divided in to 7 fragments of approximately 3 x 3 mm (1 mm thick). One fragment (non-cultured control) was immediately fixed in Carnoy's fluid for 4 h for histological studies, while a smaller fragment (1 mm³) was randomly collected and subsequently fixed in paraformaldehyde 2% and glutaraldehyde 2.5% in sodium cacodylate buffer 0.1 M (pH 7.2) for ultrastructural examination. The other fragments of ovarian cortices were individually *in vitro* cultured in 1 mL of culture medium for one or seven days at 39°C with 5% CO₂ in air using a 24-well culture dish. The control medium was MEM supplemented with ITS (insulin 10 µg/mL, transferrin 5.5 µg/mL and selenium 5 ng/mL), 2 mM glutamine; 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/mL BSA, called α -MEM+. This control medium was tested alone (cultured control) or supplemented with different concentrations (50, 100 ng/mL day 1, 50 and 100 ng/mL day 7) of IGF-I. All chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co., unless otherwise indicated. Every 2 days, the culture medium was replaced by fresh medium and each treatment was repeated eight times.

Histological evaluation of preantral follicles

After either 1 or 7 days of culture in each media, the ovarian fragments from each treatment, including the fresh control, were fixed individually in Carnoy for 4 h. After fixation, tissues were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, clarified

with xylene, and embedded in paraffin wax. Serial sections (7 μm) were cut, and mounted on a glass slide and stained with Periodic Acid Schiff – hematoxylin (PAS staining system, Sigma, Inc., St. Louis, MO, USA). Coded anonymized slides were examined using a microscope (Olympus, Japan) under 400 $\times$ magnification.

Preantral follicles were individually classified according to the shape and number of granulosa cell layers around the oocyte: as either primordial, with one layer of flattened granulosa cells; or as developing follicles, which were further classified as intermediate, with one layer of both flattened and cuboidal granulosa cells; primary, with a single layer of cuboidal granulosa cells; or secondary, with two or more layers of cuboidal granulosa cells (Silva et al., 2004). Primordial and developing follicles were individually determined to be morphologically normal when they showed a healthy oocyte (without a pyknotic nucleus) with granulosa cells organized in layers. Otherwise, degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, with a pyknotic nucleus, or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall, 240 follicles were evaluated for each treatment (each medium and each culture period). The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated on day 0 (fresh control) and after culture in the various media tested. In addition, oocyte and follicular diameters were measured with the aid of an ocular micrometer, using only normal follicles from day 0 and *in vitro* cultured follicles thereafter. Two perpendicular diameters were recorded for each follicle and the averages for each of these two values were reported as follicle and oocyte diameters, respectively. Care was taken to count each follicle only once (Matos et al., 2007a). Only follicles with a visible oocyte nucleus were evaluated in order to avoid counting the same follicle twice.

Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles

For a more in-depth evaluation of follicular morphology after histological analysis, ultrastructural studies were performed on fragments of fresh control tissue and treatment groups that maintained follicular survival and promoted growth after seven days of culture. A portion with a maximum dimension of 1-mm³ was cut from each fragment of ovarian tissue and fixed in Karnovsky solution (2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2) for 4 h at room temperature (RT). After three washes in sodium cacodylate buffer, specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide and in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h at RT.

The samples were then dehydrated through a gradient of acetone solutions, and thereafter, they were embedded in Epon 812 resin. Afterwards, semi-thin sections (3 µm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at 400× magnification. Ultra-thin sections (60–70 nm) were obtained from preantral follicles, which were classified as morphologically normal in semi-thin sections according to the criteria adopted in histology. Subsequently, ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and they were examined under a EM 109 Zeiss (EM, Berlin, Germany) transmission electron microscope (TEM). The density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles as well as vacuolization and membrane integrity were evaluated.

Statistical analysis

The variables were submitted to Normality (Lilliefors) and Homoscedasticity (Cochran) tests and posteriorly to the analysis of variance at a probability of 5%. In case a significance was presented, the Tukey test was carried out (PROC ANOVA; SAS, 2002).

Results

Effect of IGF-I on preantral follicle survival

The histological analysis showed that in the culture of ovarian cortex fragments normal (Fig. 1 A, B, C) and degenerated (Fig. 1 D, E, F) follicles were found. In the degenerated follicles oocytes with cytoplasmic retraction, pyknotic nucleus and disorganized granulosa cells were observed. A total of 1,680 preantral follicles were counted to evaluate the follicular morphology, activation and growth.

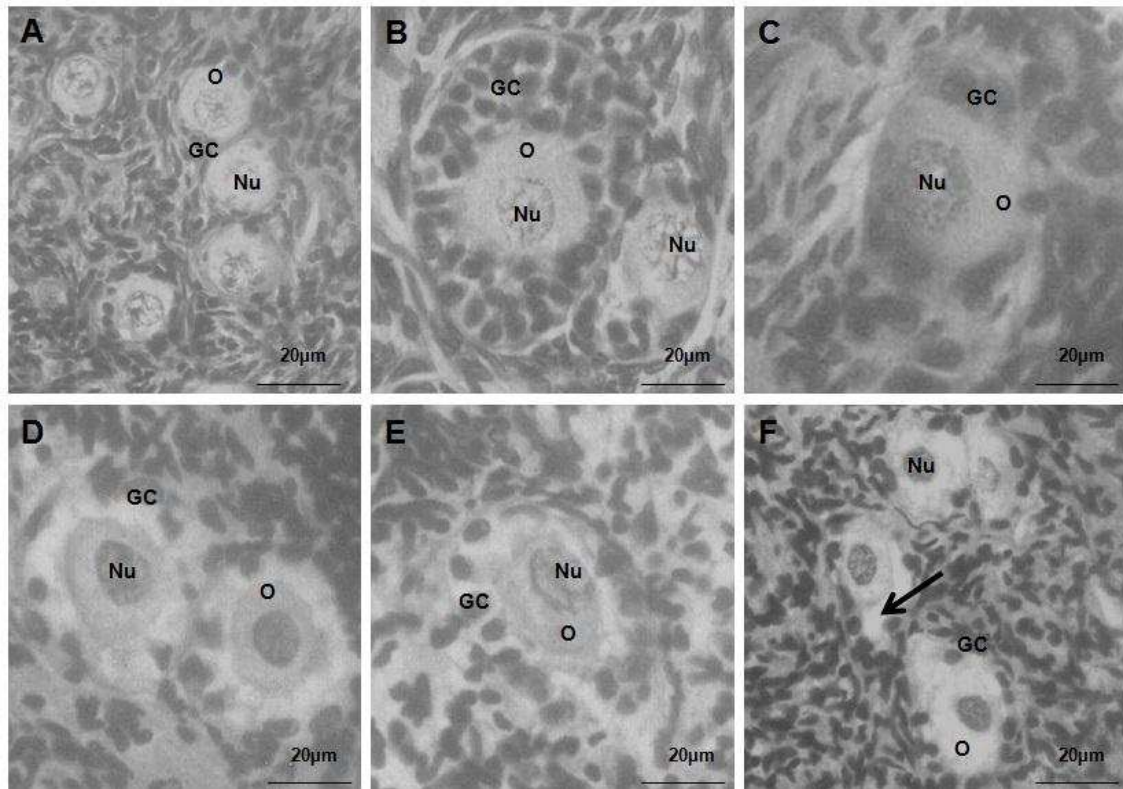


Figure 1. Histological sections of ovarian fragments after Periodic Acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal follicles (A, control fresh; B and C of 100 ng/mL IGF-I after 1 and 7 days of culture respectively) and degenerated (D, α -MEM⁺ with 1 day of culture; E and F of 50 ng/mL IGF-I after 1 and 7 days of culture respectively). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell (Original magnification 400 $\times$). Arrow-oocyte retracted of granulosa cells.

Table 1 shows the percentages of normal follicles in the non-cultured control (day zero) and after one and seven days of culture in ovarian cortex fragments in different media. After one day of culture, the addition of 100 ng/mL of IGF-I maintained the percentage of morphologically normal follicles, when compared to the non-cultured control (86.7% and 96.7 %, respectively, $P > 0.05$). However, a significant reduction in the rate of normal follicles occurred, after the culture in a medium without IGF-I or with 50 ng/mL ($P < 0.05$). However, after seven days of culture, none of the media maintained the percentage of normal follicles, when compared to the control.

The addition of IGF-I at both concentrations (50 and 100 ng/mL) enabled a greater percentage ($P < 0.05$) of normal follicles, after one day of culture, when compared to the cultured control (α -MEM). However, after seven days, the media used

behaved similarly ($P>0.05$). With the progress of the culture from one to seven days, there was a decrease in the percentage of normal follicles ($P<0.05$) using a medium with 100 ng/mL of IGF-I.

Table 1. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of IGF-I (concentrations in ng/mL).

Control	96,7 ± 0,6	
Normal		
Treatments	Day 1	Day 7
α-MEM ⁺	67,9 ± 3,1 ^{*bA}	64,2 ± 6,4 ^{*aA}
IGF-I 50	79,6 ± 3,8 ^{*aA}	75,4 ± 3,2 ^{*aA}
IGF-I 100	86,7 ± 2,0 ^{aA}	66,7 ± 3,1 ^{*aB}

*Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ^{a,b}differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B}differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).

Follicular activation and growth after in vitro culture

In fresh tissues (non-cultured control), the percentages of primordial and developing follicles were 43.3 and 53.3%, respectively. After seven days of culture, there was a reduction in the percentage of primordial follicles in all treatments (Fig. 2A, $P<0.05$) when compared to the fresh control. However, there was not an increase ($P>0.05$) in the percentage of developing follicles (Fig. 2B). After one day of culture, there was a reduction ($P<0.05$) in the percentage of developing follicles when cultured in a medium without IGF-I (α -MEM⁺).

On day one of cultivation, it was verified that the IGF-I at the concentration of 100 ng/mL presented a higher percentage ($P<0.05$) of developing follicles, when compared to the α -MEM⁺, demonstrating that there was follicular activation already from the first day of culture, with the use of IGF-I at this concentration.

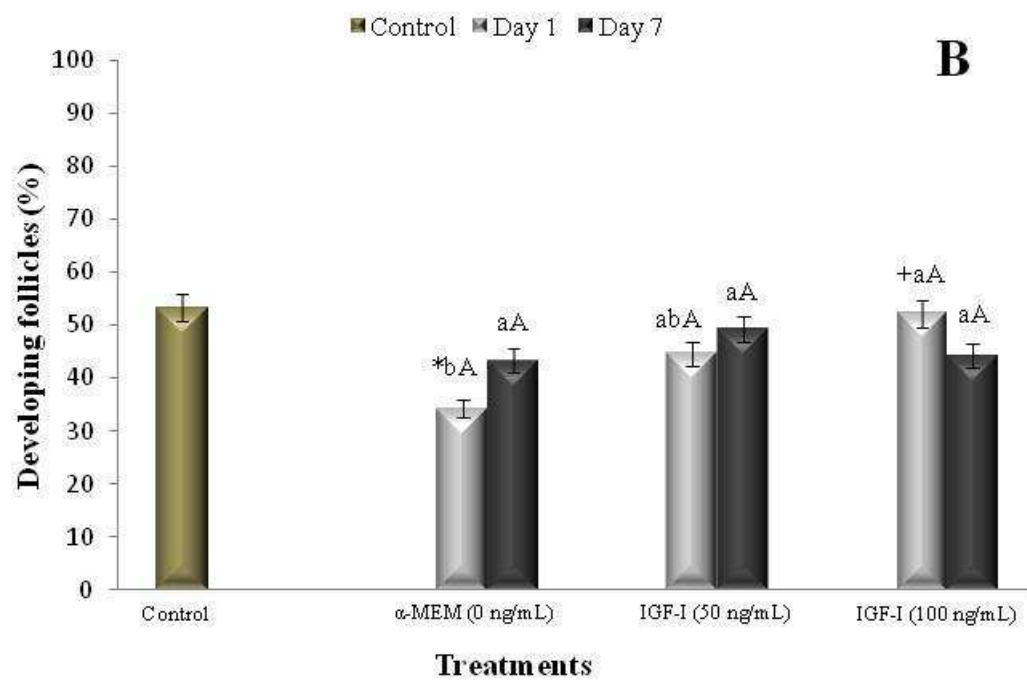
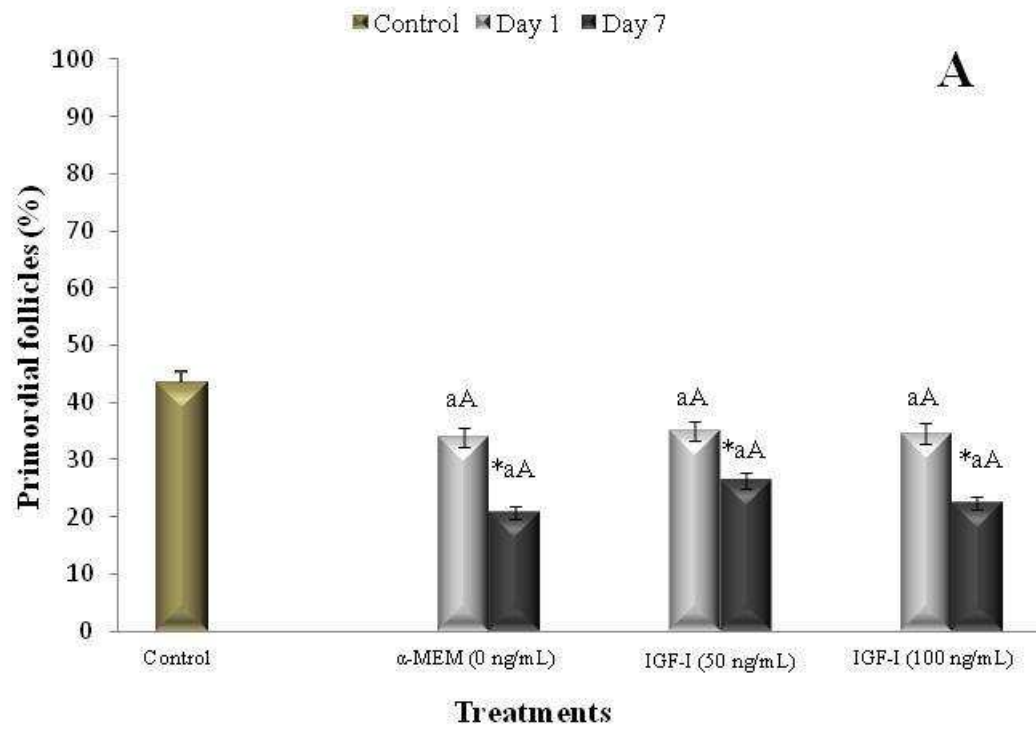


Figure 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of IGF-I (concentrations in ng/mL). *Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ⁺ compared with α -MEM⁺ ($P<0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).

The follicular and oocyte cell diameter were measured and are presented in Table 2. When compared to the fresh cortical fragments (non-cultured control), both the follicular and the oocyte cell diameters were reduced ($P<0.05$) after the culture for one and seven days, except when the follicles were cultured for one day in the presence of 100 ng/mL IGF-I. When the α -MEM⁺ (cultured control) was compared to the other treatments (50 and 100 ng/ml of IGF-I), the concentration of 50 ng/ml IGF-I reduced ($P<0.05$) the follicular and oocyte cell diameters, after the culture for one or seven days.

However, after one day of culture, the concentration of 100 ng/mL presented higher diameters ($P<0.05$) when compared to the α -MEM⁺. When the treatments were compared to each other, the concentration of 50 ng/ml of IGF-I presented lower diameters ($P<0.05$) after one and seven days of culture, when compared to the other treatments. With the progression of the culture from one to seven days, there was a reduction ($P<0.05$) in both diameters, in the follicles cultured in a medium with 100 ng/ml of IGF-I.

Table 2. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of IGF-I (concentrations in ng/mL).

	Oocyte diameter (μm)		Follicle diameter (μm)	
Control	27,4 $\pm$ 0,6		37,7 $\pm$ 1,1	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
α -MEM ⁺	22,5 $\pm$ 0,9 ^{*bA}	22,8 $\pm$ 0,7 ^{*aA}	31,2 $\pm$ 1,5 ^{*bA}	29,8 $\pm$ 0,9 ^{*aA}
IGF-I 50	19,8 $\pm$ 0,5 ^{*cA}	19,0 $\pm$ 0,5 ^{*bA}	25,7 $\pm$ 0,9 ^{*cA}	24,6 $\pm$ 0,7 ^{*bA}
IGF-I 100	27,4 $\pm$ 0,8 ^{aA}	23,5 $\pm$ 0,5 ^{*aB}	37,2 $\pm$ 1,4 ^{aA}	30,0 $\pm$ 0,7 ^{*aB}

*Differs significantly from control follicles ($P < 0.05$); ^{a,b}differs significantly among concentrations in each day of culture ($P < 0.05$); ^{A,B}differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P < 0.05$).

Ultrastructural features of cultured follicles

The ultrastructural analysis was performed in follicles of the control group (non-cultured) and of the group that presented the best results after the *in vitro* culture (medium with 100 ng/ml of IGF-I). The figure (3a) illustrates the morphologically normal follicle of the non-cultured control, with the nuclear envelope and cytoplasmic membrane intact, as well as a small number of vacuoles and various organelles with no signs of degeneration, including mitochondria and endoplasmic reticulum.

The figures (3b and 3c) present follicles cultured for one and seven days in a medium containing 100 ng/ml of IGF-I. IGF-I affected the ultrastructure of the cultured follicles, since evident signs of degeneration were observed. In these follicles, it was observed a large number of vacuoles and a low density of organelles in the cytoplasm. Although the follicles cultured for one day in a medium supplemented with IGF-I were morphologically normal in the histological analysis (optical microscopy), evident ultrastructural signs of degeneration were verified, including irregular retraction of the nuclear envelope and cytoplasmic membrane.

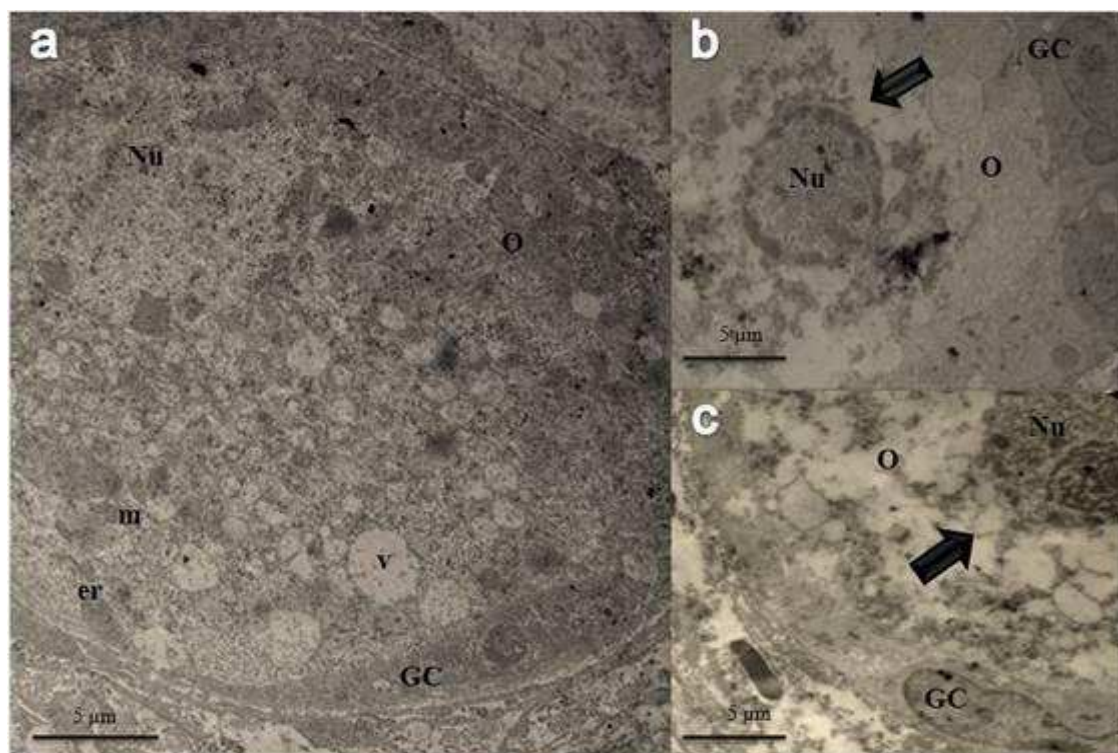


Figure 3. Ultrastructural analysis of normal preantral follicles from fresh control (4400X) (a) and cultured for 1 (3000X) (b) and 7 days (3000X) (c) in medium containing like growth factor insulin-I (100 ng/mL). Homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded is characteristic of non-cultured follicles (3 a). Extreme vacuolization and great holes are present in the cytoplasm, indicative of degeneration (3 b and 3 c; solid arrow). (Nu) Oocyte nucleus; (GC) Granulosa cells; (m) Mitochondria; (er) Endoplasmic reticulum; (v) Vacuoles.

Discussion

The present study evidenced that IGF-I promotes the survival and development of ovarian follicles of goats during the *in vitro* culture. Thus, the addition of IGF-I to the culture medium promoted a positive effect on the follicular survival rate in fragments of ovarian tissues cultured for one day. However, none of the concentrations tested in the present study was able to maintain the follicular survival during seven days of culture.

In contrast, other authors reported that the concentration of 100 ng/ml of IGF-I is able to promote the maintenance of the follicular viability in goats, during nine days of culture (Zhou & Zhang, 2005). Similar results were observed by Martins et al., (2010) who reported that IGF-I, at the concentration of 50 ng/ml, is capable of promoting the

follicular viability in the caprine species. Previous studies showed that IGF-I is able to suppress the DNA fragmentation by apoptosis in the follicles of rats cultured *in vitro*, then acting as an antiapoptotic factor (Chun et al., 1994), beyond mitogenic (Hill, 1989). In the present experiment, the media containing IGF-I allowed a greater percentage ($P < 0.05$) of normal follicles, after one day of culture, when compared to the cultured control (α -MEM). Similar results were observed by Martins et al. (2010) in which the concentrations of 50, 100 and 200 ng/mL present higher percentages of morphologically normal follicles, when compared to the α -MEM⁺, after one day of culture. However, the addition of IGF-I in the media was not able to maintain the follicular survival rate after seven days of culture, reducing the percentage of normal follicles, effects also noticed in recent studies (Martins et al., 2010).

Regarding the follicular activation (that is, the transition from primordial to developing follicles), it was verified that the addition of 100 ng/ml of IGF-I promoted higher percentages of developing follicles after one day of culture, when compared to the α -MEM⁺ (cultured control). Although treatments did not differ in relation to the percentage of developing follicles at the end of the culture, the use of 100 ng/ml of IGF-I promoted an early activation, already on the first day of cultivation. Recent studies showed similar results during *in vitro* culture of ovarian tissue of goat, after one and seven days, using 100 ng/ml of IGF-I in the medium (Martins et al., 2010). It was verified a reduction in the percentage of primordial follicles after seven days of culture, regardless of the addition or not of IGF-I. Similar results were obtained in previous studies with ovaries of cattle (Wandji et al., 1996; Braw-Tal & Youssefi, 1997), baboons (Fortune et al., 1998) and goats (Martins et al., 2005; 2008; Silva et al., 2006; Matos et al., 2007b), in which the number of primordial follicles was dramatically reduced with the concomitant increase in the number of developing follicles, after the *in vitro* culture of ovarian tissue. However, the results of the present experiment differed from other researchers, since there was no increase in the number of developing follicles, after the culture for seven days.

Yang & Fortune (2002) suggested that high doses of insulin present in the ITS (3.12 and 6.25 μ g/mL), a component added to the culture medium, promotes greater activation of primordial follicles of cattle and increases their survival rate. Although the addition of 100 ng/ml of IGF-I has promoted greater follicular activation, then decreasing the percentage of primordial follicles on day seven of culture, the culture conditions were not efficient to allow further growth of these activated follicles. This

may be due to the absence of pyruvate in the culture medium. This is an organic compound responsible for the production of energy in the form of ATP at the mitochondria level. The more the cell needs energy to perform its vital functions, it will produce more mitochondria. The addition of pyruvate (0.23 mM) to the culture medium has been frequently performed in several researches, with positive results (Araújo et al., 2010; Martins et al., 2010). Studies have demonstrated that the activation of primordial follicles can occur "spontaneously", that is, without the addition of growth factors or hormones (Eppig & O'Brien, 1996). Therefore, the *in vitro* conditions used nowadays have facilitated the development of follicles from the culture of ovarian tissues, possibly through the release of stimulating factors or preventing the production of inhibitory factors of the oocyte or stroma, granulosa or pre-theca cells, inside the ovarian cortical tissue (Osman et al., 2007). Fortune (2003) confirms in his studies the negative and positive effects of IGF-I, demonstrating that this growth factor has negative effects on bovine primordial follicles and positive effects on secondary follicles in the same species, during follicular activation. Demeestere et al. (2004) observed that the concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL of IGF-I did not stimulate the transition from primordial to primary follicles during the *in vitro* culture of bovine ovarian cortex. Similar results were observed in the present study, when only the primordial follicles were activated, which did not occur in developing follicles.

The culture media tested were not sufficient to promote follicular and oocyte cell growth. However, the culture for one day in a medium with 100 ng/mL of IGF-I maintained the diameter of oocytes and follicles equivalent to the non-cultured control and superior to α -MEM⁺ (cultured control). However, there was a reduction in both diameters, after seven days of culture, regardless of the medium used. These results differ from the results observed by Martins et al. (2010), in which the concentrations of 50 and 100 ng/mL of IGF-I increased the follicular and oocyte cell diameter after seven days of culture, when compared to the non-cultured control. Also Thomas et al. (2007) verified that the addition of 50 ng/ml of IGF-I during the culture for six days promoted an increase in the follicular diameter in ovarian tissue of cattle. Likewise, Itoh et al. (2002) reported that the addition of 20 ng/mL of IGF-I to the culture medium increased the follicular and oocyte cell diameter of preantral follicles in cattle. In ovarian tissue of goats, Lorenzo & Carneiro (2003) found a positive influence of IGF-I on the maturation of oocytes using concentrations above 100 ng/mL of the medium. In a study using ovaries of prepubescent goats, the concentration of 100 ng/mL of IGF-I promoted the

growth of oocytes enclosed in preantral follicles, after the culture for nine days (Zhou & Zhang, 2005). However, it has already been proved that the use of IGF-I in the culture does not influence the growth of primary and secondary preantral follicles in the cortical tissues of cattle (Derrar et al., 2000) and rats (Liu et al., 1998).

In the present study, the reduction of the follicular and oocyte cell diameter observed during the culture for seven days might have occurred due to a decrease in the mitosis rate in granulosa cells associated with a reduction in the oocyte size. Another explanation is that two groups of binding proteins for IGF-1 and 2 growth factors are known, the IGFBP (IGFBP-1, -2, -4, -5, -6 and the IGFBP-3), which is the form that predominates in serum (Monget et al., 2002; Silva et al., 2008). The mRNA expression of the different proteins has differentiated functions in the follicles of some species, such as IGFBP-2, which decreases during follicular growth in ovaries of sheep, cattle and pigs. On the other hand, the expression of IGFBP-5 mRNA increases in granulosa cells of atretic follicles of cattle and sheep (Zhou et al., 1996). In goats, the protein and the mRNA for IGF-I are expressed in all follicular categories, but the granulosa and theca cells of antral follicles are the main responsible for the production of IGF-I in this follicular category (Silva et al., 2007). The mRNA encoding the IGF-I receptor was detected in oocytes and GCs of antral follicles of cattle. However, this mRNA was not detected in preantral follicles (Armstrong et al., 2002). These results support the hypothesis that IGF-I regulates the growth of follicles through endocrine mechanisms (Armstrong et al., 2002). In this research, the evaluated follicles were preantral (primordial, intermediate, primary and secondary), which is why the addition of IGF-I in the culture medium has not promoted the increase of follicular and oocyte cell diameter, by the seven days of culture.

The contradictory results of this study with previous studies can be explained by the differentiated sensitivity of each follicle to the treatment used, the species studied, the size of the follicle at the moment of culture, culture time, as the composition of the media used. Arunakumari et al. (2010) in one of his researches reports that the differences observed in the IGF-I synthesis pattern during the *in vitro* culture can influence in the growth of preantral follicles of mice and domestic species. This can be attributed to different action mechanisms and size of preantral follicles (Schams et al., 1999).

Although follicles cultured with 100 ng/mL of IGF-I have presented similarities with the non-cultured control (rate of non-degenerated follicles) in the examination by

light microscopy, evident signs of atresia in transmission electron microscopy were observed. Several studies have emphasized the importance of ultrastructural analysis after the *in vitro* culture of preantral follicles (cow: Van Den Hurk et al., 1998; mouse: Salehnia et al., 2002; goat: Matos et al., 2007a, Araújo et al., 2010). In the present study, the cultured follicles were characterized by a large number of vacuoles, absence of organelles in the cytoplasm, as well as the nuclear envelope and the cytoplasmic membrane presenting irregularities or fragmentation.

Similar results were observed after the culture of caprine preantral follicles in a medium containing indole-3-acetic acid (Matos et al., 2006). Fortune et al. (2004) reported that the addition of IGF-I to the culture medium increased the atresia of preantral follicles in cattle after the *in vitro* culture. According to Silva et al. (2006), the apoptosis in primordial follicles cultured *in vitro* can be induced by the oxygen reduction and the diffusion of nutrients to preantral follicles in the ovarian cortex.

Conclusions

The results found in this work permit to conclude that the addition of 100 ng/mL of IGF-I in the culture medium activates the development of preantral follicles of goats with one day of culture. However, it is not sufficient to maintain the follicular survival rate after seven days of culture.

Acknowledgments

To CNPq for the financial support to the research. To CAPES for providing the scholarship to the Doctorate student. To the core of Microscopy and Microanalysis of UFV for the support in the ultrastructural analysis.

References

- Adashi, E. Y. et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev*, v. 6, p. 400–420, 1985.
- Adashi, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 39, p.13-19, 1998.

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. *Pesq. Vet. Bras*, v. 30, p. 305-310, 2010.

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

Armstrong, D. G. et al. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 165, p. 101–113, 2000.

Armstrong, D. G. et al. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction* 123, 789–797, 2002.

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

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

Chaves, R. N.; F. S. Martins, M. V. Saraiva, J. J. Celestino, C. A. Lopes, J. C. Correia, I. B. Verde, M. H. Matos, S. N. Bão, K. P. Name, C.C. Campello, J. R. V. Silva, J. R. Figueiredo. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, v. 20, p. 640-647, 2008.

Chun, S. Y.; Billi, H.; Furuta, I.; Tsafiriri, A & Hsueh, A. J. Gonadotropin supression of apoptose in cultured preovulatory follilces: mediatory roles of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, v. 135, p. 1845-1853, 1994.

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. *Biol Reprod*, v. 70, p. 1664–1669, 2004.

Derrar, N.; Price, C. A.; Sirard, M. A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. *Theriogenology*, v. 54, p. 587–598, 2000.

Eppig, J. J.; O'Brien, M. J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 197-207, 1996.

Fortune, J. E.; Kito, S.; Wandji, A. S & Srsen, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology*, v. 49, p. 441–449, 1998.

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

Fortune, J. E.; Rivera, G. M.; & Yang, M. Y. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci*, v. 82, p. 109-126, 2004.

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

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

Hill, D. J. Growth factors and their cellular actions. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 85, p.723-734, 1989.

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 of Reproduction*, v. 67, p. 1099–1105, 2002.

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

Lorenzo, P. L.; Carneiro, G. F. Biotecnologia e as perspectivas de futuro para caprino-ovinocultura. In: II simpósio internacional sobre caprinos e ovinos de corte, João Pessoa. *Anais do 2º Sincorte*. Santos, E. S. & Souza, W. H. p. 353-360, 2003.

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

Martins, F. S.; Van den Hurk, R.; Santos, R. R.; Silva, J. R. V.; Matos, M. H. T.; Celestino, J. J. H.; Rodrigues, A. P. R.; Pessoa, C.; Ferreira, F. V. A & Figueiredo, J. R. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in minimal essential médium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 106–113, 2005.

Martins, F. S.; Celestino, J. J. H.; Saraiva, M. V. A.; Matos, M. H. T.; Bruno, J. B.; Rocha-Junior, C. M. C.; Lima-Verde, I. B.; Lucci, C. M.; Bão, S. N & Figueiredo, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. *Reproduction Fertility and Development*, v. 20, p. 916–924, 2008.

Martins, F. S.; Saraiva, M. V. A.; Celestino, J. J. H.; Bruno, J. B.; Almeida, A. P.; Cunha, R. M. S.; Silva, J. R. V.; Campello, C.C.; Lucci, C. M.; Matos, M. H. T.; Figueiredo, J. R.. Expression of protein and mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on *in vitro* development and survival of caprine preantral follicles, *Anim. Reprod*, v. 7, p. 349-361, 2010.

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.; Bão, 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. *Anim. Reprod*, v. 3, p. 415-422, 2006.

Matos, M. H. T.; Lima-Verde, I. B.; Bruno, J. B.; Lopes, C. A. P.; Martins, F. S.; Santos, K. D. B.; Rocha, R. M. P.; Silva, J. R. V.; Bão, S. N.; Figueiredo, J. R. Follicle Stimulating Hormone and Fibroblast Growth Factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 677-684, 2007(a).

Matos, M. H. T.; Lima-Verde, I. B.; Luque, M. C. A.; Maia, J. E. Jr.; 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(b).

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.

Monget, P & Bondy, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Molecular Cellular Endocrinology*, v. 163, p. 89–93, 2000.

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

Osman, V. P.; Anilkumar, B.; James, J. I.; Paul, M. C.; Patrick, L.; and George, W. S.; Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, v. 133, p. 95–106, 2007.

Pawshé, C. H. et al. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation,

and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev*, v. 49, p. 277–285, 1998.

Perks, C. M. et al. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 136, p. 5266-5273, 1995.

Salehnia, M.; Moghadam, E. A.; Velojerdi, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil. Steril*, v. 78, p. 644-45, 2002.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schams, D.; Berisha, B.; Kosmann, M.; Einspanier, R.; Amselgruber, W. M. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domest Anim Endocrinol*, v.17, p. 279–85, 1999.

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

Silva, J. R. V.; Tharasanit, T.; Taverne, M. A. M.; Van der Weijden, G. C.; Santos, R. R.; Figueiredo, J. R. & Van den Hurk, R.; The activin–follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *Journal of Endocrinology*, v. 189, p. 113–125, 2006.

Silva, J. R. V.; Brito, I. R.; Leitão, C. C. F.; Silva, A. W. B.; Passos, M. J.; Fernandes, L. A.; Vasconcelos, G. L.; Figueiredo, J. R. Expressão da proteína morfogenética óssea-6 (BMP-6) em folículos ovarianos caprinos. In: Resumos da XXI Reunião Anual da SBTE (Costa do Sauípe, BA), p.1044, 2007.

Silva, J. R. V.; Brito, I. R.; Leitão, C. C. F.; Silva, A. W. B.; Passos, M. J.; Vasconcelos, G. L.; Saraiva, M. V. A.; Almeida, A. P.; Figueiredo, J. R. Quantificação da proteína e do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante à insulina- 1 (IGF-1) em

folículos ovarianos caprinos. In: Resumos da XXII Reunião Anual da SBTE (Guarujá, SP), p.466, 2008.

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.; Spek, E. R.; Hage, W. J.; Fair, T.; Ralph, J. H.; Schotanus, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reprod*, v. 4, p. 833-841, 1998.

Wandji, S. A.; Eppig, J. J.; and 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.

Woad, K. J.; Baxter, G.; Hogg, C. O.; Bramley, T. A.; Webb, R & Armstrong, D. G. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, p. 293–302, 2000.

Yang, M. Y & Fortune, J. E. Insulin and insulin-like growth factor I exert opposite effects on the activation of bovine primordial follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 111, 2002.

Zhao, J.; Tavene, M. A. M.; Van, D.; Weijden, G. C.; Bevers, M. M & Van, D. H. R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, p. 287–296, 2001.

Zhou, J.; Adesanya, O. O.; Vatzias, G.; Hammond, J. M.; Bondy, C. A. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology*, v.137, p.4893-4901, 1996.

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

11. CAPÍTULO V (Fase I)

Hormônio Tiroxina (T_4) promove a sobrevivência, ativação e o crescimento durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos por sete dias

(Thyroxine Hormone (T_4) promotes the survival, activation and growth during the in vitro culture of caprine preantral follicles for seven days)

Hormônio Tiroxina (T₄) promove a sobrevivência, ativação e o crescimento durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos por sete dias

*Thyroxine Hormone (T₄) promotes the survival, activation and growth during the *in vitro* culture of caprine preantral follicles for seven days*

Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da Tiroxina (T₄) na sobrevivência, a ativação e crescimento de folículos pré-antrais de caprinos, após o cultivo *in vitro*. Fragmentos do córtex ovariano foram cultivados em α -MEM⁺ (controle cultivado) e α -MEM⁺ suplementado com 10, 20 ou 50 ng/mL de T₄ por um ou sete dias. Pequenos fragmentos de tecido ovariano não cultivado ou cultivados foram processados para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que após um dia de cultivo, apenas o meio contendo 10 ng/mL de T₄ manteve a taxa de sobrevivência folicular. Entretanto, com sete dias de cultivo todos os meios testados foram semelhantes ao controle não cultivado. O percentual de folículos em desenvolvimento foi maior nos meios α -MEM⁺ e no meio contendo 20 ng/mL de T₄ após sete dias de cultivo. Adicionalmente, o cultivo por um e sete dias em meio contendo 20 ng/mL de T₄ não alterou o diâmetro folicular (P>0,05). As análises ultraestruturais confirmaram a integridade dos folículos cultivados por sete dias em meio com 20 ng/mL de T₄. Pode-se concluir que, a adição de 20 ng/mL de T₄ no meio de cultivo é eficaz na manutenção da sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais, durante sete dias de cultivo.

Palavras-chave: Ativação, Caprino, folículos ovarianos, T₄, sobrevivência.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of thyroxine (T₄) on survival, activation and growth of preantral follicles of goats, after the *in vitro* culture. Fragments of the ovarian cortex were cultured in α -MEM⁺ (cultured control) and α -MEM⁺ supplemented with 10, 20 or 50 ng/ml of T₄ for one or seven days. Small fragments of non-cultured or cultured ovarian tissue were processed for classic histology and

transmission electron microscopy. The results showed that after one day of culture, only the medium containing 10 ng/ml of T₄ maintained the follicular survival rate. However, with seven days of culture all the media tested were similar to the non-cultured control. The percentage of the developing follicles was greater in the α -MEM⁺ media and in the medium containing 20 ng/ml of T₄ after seven days of culture. Additionally, the culture for one and seven days in a medium containing 20 ng/ml of T₄ did not change the follicular diameter ($P > 0.05$). The ultrastructural analysis confirmed the integrity of follicles cultured for seven days in a medium with 20 ng/ml of T₄. It can be concluded that the addition of 20 ng/ml of T₄ in the culture medium is effective in maintaining the survival, activation and growth of preantral follicles, during seven days of culture.

Keywords: Activation, Goat, ovarian follicles, T₄, survival.

Introduction

Ovarian folliculogenesis is a process of fundamental importance, having as the main mechanism to influence on the proliferation and differentiation of the cells present in developing follicles (Hirshfield, 1991). Primordial follicles are stimulated to grow, developing for the stages of primary and secondary follicles, before the development of the antrum (McGee & Hsueh, 2000; Fair, 2003).

During this growth, follicular morphology changes, the growing oocyte and the surrounding cells multiply and differentiate (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). To control these changes, different hormones and growth factors are involved in this action, acting synchronously, in order to regulate all the procedures that occur during follicular development. However, despite of the importance that this regulation has on female fertility, the substances involved in the aspects related to the folliculogenesis in the preantral stage, are poorly elucidated (Hutt et al., 2006).

The Thyroid Hormones (TH), Thyroxine (T₄) and Triiodothyronine (T₃) have the function of increasing the metabolic activities of most body tissues except the brain, retina, testis, spleen and lungs (Guyton, 2001). Cecconi et al. (2004) concluded that T₃ added to the culture medium of preantral follicles of mice had an adverse effect on the growth and maturation of the oocyte. The effects of these hormones on ovarian steroidogenesis and folliculogenesis are related to the differentiation of granulosa cells (Silva et al., 2004) and ovulation stimulation (Serakides et al., 2001). Furthermore, it

was proved that the addition of T_4 in the culture medium, along with FSH and IGF-I, increases the rates of follicular growth, antrum formation and meiotic competence after the *in vitro* culture of ovine preantral follicles (Arunakumari et al., 2007; Arunakumari et al., 2010).

In vitro studies suggest that the TH are expressed in cells of the *cumulus*, cells from small follicles and oocytes (Jiang et al., 2000; Arunakumari et al., 2007), indicating the participation of T_3 and T_4 in the follicular activation, comprising the passage of primordial follicles into the *pool* of developing follicles (Pepe et al., 2006). Among these hormones, T_3 has higher binding capacity by granulosa cells in the early follicular maturation (Maruo et al., 1992). Furthermore, Slobodzinski (2005) reported that, during the follicular development, a significant increase in the concentrations of T_3 in the follicular fluid occurs. Many researches were performed using T_3 as a reference in order to clarify the mechanism of folliculogenesis in the initial phase. However, little is known about the effect of T_4 in an *in vitro* culture medium of caprine preantral follicles. Thus, the objective of this study was to investigate whether T_4 at different concentrations (10, 20, 50 ng/ml) promotes the survival and growth of preantral follicles after the *in vitro* culture of goat ovarian tissue.

Materials and Methods

Chemicals

Unless mentioned otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Source of ovaries

Ovarian cortical tissues (n=10 ovaries) were collected at a local slaughterhouse from five adult (1 to 3 years old), cross-breed goats (*Capra hircus*). Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds followed by two washes in minimum essential medium (MEM) supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The ovary pairs were transported within 1 hour to the laboratory in MEM at 4°C (Chaves et al., 2008).

Experimental protocol

The organ culture system utilized herein was previously described in detail (Matos et al. 2007; Celestino et al., 2010). In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments. Subsequently, ovarian cortex tissue samples from each ovarian pair were cut into 9 slices (approximate size: 3 x 3 mm, with 1 mm thickness) using a scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either fixed for histological and ultrastructural analysis (fresh control) or placed in culture for 1 (d1) and 7 (d7) days. Caprine tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 1 mL of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator and all the media were incubated for 1 hour prior to use. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2 to 7.4) supplemented with ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), which was called α -MEM⁺ (culture control).

For the experimental conditions, the medium was supplemented with different concentrations (10, 20, 50 ng/mL d1, 10, 20, 50 ng/mL d7) of T₄ (Fig. 1). Each treatment was repeated five times and every 2 days, the culture medium was replaced by fresh medium.

α -MEM ⁺ supplementation		Treatment identification
Day 1 ↓	Day 7 ↓	
none	none	α -MEM ⁺
T ₄ (10ng/mL)	T ₄ (10ng/mL)	α -MEM ⁺ /T ₄
T ₄ (20ng/mL)	T ₄ (20ng/mL)	α -MEM ⁺ /T ₄
T ₄ (50ng/mL)	T ₄ (50ng/mL)	α -MEM ⁺ /T ₄

Fig. 1. Tested treatments according to supplementation of the medium for the *in vitro* culture of caprine ovarian tissues.

Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

Before culture (fresh control) and after 1 and 7 days in culture, all tissue pieces were fixed in Carnoy's solution for four hours and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), the caprine ovarian cortex tissues were cut into 7 µm sections, which were mounted on glass slides and stained by Periodic Acid Schiff (PAS) - hematoxylin. Follicle stage and morphology were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined by a microscope (Olympus, Japan) under 400x magnification.

The developmental stages of follicles have been defined previously (Silva et al., 2004) as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened and cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells; and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). Only the preantral follicles (primordial, intermediate, primary and secondary) were considered in the analysis, and the antral stage was not included because of the very small number of antral follicles present in the ovarian fragments. The preantral follicles were also classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and lacked a pyknotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x five repetitions = 150 follicles).

To evaluate follicular activation, the percentages of healthy primordial and growing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in each medium. In addition, follicle and oocyte diameters were measured in healthy follicles only. Follicle diameter was recorded from edge to edge of the outer layer of granulosa cells or from the outside edge of the theca cell layer when present. Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded in each measurement and the average of these two values was calculated. Each follicle was examined in every section in which it appeared and matched with the same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once.

Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles

To better evaluate follicular morphology, ultrastructural analysis was performed on preantral follicles from non-cultured tissue (fresh control), follicles cultured in the treatments that had the best results for morphology, activation and growth. Briefly, small pieces (1 mm³) of caprine ovarian tissues were fixed for 4 hours at room temperature in karnovsky fixative (2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2). After fixation, the samples were washed twice in 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 resin. Afterwards, semi-thin sections (3 µm) were cut using an ultramicrotome (MT2-B, Sorvall, USA), stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy under 400x magnification. Ultra-thin sections (60 to 70 nm) were obtained from preantral follicles classified as morphologically normal in semi-thin sections, according to the criteria adopted for histological analysis. Subsequently, ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a transmission electron microscope EM 109 Zeiss (EM, Berlin, Germany) operating at 80 Kv (Donato et al., 2009). Parameters such as the density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, vacuolization and integrity of the basement membrane were evaluated.

Statistical analysis

The variables were submitted to tests of Normality (Lilliefors) and Homoscedasticity (Cochran) and later to analysis of variance at a 5% probability. In case a significance was presented, the Tukey test was carried out (PROC ANOVA; SAS, 2002).

Results

Caprine preantral follicle survival before and after in vitro culture

A total of 1,350 preantral follicles were analyzed by classic histology. The Figures (2a, b, c) show normal follicles from fresh control and after culture in α -MEM⁺ supplemented with 10 and 20 ng/mL of T₄ on day one and seven, respectively, while the Figures (2 d, e) illustrate degenerated follicles after culture in α -MEM⁺ (cultured control) or in the treatment with 50 ng/mL of T₄, after seven days of culture, respectively. In degenerated follicles, retracted oocytes and disorganization of granulosa cells were observed.

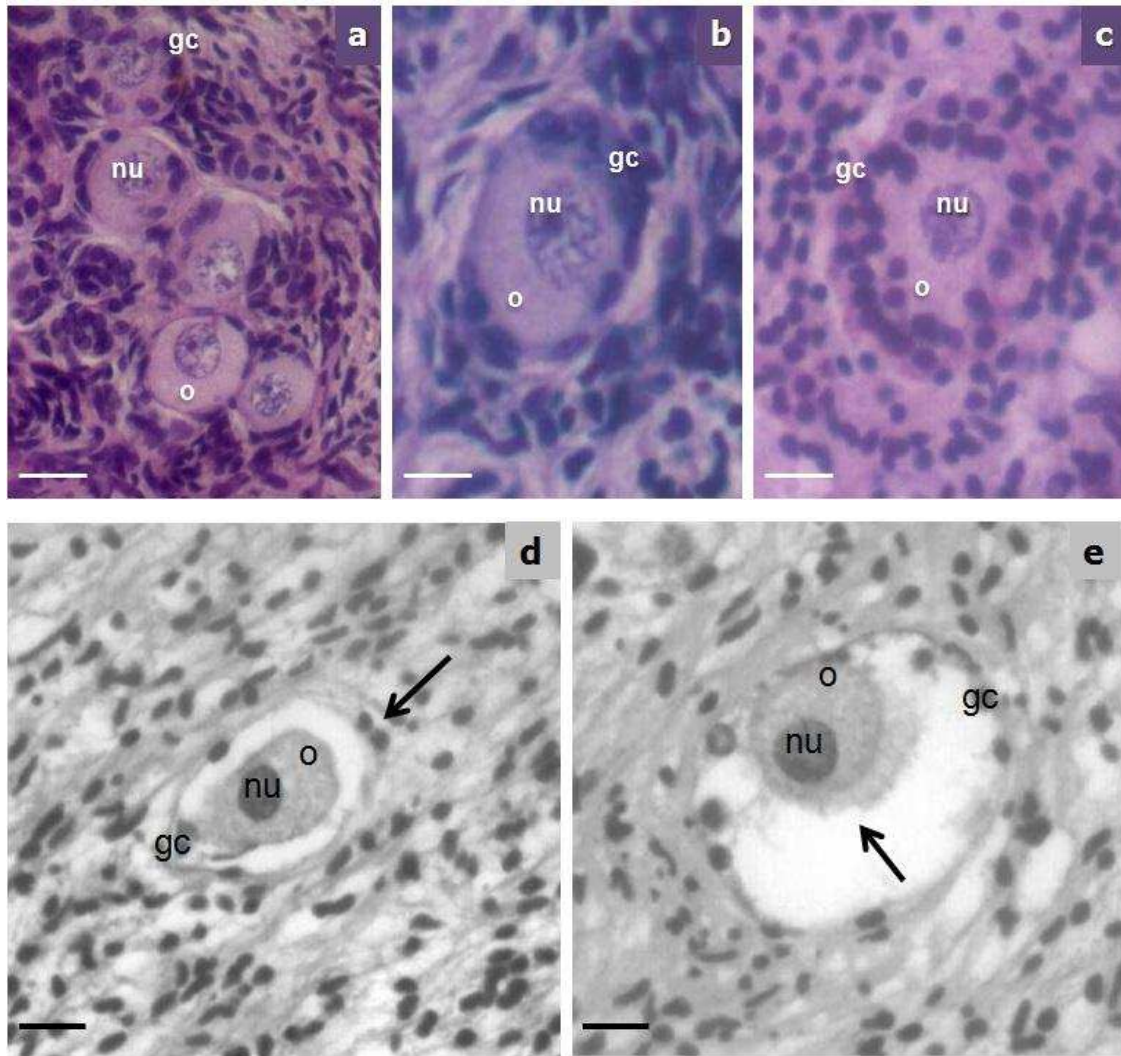


Fig. 2. Representative image of normal preantral follicles from the fresh control (a) and after 1 or 7-day culture in the presence of 10 and 20 ng/mL of T₄ (b, c) and of degenerated follicles cultured for 7 days in α -MEM+ alone (d) or in 50 ng/mL of T₄ (e). Degenerated preantral follicles often displayed oocyte retraction (e, arrow) and disorganization of granulosa cell layers (d, arrow). Scale bars represent 20 μ m (a,b,c,d,e). o: oocyte; nu: oocyte nucleus; gc: granulosa cells (x400), PAS Hematoxylin.

The percentage of morphologically normal preantral follicles in the fresh control and after the *in vitro* culture is shown in Table 1. After one day of culture, it was verified a reduction ($P<0.05$) on the percentage of morphologically normal follicles in the ovarian tissue cultured in the media with or without T_4 , compared to the fresh control (96.7%), except in tissues cultured in medium containing 10 ng/mL of T_4 (94.7%, $P>0.05$). However, the percentage of normal follicles was similar ($P>0.05$) to the fresh control, after seven days of culture ($P>0.05$). When the treatments were compared, it was verified a lower rate of normal follicles when cultured for one day in medium with 50 ng/mL of T_4 ($P<0.05$), which did not happen on day seven of culture ($P>0.05$). With the progression of culture from one to seven days, all media tested maintained ($P<0.05$) the percentage of normal follicles.

Table 1. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of T_4 (concentrations in ng/mL).

Treatments		
Control	96,7 $\pm$ 0,0	
	Normal	
	Day 1	Day 7
α -MEM ⁺	88,7 $\pm$ 2,3 ^{*aA}	89,3 $\pm$ 2,9 ^{aA}
T_4 10 ng/mL	94,7 $\pm$ 1,7 ^{aA}	90,7 $\pm$ 1,6 ^{aA}
T_4 20 ng/mL	88,7 $\pm$ 1,7 ^{*aA}	92,7 $\pm$ 2,4 ^{aA}
T_4 50 ng/mL	85,3 $\pm$ 2,5 ^{*bA}	88,0 $\pm$ 2,0 ^{aA}

*Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).

Activation of caprine primordial follicles after in vitro culture

The percentages of primordial and developing follicles in fresh ovarian tissue were 59.3% and 37.3%, respectively (Figure 3). After seven days of culture, the percentage of primordial follicles was reduced in tissues cultured in media α -MEM⁺ and α -MEM⁺ with the addition of T₄ at the concentration of 20 ng/mL (Figure 3A, P<0.05), concomitant with an increase in the percentage of developing follicles (Figure 3B, P<0.05) when compared to the fresh control. However, no differences between the treatments (P>0.05) on the rate of primordial and developing follicles were observed, both in the culture of one and seven days. With the progression of the culture period from one to seven days, no differences on the percentages of primordial and developing follicles were observed (P> 0.05).

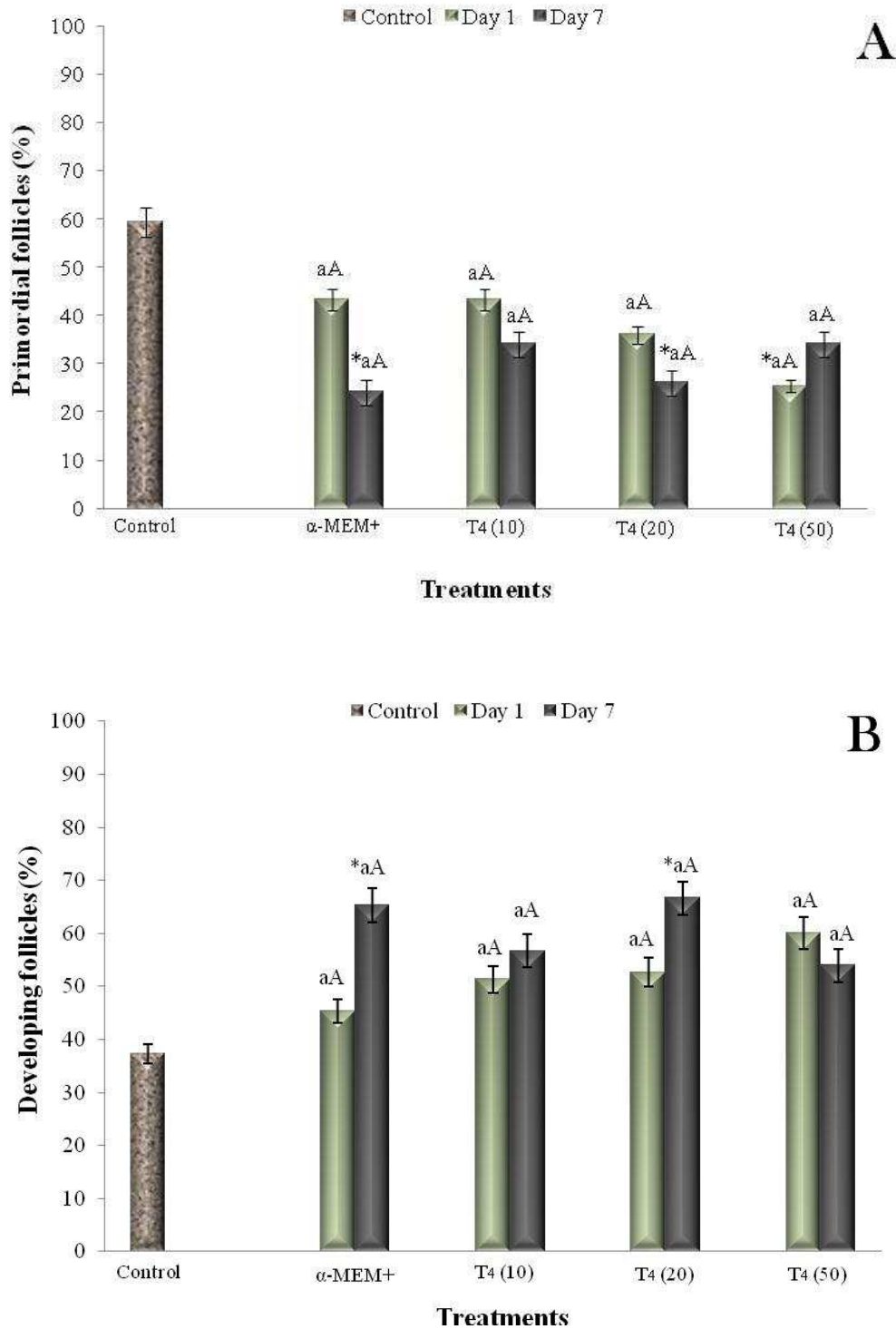


Fig. 3. Percentage (mean $\pm$ SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of T₄ (concentrations in ng/mL). *Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture (P<0.05); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment (P<0.05).

In vitro growth of caprine preantral follicles

According to Table 2, there was a reduction ($P < 0.05$) of the oocyte diameter, right after the culture for one and seven days in all media tested, when compared to the non-cultured control. However, this condition did not occur when the follicles were cultured for one day in medium containing 20 ng/ml of T_4 ($P > 0.05$). As for the follicular diameter, the tissue cultured for one or seven days in medium with 20 ng/mL of T_4 remained similar ($P > 0.05$) to the non-cultured control, unlike the tissues cultured in other media ($P < 0.05$). When α -MEM⁺ (cultured control) was compared to the other treatments (10, 20 and 50 ng/mL of T_4), it was verified that the addition of T_4 at the concentrations of 10 and 50 ng/mL reduced ($P < 0.05$) the oocyte and follicular diameters, both with one and seven days of culture.

However, the medium containing 20 ng/mL presented a greater follicular and oocyte diameter with one day of culture ($P < 0.05$) when compared to α -MEM⁺, being similar on day seven ($P > 0.05$). With the progression of the culture from one to seven days, only the α -MEM⁺ showed no difference in the oocyte diameter ($P > 0.05$). However, the follicular diameters were similar ($P > 0.05$).

Table 2. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of T_4 (concentrations in ng/mL).

Control		29,0 $\pm$ 0,7	Control		38,1 $\pm$ 1,0
Oocyte diameter (μ m)			Follicle diameter (μ m)		
Treatments	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7	
α -MEM ⁺	24,4 $\pm$ 0,8 ^{*bA}	25,2 $\pm$ 0,8 ^{*aA}	33,5 $\pm$ 1,8 ^{*bA}	33,2 $\pm$ 1,2 ^{*aA}	
T_4 10	21,5 $\pm$ 0,5 ^{*+cA}	20,3 $\pm$ 0,4 ^{*+bB}	26,3 $\pm$ 0,5 ^{*+cA}	25,6 $\pm$ 0,5 ^{*+bA}	
T_4 20	28,6 $\pm$ 0,9 ^{+aA}	26,0 $\pm$ 0,8 ^{*aB}	37,8 $\pm$ 1,3 ^{+aA}	35,9 $\pm$ 1,2 ^{aA}	
T_4 50	20,4 $\pm$ 0,5 ^{*+cA}	20,6 $\pm$ 0,4 ^{*+bB}	26,5 $\pm$ 0,6 ^{*+cA}	27,0 $\pm$ 0,4 ^{*+bA}	

*Differs significantly from control follicles ($P < 0.05$); ⁺compared with α -MEM⁺ ($P < 0.05$); ^{a,b}differs significantly among concentrations in each day of culture ($P < 0.05$); ^{A,B}differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P < 0.05$).

Ultrastructural features of caprine preantral follicles

The ultrastructural analysis was performed on preantral follicles of the non-cultured control and follicles cultured for one and seven days in medium containing 10 and 20 ng/mL of T₄ (Fig. 4A , B and C). These treatments were chosen for ultrastructural analysis because they presented satisfactory results in all the parameters evaluated by the histological analysis.

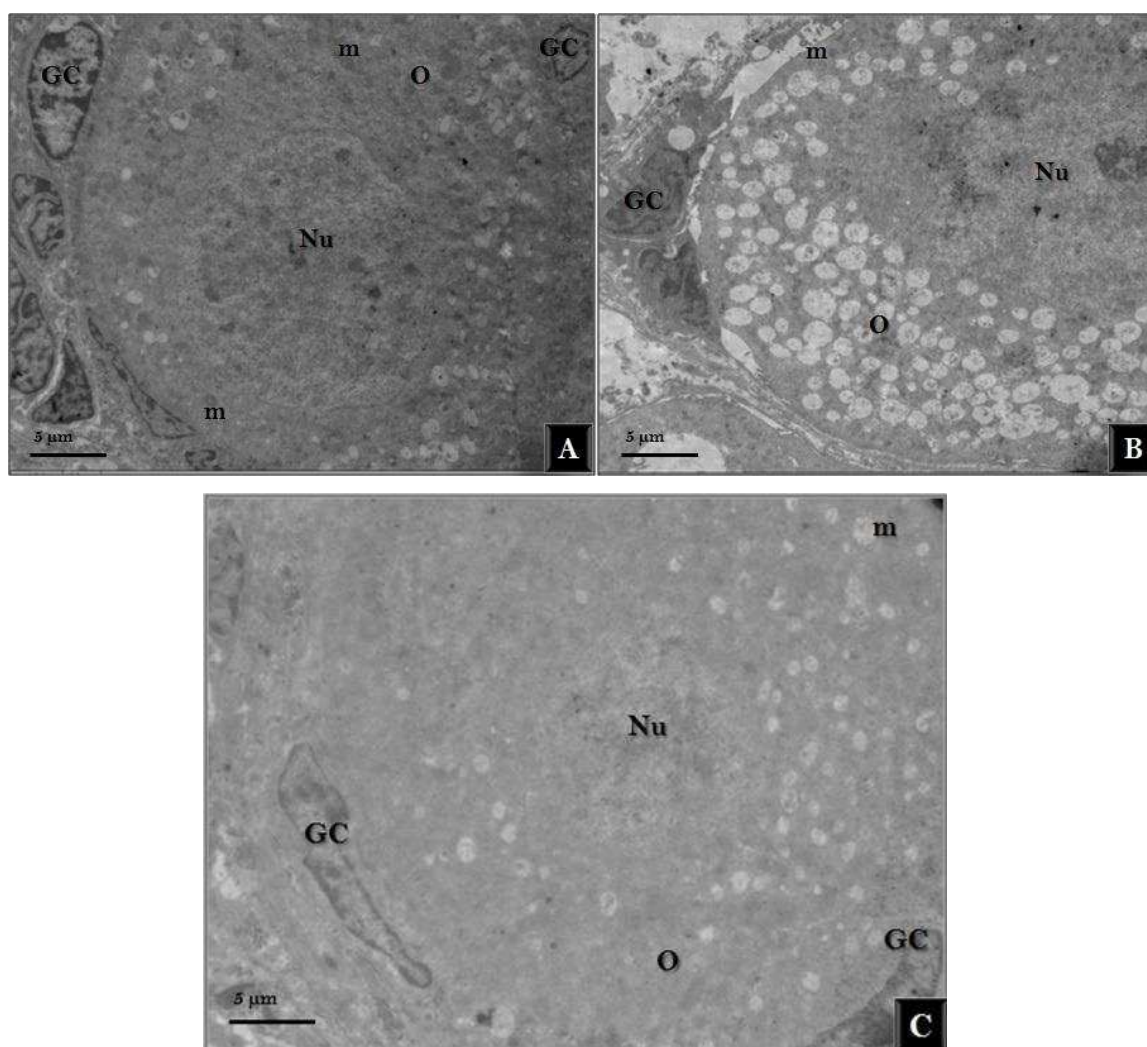


Fig. 4. Ultrastructure of preantral follicles fresh control (A, 4.400x) and cultured for a (B, 3.000x) and seven days (C, 3.000x) in medium containing the hormone thyroxine (10 and 20 ng/mL). It is noted homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded characteristic of the fresh control follicles (A). Intense vacuolization are present in the cytoplasm, indicating degeneration (B). O: oocyte, Nu: nucleus of the oocyte, GC: granulosa cells, m: mitochondria.

The follicles of the control non-cultured and cultured in 20 ng/mL of T₄ revealed an intact nuclear envelope, with a large nucleus of the oocyte. Moreover, the organelles, particularly the mitochondria, evenly distributed in the cytoplasm. The flattened and cubic granulosa cells were well organized around the oocyte (Fig. A and C). Both the control and follicles cultured in 20 ng/mL of T₄ were similar.

When cultured for one day in medium containing (10 ng/mL of T₄), the histology of the follicles appeared to be well preserved in the semi-thin sections stained with toluidine blue. However, TEM studies revealed some subtle changes in their ultrastructure, which indicate initial degeneration. These follicles generally have an oocyte with a large number of vesicles scattered throughout the cytoplasm. In addition, other signs were seen as lack of integrity of the basement membrane, disorganization of granulosa cells presenting low density of cytoplasmic organelles. The granulosa cells were in fewer contact with each other and exhibited less junctions (Fig. B).

Discussion

Although previous studies have been performed using the T₄ in the supplementation of the culture medium of preantral follicles (Arunakumari et al., 2010), the evaluation of different concentrations, as used in this study, can be considered a pioneering study. Additionally, studies have been very optimistic due to the positive effects of these media on the survival, activation and growth of caprine preantral follicles.

The action of thyroid hormones (T₃ and T₄) on the reproductive functions of domestic animals seem to be well established due to several studies. Rats that exhibit a disturbance in the functioning of the thyroid can block the effect of equine chorionic gonadotropin. Moreover, it also delays the first ovulation due to the decrease of LH surge (Tamura et al. 1998), and may even lead to infertility, due to changes in patterns of secretion of sexual hormones, as demonstrated in women (Pope et al. 2008). After the identification of the thyroid hormones in the follicular fluid of domestic animals (Slebozinski, 2005), a large number of studies have been directed to the effect of T₃ and T₄ in oocytes and embryos. Therefore, it has been reported the importance of these on the maturation of the *cumulus-oocyte* complex (Zhang et al. 1997), and in the inhibition of apoptosis of small granulosa cells, without, however, affecting the proliferative potential of these cells (Asahara et al. 2003). It also improves the rate of

morulae achievement, from preantral follicles cultured *in vitro* (Arunakumari et al. 2010).

In this study, the concentration of 10 ng/ml of T₄ made possible percentages of follicular survival similar to the non-cultured control. This result may have been different from the others due to the low concentration of T₄ used during *in vitro* culture. According to Wan et al. (1975) serum T₄ concentrations are higher in pigs on the estrus phase (4.36 mg/dl) than those in the diestrus phase (3.62 mg/dL). Similar results were observed by Toniollo et al. (1998) in swine, in which the lowest value was observed on day 16 of the estrous cycle (2.42 mg/dl) and the higher values were observed on day 6 of the estrous cycle (3.74 mg/dl). However, in the present work, a large number of primordial and intermediary follicles was observed during the histological analysis. These are considered the smallest preantral follicles when compared to primary and secondary follicles. A possible explanation for a higher rate of normal follicles cultured for one day in medium containing 10 ng/ml of T₄ (similar to the non-cultured control) would be the conversion of T₄ to T₃ by the deiodination process. This event is possible because T₃ shows the greatest amount of receptors in granulosa cells from small follicles, enabling to express the effect of maintaining the survival of the follicles.

However, on day seven of culture all the follicles could maintain the follicular survival similar to the non-cultured control. During a study in humans, it was observed that the T₄ stays in a latency period after its administration, demonstrating that its effect on target cells takes a while to occur. It was confirmed that this latency period lasts from two to three days, reaching its maximum activity with 10 to 12 days after its administration, and some metabolic activities persist for six weeks to two months (Guyton & Hall, 2006). In addition, the administration of L-thyroxine in pubescent rats, at a concentration of 50 mcg/5 mL of distilled water, maintains the plasma concentration of free T₄ high in the ovaries of the animals by 30 days, remaining even higher by 60 and 90 days (Serakides et al. 2001).

Regarding the follicular activation process (that is, the transition from primordial follicles to developing follicles; Betteridge et al., 1989), it was verified that on day seven of culture the α -MEM⁺ (cultured control) and the medium containing 20 ng/ml of T₄ caused a decrease in the percentage of primordial follicles and an increase in the developing follicles, compared to the fresh control. Thyroxine increases the metabolic activities and modulates oxygen consumption, metabolism of lipids, carbohydrates and proteins (Boelaert & Franklyn, 2005). The concentration of 20 ng/ml was able to

maintain follicular activation during seven days of culture in developing follicles, thus confirming the involvement of T_4 in follicular growth and development, in agreement with the findings in goats (Rajarajan et al. 2006) and sheep (Tamilman et al. 2005; Arunakumari et al. 2007). Also according to Boelaert & Franklyn (2005), the biological response of T_4 on cell development and differentiation are a result of hormonal modulation of the metabolism. The best results obtained with the use of medium containing 20ng/mL of T_4 may have occurred by the interaction of other endocrine, autocrine and paracrine factors that coordinate ovarian changes during folliculogenesis (Magalhães et al., 2009). In this study, no significant effect of T_4 (20 ng/ml) on the follicular activation was observed, when compared to the tissues cultured in α -MEM⁺. This may be due to the fact that α -MEM⁺ is a medium rich in nutrients (amino acids, carbohydrates and vitamins) and DNA precursors, which promote cell division (Hartshorne, 1997).

In the present study, the effect of the medium containing 20 ng/ml of T_4 on the oocyte diameter was non-existent, since, after culturing for a day, it remained similar to the non-cultured control, fact not occurred on day seven. It is possible that on day one of culture, this concentration of T_4 has stimulated the synthesis of essential substances for oocyte growth, which probably did not occur during the seven days of culture. In preantral follicles, the first changes indicative of atresia occur in the oocyte. Importantly, during the preantral stage the oocyte is more sensitive to the process of atresia (Morita & Tilly, 1999).

With respect to follicular diameter, there was no growth of the follicles in culture compared to the non-cultured control, except when fragments of ovaries were cultured in medium containing 20 ng/ml of T_4 . This result may suggest that 20 ng/ml of T_4 was able to maintain follicular structure, but without the development of preantral follicles. According to Tamilmani et al. (2005), high concentrations of T_4 can compensate for the absence of FSH in ovine preantral follicles cultured *in vitro*. These results differ from the present study, since the use of 50ng/mL of T_4 in the culture medium had no beneficial effects, as it decreased both the oocyte and follicular diameter.

Another important result observed in this study was related to the progression of the culture from day one to day seven, in which all media maintained the follicular diameter. This fact may be due to the swelling of granulosa cells that increased the amount of intracellular water resulting in an increase of the follicle (Matos et al., 2006).

However, to evidence those observations, it would be necessary the use of a more accurate technique, such as transmission electron microscopy (TEM), to evaluate the density of cell organelles, as well as the ultrastructural conditions of follicles cultured *in vitro* (Matos et al., 2006).

Other authors have emphasized the importance of ultrastructural analysis after the *in vitro* culture of preantral follicles (mouse: Salehnia et al., 2002; goat: Araújo et al., 2010). The ultrastructural integrity of the follicles was observed in follicles cultured for seven days in medium containing 20 ng/ml of T₄. Similar results were observed after the culture of caprine preantral follicles in medium containing FSH (Matos et al. 2007). However, the follicles cultured in medium containing 10 ng/ml of T₄ were characterized by a large number of vacuoles, absence of organelles in the cytoplasm, as well as irregular or fragmented nuclear and cytoplasmic membranes. These same changes were observed by Matos et al. (2006) after the culture of preantral follicles in a medium containing indole-3-acetic acid.

Conclusions

The results found in this experiment permit to conclude that the addition of 20 ng/mL of T₄ in the culture medium is effective in maintaining the survival, activation and growth of preantral follicles, during seven days of culture.

Acknowledgements

To CNPq for the financial support to the research. To CAPES for providing the scholarship to the Doctorate student. To the core of Microscopy and Microanalysis of UFV for the support on the ultrastructural analysis.

Referências

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. *Pesq. Vet. Bras*, v.30, p. 305-310, 2010.

Arunakumari, G.; Vagdevi, R.; Rao, B. S.; Naik, B. R.; Naidu, K. S.; Kumar, R. V. S. et al. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. Small Ruminant Res, v.70, p. 93–100, 2007.

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

Asahara, S.; Sato, A.; Ali Aljonaid, A, and Maruo, T. Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles Kobe J. Med. Sci, v. 49, p. 107-116, 2003.

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*. J Reprod Fertil, v.38, p.87-98, 1989.

Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology, v.1, p. 5-13, 2006.

Boelaert, K & Franklyn, J. A. Thyroid hormone in health and disease. J. Endocrinol, v. 187, p. 1-15, 2005.

Cecconi, S.; Rossi, G.; Coticchio, G.; Maccharelli, G.; Borini, A.; Canipari, R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development *in vitro*. Fertil Steril, v. 81, p. 919–924, 2004.

Chaves, R.N., F.S. Martins, M.V. Saraiva, J.J. Celestino, C.A. Lopes, J.C. Correia, I.B. Verde, M.H. Matos, S.N. Bão, K.P. Name, C.C. Campello, J.R.V. Silva, J.R. Figueiredo. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. Reprod Fertil Dev, v. 20, p. 640-647, 2008.

Fair, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Anim Reprod Sci, v.78, p.203-216, 2003.

Guyton, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. 10^a edição. Interamericana. Rio de Janeiro, 2001.

Guyton, A. C., Hall, J. E. Fisiologia Médica. 11^a edição. Elsevier. Edição Internacional. 2006.

Hartshorne, G.M. *In vitro* culture of ovarian follicles. Rev Reprod, v. 2, p. 94-104, 1997.

Hirshfield, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. Int. Rev. Cytol, v. 124, p. 43–101, 1991.

Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. Mol. Hum. Reprod, v.12, p.61-69, 2006.

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

Magalhães, D. M.; Fernandes, D. D.; Araujo, V. R.; Almeida, A. P.; Matos, M. H. T.; Figueiredo, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.33, n.4, p.171-182, 2009.

Maruo, T. et al. Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. Acta Endocrinol, v. 127, p. 152–160, 1992.

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.; Bão, 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., I. B. Lima-Verde, M. C. A. Luque, J. E. Maia, J. R. V. Silva, J. J. H. Celestino, F. S. Martins, S. N. Bao, C. M. Lucci, J. R. Figueiredo. Essential role of

follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 15 p. 173–182, 2007.

McGee, E. A, Hsueh, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, v. 21, p. 200–214, 2000.

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

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.

Salehnia, M.; Moghadam, E. A.; Velojerdi, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil. Steril*, v. 78, p. 644-45, 2002.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT[®] 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Serakides, R.; Nunes, V. A.; Nascimento, E.; Ribeiro, A. F. C.; Silva C. M.; Folliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinology e Metabologia*, v. 45, p. 258-264, 2001.

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.

Slebozinski, A. B. Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid The enigma of the thyroid ovary interaction. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 29, p. 97–103, 2005.

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.

Tamura, K.; Hatsuta, M.; Watanabe, G. Blockage of gonadotropin-induces first ovulation caused by thyroectomy and its possible mechanism in rats. *Am. J. Physiol.*, v.275, p. 380-385, 1998.

Toniollo, G. H.; Vicente, W. R. R.; Oliveira, C. A.; Malheiros, E. B.; Carvalho, M. B. Avaliação dos níveis séricos de Triiodotironina (T₃) e Tiroxina (T₄) durante o ciclo estral em marrãs. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*, v. 35, p. 210-214, 1998.

Wan, W. C.; Wung, S. C.; Li, P. H.; Tai, C. T.; Koy, Y. H.; Koh, F. K. Serum thyroxine concentration in sow housed in a subtropical area. *Journal of Animal Science*, v. 41, p. 124-128, 1975.

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 n.7 p. 555–562, 1997.

12. CAPÍTULO VI (Fase II)

**Associação entre Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I, Tiroxina e
Hormônio Folículo Estimulante Sobre a Sobrevivência e o Desenvolvimento *in*
vitro de Folículos Pré-antrais Caprinos**

*(Association between Insulin-like Growth Factor-I, Thyroxine and Follicle Stimulating
Hormone on the Survival and in vitro Development of Caprine Preantral follicles)*

**Associação entre Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I, Tiroxina e
Hormônio Folículo Estimulante Sobre a Sobrevivência e o Desenvolvimento *in*
vitro de Folículos Pré-antrais Caprinos**

*Association between Insulin-like Growth Factor-I, Thyroxine and Follicle Stimulating
Hormone on the Survival and in vitro Development of Caprine Preantral follicles*

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a influência da interação entre Hormônio Folículo Estimulante obtido da pituitária Humana-hFSH (10 ng/mL), IGF-I (100 ng/mL) e Tiroxina-T₄ (10, 20 ng/mL) na sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Fragmentos do córtex ovariano cultivado ou não foram processados para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram uma redução no percentual de folículos normais, após um e sete dias de cultivo nos meios α -MEM⁺ (controle cultivado), T₄₍₁₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎, T₄₍₂₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎ e nos meios α -MEM⁺, IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎, T₄₍₂₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎, T₄₍₂₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎, quando comparados ao controle não cultivado. Entretanto, o meio contendo T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎ apresentou taxa de sobrevivência folicular superior aos demais tratamentos, quando cultivado por sete dias. Observou-se ainda, que o diâmetro folicular quando cultivado neste meio não se alterou, quando comparado ao controle (não cultivado). As análises ultraestruturais confirmaram a integridade de folículos cultivados em meio contendo T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎. Em conclusão, o meio com T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎ apresentou os melhores resultados, quando se avaliou sobrevivência, crescimento e aspectos ultraestruturais de folículos pré antrais de caprinos cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: Caprino, folículos pré-antrais, hFSH, IGF-I, T₄.

Abstract

The aim of this study was to investigate the influence of the interaction between follicle stimulating hormone obtained from Human Pituitary-hFSH (10 ng/mL), IGF-I (100 ng/mL) and thyroxine-T₄ (10, 20 ng/mL) on survival, activation and growth of preantral follicles cultured *in vitro*. Fragments of cultured or non-cultured ovarian cortex were processed for classic histology and transmission electron microscopy. The results showed a reduction in the percentage of normal follicles, after one and seven days of

culture in media α -MEM⁺ (cultured control), T₄₍₁₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎, T₄₍₂₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎ and in media α -MEM⁺, IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎, T₄₍₂₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎, T₄₍₂₀₎/IGF-I₍₁₀₀₎/FSH₍₁₀₎, when compared to the non-cultured control. However, the medium containing T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎ showed a follicular survival rate higher than the other treatments, when cultured for seven days. It was also observed that the follicular diameter did not change when cultured in this medium, when compared to the control (non-cultured). The ultrastructural analysis confirmed the integrity of follicles cultured in a medium containing T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎. In conclusion, the medium with T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎ showed the best results, when evaluating the survival, growth and ultrastructural aspects of caprine preantral follicles cultured *in vitro*.

Keywords: Caprine, preantral follicles, hFSH, IGF-I, T₄.

Introduction

In order to maximize the reproductive potential of the ovarian tissue, it is necessary to develop culture strategies that support the activation and sustain the *in vitro* growth of primordial follicles, in view of the abundance of this class of follicles in the ovarian tissue (Picton et al., 2008). The development of ovarian follicles, oocytes and embryos depend on the spatial and temporal expression of specific genes and a continuous supply of energy, hormones and growth factors (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). The progress in culture systems that can support the growth and development of preantral follicles in domestic species has been slow when compared to results in mice, for which a complete growth can be obtained, resulting in a production of live mice (O'Brien et al., 2003).

Although the mechanisms that regulate the activation and subsequent growth of primordial follicles remain unexplained, what is known is that follicular development is dependent on the presence of the oocyte, granulosa cells and the secretion of a variety of growth factors, such as Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9), Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and Epidermal Growth Factor (EGF) (Webb et al., 2004). Recent studies have demonstrated that IGF-I plays an important role in the development of preantral follicles and inhibits the process of follicular atresia. When added during the *in vitro* culture of preantral follicles, IGF-I stimulates follicle growth of human (Louhio et al., 2000), cattle (Gutierrez et al., 2000), rats (Zhao et al., 2001) and mice (Liu et al.,

1998) ovarian tissue, in synergy with Follicle Stimulating Hormone (FSH). In rats, IGF-I significantly increases follicular diameter and DNA content, when added during the *in vitro* culture of preantral follicles (Zhao et al., 2001).

Among the substances that participate in early folliculogenesis directly or indirectly, FSH and Thyroxine deserve to be highlighted. Some *in vitro* studies demonstrated that the addition of FSH to the culture medium promotes apoptosis inhibition and antrum formation in large secondary follicles of different species (ovine: Cecconi et al., 1999; bovine: Gutierrez et al., 2000; swine: Mao et al., 2002). Some studies also demonstrate that FSH is capable of regulating the expression of various growth factors such as Kit Ligand (KL), GDF-9 and Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15). These, in turn, participate in the activation and follicular growth (Thomas et al., 2005). More recently, it has been noted the participation of thyroid hormones (T₃ and T₄) in the fertility of mammals (Cecconi et al., 2004). The effects of these hormones on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis are related to the differentiation of granulosa cells (Silva et al., 2004) and ovulation stimulation (Serakides et al., 2001). Thus, the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis act simultaneously in the control of folliculogenesis, and thyroid hormones can promote various effects on ovarian function (Saraiva et al., 2010a). The present study was designed with the aim to investigate the influence of the interaction between Follicle Stimulating Hormone obtained from Human pituitary-hFSH (10 ng/mL), IGF-I (100 ng/mL) and Thyroxine-T₄ (10, 20 ng/mL) on the survival, activation and growth of preantral follicles cultured *in vitro*. These concentrations were used after a previous study performed by our team, in which showed promising results when cultured *in vitro*.

Materials and Methods

Source of ovaries

Ovaries (n = 34) from 17 adult non-pregnant mixed-breed goats (1-3 years of age) were collected from a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds and then washed again in MEM supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported to the laboratory in MEM at 4 °C within 1 h postmortem (Chaves et al., 2008). Unless otherwise mentioned, Like Growth Factor Insulin-I (IGF-

I), human FSH (hFSH), Thyroxine (T₄) and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Experimental protocol

The organ culture system utilized herein was previously described in detail (Matos et al. 2007; Celestino et al., 2010). In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments. Subsequently, ovarian cortex tissue samples from each ovarian pair were cut into 9 slices (approximate size: 3 x 3 mm, with 1 mm thickness) using a scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either fixed for histological and ultrastructural analysis (fresh control) or placed in culture for 1 (d1) and 7 (d7) days. Caprine tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 1 mL of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator and all the media were incubated for 1 hour prior to use. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2 to 7.4) supplemented with ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), which was called α -MEM⁺ (culture control).

For the experimental conditions, the ovarian cortex fragments were cultured in α -MEM⁺ alone (culture control) and α -MEM⁺ supplemented with different concentrations of FSH (10 ng/mL), IGF-I (100 ng/mL) or T₄ (10, 20 ng/mL) in association as showed in the Table 1. Each treatment was repeated seventeen times and the culture media was changed every 2 days.

Table 1. Different media tested for the *in vitro* culture of caprine preantral follicles.

Culture medium	Abbreviation
α -MEM ⁺ (culture control)	α -MEM ⁺
α -MEM ⁺ (IGF-I + FSH)	IGF-I/FSH
α -MEM ⁺ (T ₄ + FSH)	T ₄ /FSH
α -MEM ⁺ (T ₄ + IGF-I)	T ₄ /IGF-I
α -MEM ⁺ (T ₄ + IGF-I + FSH)	T ₄ /IGF-I/FSH

Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

Before culture (fresh control) and after 1 and 7 days in culture, all tissue pieces were fixed in Carnoy's solution for four hours and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), the caprine ovarian cortex tissues were cut into 7 μ m sections, which were mounted on glass slides and stained by Periodic Acid Schiff (PAS) - hematoxylin. Follicle stage and morphology were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined by a microscope (Olympus, Japan) under 400x magnification.

The developmental stages of follicles have been defined previously (Silva et al., 2004) as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened and cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells; and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). Only the preantral follicles (primordial, intermediate, primary and secondary) were considered in the analysis, and the antral stage was not included because of the very small number of antral follicles present in the ovarian fragments. The preantral follicles were also classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and lacked a pyknotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall, 510 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x seventeen repetitions = 510 follicles).

To evaluate follicular activation, the percentages of healthy primordial and growing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in each medium. In addition, follicle and oocyte diameters were measured in healthy follicles only. Follicle diameter was recorded from edge to edge of the outer layer of granulosa cells or from the outside edge of the theca cell layer when present. Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded in each measurement and the average of these two values was calculated. Each follicle was examined in every section in which it appeared and matched with the same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once.

Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles

To better evaluate follicular morphology, ultrastructural analysis was performed on preantral follicles from non-cultured tissue (fresh control), follicles cultured in the treatments that had the best results for morphology, activation and growth. Briefly, small pieces (1 mm³) of caprine ovarian tissues were fixed for 4 hours at room temperature in karnovsky fixative (2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2). After fixation, the samples were washed twice in 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 resin. Afterwards, semi-thin sections (3 µm) were cut using an ultramicrotome (MT2-B, Sorvall, USA), stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy under 400x magnification. Ultra-thin sections (60 to 70 nm) were obtained from preantral follicles classified as morphologically normal in semi-thin sections, according to the criteria adopted for histological analysis. Subsequently, ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a transmission electron microscope EM 109 Zeiss (EM, Berlin, Germany) operating at 80 Kv (Donato et al., 2009). Parameters such as the density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, vacuolization and integrity of the basement membrane were evaluated.

Statistical analysis

The variables were submitted to Normality (Lilliefors) and Homoscedasticity (Cochran) tests and posteriorly to the analysis of variance at a probability of 5%. In case a significance was presented, the Duncan test was carried out (PROC ANOVA; SAS, 2002).

Results

Caprine preantral follicle survival before and after in vitro culture

A total of 5,610 preantral follicles were analyzed by classic histology. Figures (1A, B and C) show normal follicles of control ovarian tissue (non-cultured), and after the culture for seven days in α -MEM⁺ supplemented with T₄/FSH (20/10 ng/mL) and

cultured for one day, in medium containing T₄/IGF-I (20/100 ng/mL), respectively. Figures (1 D, E and F) illustrate degenerated follicles after the culture in α -MEM⁺ for seven days (cultured control) or follicles of ovarian tissue cultured for seven days in medium containing IGF-I/FSH (100/10 ng/mL) and medium containing T₄/IGF-I/FSH (20/100/10 ng/mL), respectively. In degenerated follicles retracted oocytes and disorganization of granulosa cells were observed.

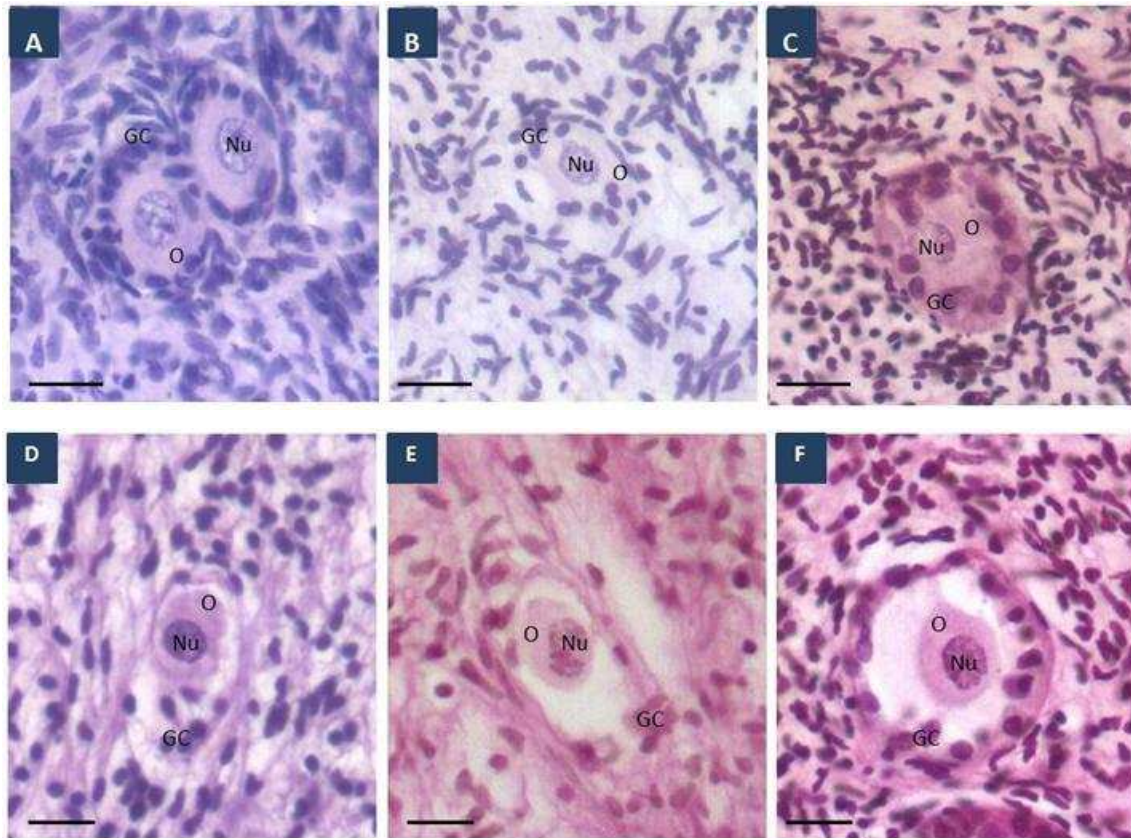


Figure 1. Histological sections of ovarian fragments tissue after staining Periodic Acid-Schiff's hematoxylin showing morphologically normal follicles (A, fresh control), (B, T₄/FSH 20/10ng/mL) e (C, T₄/IGF-I 20/100ng/mL). The degenerate follicles were represented in the letters (D, α -MEM⁺); (E, IGF-I/FSH 100/10ng/mL) e (F, T₄/IGF-I/FSH 20/100/10ng/mL). O: oocyte, Nu: nucleus of the oocyte, GC: granulosa cells (Original magnification 400 $\times$). Scale bars represent 20 μ m.

The percentages of morphologically normal preantral follicles in the fresh control and after the *in vitro* culture are presented in Table 2. After one day of culture, there was a reduction ($P<0.05$) in the percentage of morphologically normal follicles in tissues cultured in α -MEM⁺ (control), in medium containing T₄/IGF-I (10/100ng/mL) and T₄/IGF-I/FSH (20/100/10ng/mL) compared to the fresh control (96.7%). The cultures in the other media maintained the percentage of normal follicles, when compared to the fresh control ($P>0.05$).

However, on day seven of culture, the media supplemented with T₄/FSH (10/10ng/mL), T₄/FSH (20/10ng/mL), T₄/IGF-I (10/100ng/mL) and T₄/IGF-I (20/100ng/mL) maintained the percentage of normal follicles equivalent to the fresh control ($P>0.05$). When the media were compared among themselves, there was no difference ($P>0.05$) in the rate of normal follicles, when culturing the tissues for one day. However, with seven days of culture, the media containing T₄/FSH (20/10ng/mL) was superior ($P<0.05$) to the α -MEM⁺, IGF-I/FSH (100/10ng/mL) and T₄/IGF-I/FSH (10/100/10ng/mL) media. With the progression of culture from one to seven days, all treatments maintained ($P>0.05$) the percentage of normal follicles.

Table 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of T₄/IGF-I/FSH (concentrations in ng/mL).

Control	96.7±0.5	
Normal		
Treatments	Day 1	Day 7
α-MEM ⁺	87.3±1.5 ^{*aA}	83.1±1.8 ^{*cA}
IGF-I ₍₁₀₀₎ /FSH ₍₁₀₎	88.9±2.9 ^{aA}	85.6±2.2 ^{*bcA}
T ₄₍₁₀₎ /FSH ₍₁₀₎	93.3±1.4 ^{aA}	89.2±2.1 ^{abA}
T ₄₍₂₀₎ /FSH ₍₁₀₎	88.3±4.0 ^{aA}	94.2±0.8 ^{aA}
T ₄₍₁₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎	86.7±3.0 ^{*aA}	93.3±1.4 ^{abA}
T ₄₍₂₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎	91.7±1.0 ^{aA}	92.5±1.6 ^{abA}
T ₄₍₁₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎ /FSH ₍₁₀₎	88.9±2.2 ^{aA}	85.6±4.8 ^{*bcA}
T ₄₍₂₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎ /FSH ₍₁₀₎	84.4±9.1 ^{*aA}	87.8±2.2 ^{*abcA}

*Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ^{a,b}differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).

Activation of caprine primordial follicles after in vitro culture

The percentages of primordial and developing follicles in fresh ovarian tissue were 59.8% and 36.9%, respectively (Figure 2). After the culture, all media tested were similar to the non-cultured control in primordial follicles and developing follicles ($P>0.05$). When the media were compared among themselves, no difference ($P>0.05$) was observed in both primordial and developing follicles. Additionally, with the progression of the culture period from one to seven days, no differences in the percentages of primordial and developing follicles were observed ($P>0.05$).

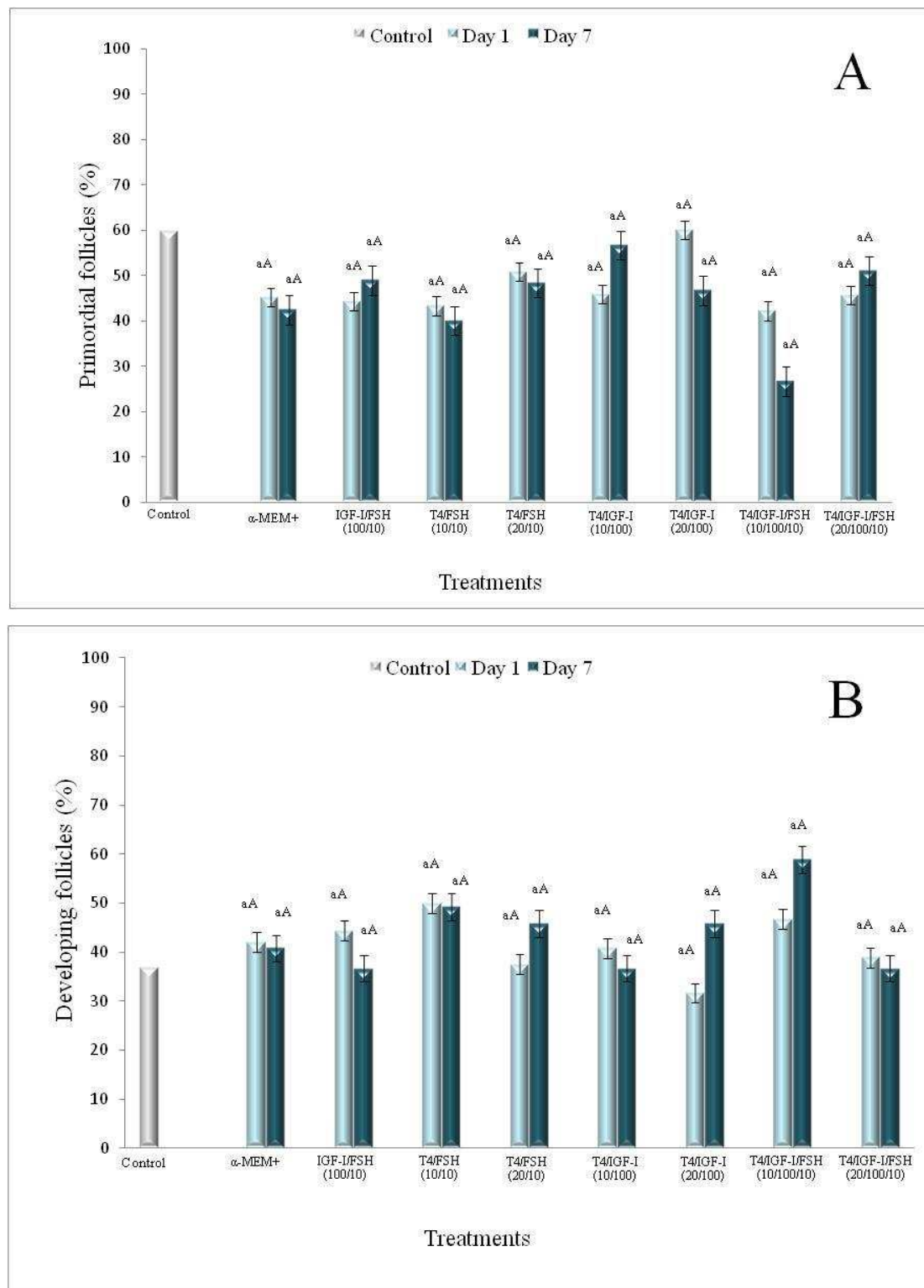


Figure 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of primordial and developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured control (A) and cultured *in vitro* for 1 or 7 days in the absence or presence of interaction T₄/IGF-I/FSH (concentrations in ng/mL). * Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly

among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).

In vitro growth of caprine preantral follicles

There was a reduction ($P<0.05$) in the oocyte diameter in all media, when the ovarian tissues were cultured for seven days (Table 3), except for the medium supplemented with T₄/FSH (20/10ng/mL, $P>0.05$). Regarding the follicular diameter, the culture for one day in α -MEM⁺ (cultured control) and T₄/FSH (20/10ng/mL) media remained similar ($P>0.05$) to the non-cultured control. When the media were compared among themselves on day one of culture, the concentration of T₄/FSH (20/10ng/mL) was superior ($P<0.05$), except for the α -MEM⁺ (cultured control) in oocyte and follicular diameter. However, on day seven of culture, only the medium supplemented with T₄/FSH (20/10ng/mL) remained similar to the non-cultured control ($P>0.05$).

However, when comparing the media among themselves on day seven of culture, the medium supplemented with T₄/FSH (20/10ng/mL) remained superior ($P<0.05$) than the other treatments, both in oocyte and follicular diameter. With the progression of the culture from one to seven days, the medium containing IGF-I/FSH (100/10ng/mL) showed a decrease ($P<0.05$) in the oocyte and follicular diameter, while the medium supplemented with T₄/IGF-I (10/100ng/mL) made possible an increase in the oocyte diameter ($P<0.05$).

Table 3. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of interaction T₄/IGF-I/FSH (concentrations in ng/mL).

Control	27.9 $\pm$ 0.4		37.1 $\pm$ 0.7	
	Oocyte diameter (μ m)		Follicle diameter (μ m)	
Treatments	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
α -MEM ⁺	24.1 $\pm$ 0.4 ^{*abA}	23.4 $\pm$ 0.5 ^{*bA}	33.6 $\pm$ 0.7 ^{abA}	31.4 $\pm$ 0.8 ^{*bA}
IGF-I ₍₁₀₀₎ /FSH ₍₁₀₎	21.2 $\pm$ 0.6 ^{*cdeA}	18.8 $\pm$ 0.6 ^{*dB}	28.4 $\pm$ 1.0 ^{*cdA}	24.7 $\pm$ 0.7 ^{*dB}
T ₄₍₁₀₎ /FSH ₍₁₀₎	21.5 $\pm$ 0.5 ^{*cdA}	20.7 $\pm$ 0.4 ^{*cdA}	29.3 $\pm$ 1.3 ^{*cdA}	27.0 $\pm$ 0.5 ^{*cdA}
T ₄₍₂₀₎ /FSH ₍₁₀₎	25.4 $\pm$ 1.0 ^{*aA}	26.8 $\pm$ 1.3 ^{aA}	35.3 $\pm$ 1.9 ^{aA}	36.6 $\pm$ 2.2 ^{aA}
T ₄₍₁₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎	20.2 $\pm$ 0.5 ^{*deB}	22.5 $\pm$ 0.6 ^{*bcA}	27.5 $\pm$ 1.4 ^{*cdA}	29.1 $\pm$ 1.0 ^{*bcA}
T ₄₍₂₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎	22.7 $\pm$ 0.4 ^{*bcA}	21.6 $\pm$ 0.3 ^{*bcA}	30.6 $\pm$ 0.8 ^{*bcA}	28.7 $\pm$ 0.6 ^{*bcdA}
T ₄₍₁₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎ /FSH ₍₁₀₎	20.1 $\pm$ 0.5 ^{*deA}	21.3 $\pm$ 0.7 ^{*bcdA}	26.6 $\pm$ 0.7 ^{*cdA}	26.5 $\pm$ 0.8 ^{*cdA}
T ₄₍₂₀₎ /IGF-I ₍₁₀₀₎ /FSH ₍₁₀₎	19.1 $\pm$ 0.5 ^{*eA}	18.8 $\pm$ 0.6 ^{*dA}	25.9 $\pm$ 0.7 ^{*dA}	24.7 $\pm$ 0.7 ^{*dA}

*Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture (P<0.05); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment (P<0.05).

Ultrastructural features of caprine preantral follicles

The ultrastructural analysis was performed on preantral follicles of the non-cultured control and follicles cultured in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL), considering that this medium showed the best results in the parameters evaluated by histological analysis.

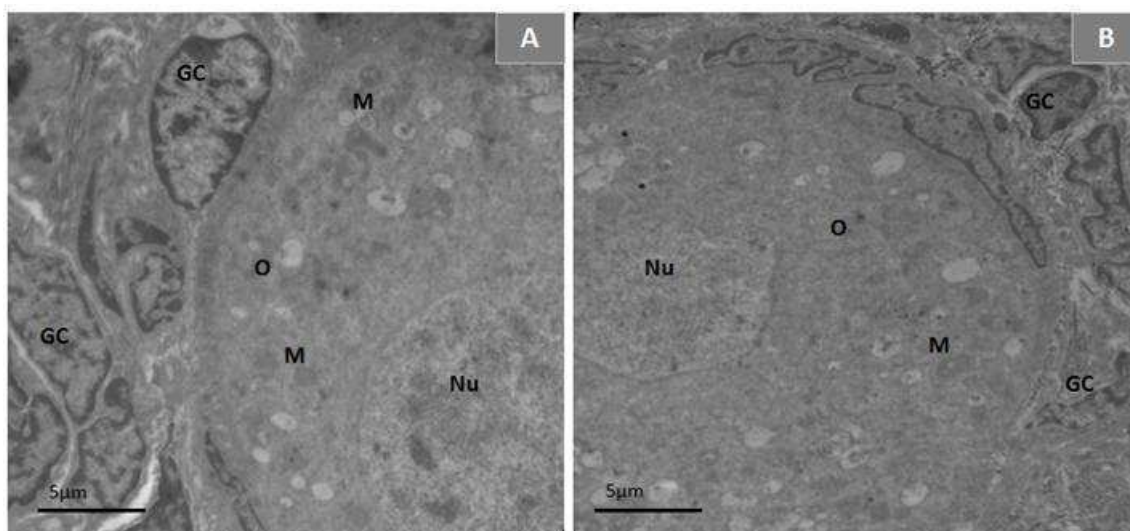


Figure 3. Ultrastructural analysis of preantral follicles from fresh control (A, 4.400x) and cultured for seven days (B, 3.000x) in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL). Note homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded, characteristic of the fresh control follicles (A and B). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells; M: mitochondria. (A and B = 5 μm).

The follicles of the non-cultured control revealed an intact nuclear envelope, with a large nucleus of the oocyte. Moreover, the organelles, particularly the mitochondria and endoplasmic reticulum, were evenly distributed in the cytoplasm. Additionally, the granulosa cells were well arranged around the oocyte, showing a large and elongated nucleus (Fig. 3A). When cultured for seven days in medium with T₄/FSH (20/10ng/mL, Fig 3B), the ultrastructural characteristics of the follicles were similar to the non-cultured control (Fig. 3B).

Discussion

The composition of the culture medium is an important factor for the development of preantral follicles and can mainly determine their survival. By demonstrating that the percentage of morphologically normal follicles in α -MEM⁺ (cultured control), T₄/IGF-I (10/100ng/mL) and T₄/IGF-I/FSH (20/100/10ng/mL) media was lower than the fresh control (non-cultured tissue) on day one of culture, it is understood that the absence of hormonal supplementation in the control medium α -

MEM⁺ and the low concentration of thyroxine (T₄) in the T₄/IGF-I (10/100ng/mL) treatment may have been insufficient to ensure the survival of follicles in the first place.

This fact can be justified mainly due to the fundamental role of T₄ in the fertility of animals (Pope et al., 2008; Cheng et al., 2010), more specifically in preantral follicles. The importance of T₄ in the *in vitro* development of these has already been demonstrated in caprine (Rajarajan et al., 2006) and ovine (Arunakumari et al., 2007) species. In another extreme, the reduction in the percentage of normal follicles on day one in medium containing T₄/IGF-I/FSH (20/100/10ng/mL) corroborates with the findings by Arunakumari et al. (2010), in which the effect of the FSH, T₄ and IGF-I combination did not provide an increase of matured oocytes (MII stage), although it had considerably elevated the proportion of preantral follicles showing growth, antrum formation and *in vitro* ovulation.

The base culture medium used in the culture of preantral follicles is commonly supplemented with various factors and substances, but the effectiveness of these additional factors on follicular survival and growth depends on the species studied, the concentrations used, the culture system and the number of days of culture (Rodrigues et al., 2010). In the face of this, the requirement of components for a culture medium of preantral follicles during seven days is greater, considering that it should ensure favorable growth conditions for this structure during its different stages of development and requirements.

Therefore, the superiority of the T₄/FSH (20/10ng/mL) combination on α -MEM⁺ and IGF-I/FSH (100/10ng/mL), demonstrated in this study, makes clear the fundamental role of T₄ during the culture of preantral follicles over a longer period. T₄ has an effect not only in follicular development, as demonstrated in mice (Jiang et al., 2000), but also in the maturation of oocytes cultured *in vitro* (Arunakumari et al., 2007). Therefore, the inferiority of the only two media that did not have T₄ in their composition α -MEM⁺ and IGF-I/FSH (100/10ng/mL) confirms its necessity in the culture media, in order to ensure the follicular viability under these conditions.

Regarding the superiority of the rate of normal follicles observed in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL), when compared to the medium supplemented with T₄/IGF-I/FSH (10/100/10ng/mL), it can be associated to an overgrowth of the follicle of the latter treatment, by the synergistic action of T₄, FSH and IGF-I, not guaranteeing the survival of the follicle. It is believed that this synergism elevates growth rates, antrum formation and diameter increase, in a proportion in which the medium is not capable of

promoting an adequate nutritional support for the developing follicles, especially when they are cultured for a prolonged period. This fact has been previously described by Arunakumari et al. (2010) in media containing T₄, FSH, IGF-I and GH, and also by Zhao et al. (2000) in media containing GH.

Despite the uncertainties inherent to the factors responsible for the onset and resumption of follicular growth of the primordial follicles, event called follicular activation, it is known that the growth is controlled by both hormones (gonadotropic and somatotropic), and growth factors that act directly or indirectly, in an autocrine and/or paracrine (Fortune et al., 2003; Martins et al., 2010) form. Thus, the identification and knowledge about the role of these substances could result in the development of culture systems that are efficient to the follicular activation, allowing the development of a large number of preantral follicles (Demeestere et al., 2005).

This experiment shows that, after the 1st and 7th day of culture, all media maintained a similar number of primordial and developing follicles, when compared to the medium without the addition of hormones (α -MEM⁺), showing no effect of the media on follicular activation. Corroborating with the found results, Silva et al. (2006) also found no effect on follicular activation of media containing FSH, despite having reported an increase in follicular and oocyte diameter. However, this finding differs from other studies (Magalhães et al., 2009; Martins et al., 2010; Saraiva et al., 2010b) which, although they have worked with different culture media, they showed a reduction in the percentage of primordial follicles, concomitant with the increase in the percentage of developing follicles after one day of culture. These same authors showed that, after the 7th day of culture, this reduction of primordial follicles and the elevation of developing follicles were even more striking and expressive. The data, found by these authors, allowed them to conclude that the growth factor present in the tested media was able to induce follicular activation (Martins et al. 2010). Similar results were found in goats (Martins et al., 2005; Silva et al., 2006; Matos et al., 2007). However, in this study, although no significant difference was found, this event was noted, on day one and seven of culture, in the T₄/FSH (20/10 ng/mL), T₄/IGF-I (20/100 ng/mL) and T₄/IGF-I/FSH (10/100/10 ng/mL) media. Thus, it can be affirmed that the culture media tested in this study do not represent the essential factor for the activation of caprine preantral follicles cultured *in vitro*.

A set of morphological criteria are used to characterize the onset of the growth of primordial follicles, which consists of an increase in the oocyte diameter,

proliferation of granulosa cells and transformation of the format of these cells from flat to cubic (Silva et al., 2006). Given the results previously presented, in which it was observed no difference ($P>0.05$) in the percentage of follicular activation of preantral follicles cultured for one or seven days, with different media, it was expected a reduction or maintenance of oocyte diameter, which actually happened in all cultures, except in the medium containing T_4 /FSH (20/10ng/mL).

In domestic animals, FSH has the property of increasing the oocyte diameter and promoting the growth of preantral follicles, as well as stimulating the antrum formation and estrogen secretion (Cecconi et al., 1999; Silva et al., 2006). However, some authors reported that the presence of FSH in the *in vitro* culture medium induces an increase of the follicular diameter and antrum formation, but not of the oocyte growth (Gutierrez et al., 2000). However, the T_4 /FSH (20/10ng/mL) association, evaluated in this experiment, was not able to increase the oocyte diameter after seven days of culture. However, this culture medium enabled a greater follicular diameter after the culture, when compared to the other media. These results corroborate with Arunakumari et al. (2010), who verified that the association of FSH with T_4 , although not promoting oocyte maturation, contributes to a significant increase for antrum formation, growth and ovulation of preantral follicles.

By comparing the media individually in accordance with the progression of the days of culture, from one to seven, there was a reduction in oocyte and follicular diameter with the use of the medium supplemented with IGF-I/FSH (100/10ng/mL). However, the medium containing T_4 /IGF-I (10/100ng/mL) showed an increase in oocyte diameter. From the results found it can be suggested that IGF-I has a relevant participation in the increase of follicular diameter, corroborating the results found earlier by Demeestere et al. (2005) and Martins et al. (2010). This effect seems to be linked to an increase of the mitotic rate of granulosa cells and an increase in oocyte size. Furthermore, it was demonstrated that IGF-I has a participation in the increase of DNA content, promoting functional integrity and stimulating steroidogenesis during the culture of preantral follicles of mice (Demeestere et al., 2005).

The increase in the follicular diameter due to the stimulation by IGF-I, in preantral follicles, has been shown in other species, like rats (Zhao et al., 2001) and cattle (Thomas et al., 2007). However, although it has a stimulatory effect on early follicular growth, McCaffery et al. (2000) highlighted the importance of the regulation mechanism, since, in cattle, inadequate exposure of preantral follicles to IGF-I has a

negative effect on oocyte development. However, despite the beneficial effect shown in this study, there are still few studies regarding the issue, and the real role of IGF-I in the development of preantral follicles remains unclear.

According to Matos et al. (2007), ultrastructural evaluation is an efficient method for evaluating the morphodynamics of the ovarian follicle and can be considered an essential assessment to predict follicular quality after the *in vitro* culture of preantral follicles. Thus, after the evaluation by the transmission electron microscopy used in this work it can be seen that the follicles of the cultured control, as well as the cultured for seven days in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL) presented similar characteristics to the control, characterizing them as morphologically normal structurally. This fact can also be confirmed by comparing the characteristics found in the present study to those described by Magalhães et al. (2009), Celestino et al. (2009) and Lima et al. (2012), who outlined standards of normality and atresia to caprine preantral follicles cultured *in vitro*.

Conclusions

The results found in this study permit to conclude that the addition of T₄ associated with FSH is beneficial for the *in vitro* development of preantral follicles of goats. Among the evaluated concentrations, the medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL) showed the best results, when survival, growth and ultrastructural aspects of caprine preantral follicles cultured *in vitro* for one and seven days were evaluated.

Acknowledgements

To CNPq for the financial support to the research. To CAPES for providing the scholarship to the Doctorate student. To the core of Microscopy and Microanalysis of UFV for the support in the ultrastructural analysis.

References

- Arunakumari, G.; Vagdevi, R.; Rao, B. S.; Naik, B. R.; Naidu, K. S.; Kumar, R. V. S. et al. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Ruminant Res*, v.70, p. 93–100, 2007.
- Arunakumari, G.; Shanmugasundaram, N.; Rao, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v.74, p. 884–894, 2010.
- Cecconi, S.; Barboni, B.; Coccia, M.; Mattioli, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- Cecconi, S.; Rossi, G.; Coticchio, G.; Maccharelli, G.; Borini, A.; Canipari, R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development *in vitro*. *Fertil Steril*, v. 81, p. 919–924, 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* vol.16, p.239-246, 2009.
- Celestino, J.J.H., J.B. Bruno, I.B. Lima-Verde, M.H.T. Matos, M.V.A. Saraiva, R.N. Chaves, F.S. Martins, A.P. Almeida, R.M.S. Cunha, L.F. Lima, K.O. Name, C.C. Campello, J.R.V. Silva, S.N. Bão, J.R. Figueiredo. Steady-state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v. 77, p. 231-240, 2010.
- Chaves, R.N., F.S. Martins, M.V. Saraiva, J.J. Celestino, C.A. Lopes, J.C. Correia, I.B. Verde, M.H. Matos, S.N. Bão, K.P. Name, C.C. Campello, J.R.V. Silva, J.R. Figueiredo. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, v. 20, p. 640-647, 2008.

Cheng, S.Y.; Leonard, J.L.; Davis, P.J. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews*, vol. 31(2), p.139–170, 2010.

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

Donato, M.A.M., K.L.A. Saraiva, A.K.S. Silva, M.I. Wanderley, C.A. Peixoto. Follicle development and luteal cell morphology altered by phosphodiesterase-5 inhibitor. *Micron*, v. 40, p. 845-850, 2009.

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

Fouladi-Nashta, A. A & Campbell, K. H. S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction*, v. 131, p. 449-460, 2006.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine antral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 62, p.1322–1328, 2000.

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

Lima, I.M.T.; Celestino, J.J.H.; Faustino, L.R.; Magalhães-Padilha, D.M.; Rossetto, R.; Brito, I.R.; Donato, M.A.M.; Lopes, C.A.P.; Campello, C.C.; Peixoto, C.A.; Figueiredo, J.R.; Rodrigues, A.P.R. Dynamic Medium Containing Kit Ligand and Follicle Stimulating Hormone Promotes Follicular Survival, Activation and Growth During Long-Term *In Vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. *Cells Tissues Organs*, v.195, p.260-271, 2012.

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

Louhio, H.; Hovatta, O.; Sjoberg, J.; Tuuri, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod*, v.6, p. 694–698, 2000.

Magalhães, D.M.; Araujo, V.R.; Lima-Verde, I.B.; Matos, M.H.T.; Silva, R.C.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v.46(5), p.378-386, 2009.

Mao et al., Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation *In Vitro*. *Biology of Reproduction*, 67, 1197–1203, 2002.

Martins, F.S.; Van den Hurk, R.; Santos, R.R.; Silva, J.R.V.; Matos, M.H.T.; Celestino, J.J.H.; Rodrigues, A.P.R.; Pessoa, C.; Ferreira, F.V.A.; Figueiredo, J.R. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Anim. Reprod.* Vol.2(2), p.106-113, 2005.

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 F.S. *Braz J Med Biol Res*, V.43(8), p.728-736, 2010. doi: 10.1590/S0100-879X2010007500066

Matos, M. H. T., I. B. Lima-Verde, M. C. A. Luque, J. E. Maia, J. R. V. Silva, J. J. H. Celestino, F. S. Martins, S. N. Bao, C. M. Lucci, J. R. Figueiredo. 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*, vol.63, p.267–273, 2000.

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. *Biol Reprod*, v. 68, p.1682–1686, 2003.

Picton, H. M.; Harris, S. E.; Muruvi, W.; Chambers, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, p. 703-715, 2008.

Poppe, K.; Velkeniers, B.; Glinoer, D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nature Clinical Practice - Endocrinology & Metabolism*. V.4, N. 7 p.394-405, 2008.

Rajarajan, K.; Rao, B.S.; Vagdevi, R.; Tamilmani, G.; Arunakumari,G.; Sreenu, M.; Amarnath, D.; Naik, B.R.; Rao, V.H. Influence of various growth factors on *in vitro* development of goat preantral follicles. *Small Rumin Res*, vol.63, p.204–212, 2006.

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

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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.4, p.206-221, 2010a.

Saraiva, M.V.A.; Celestino, J.J.H.; Araújo, V.R.; Chaves, R.N.; Almeida, A.P.; Lima-Verde, I.B.; Duarte, A.B.G.; Silva, G.M.; Martins, F.S.; Bruno, J.B.; Matos, M.H.T.; Campello, C.C.; Silva, J.R.V.; Figueiredo, J.R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, p. 1-10, 2010b.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Serakides, R.; Nunes, V. A.; Nascimento, E.; Ribeiro, A. F. C.; Silva C. M.; Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. Arquivo Brasileiro de Endocrinology e Metabologia, v. 45, p. 258-264, 2001.

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.

Silva, J.R.V.; Tharasanit, T.; Taverne, M.A.M.; Van der Weijden, G.C.; Santos, R.R.; Figueiredo, J.R.; Van den Hurk, R. The activin-follistatin system and *in vitro* esrly development in goats. J. Endocrinol. Vol. 189, p.113-125, 2006.

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.

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 vol.133, p.1121–1128, 2007.

Webb, R.; Garnsworth, P. C.; Gong, J. G.; Armstrong, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. J Anim Sci, p. 63-74, 2004.

Zhao, J.; Dorland, M.; Taverne, M.A.M.; Van der Weijden, G.C.; Bevers, M.M.; Van den Hurk, R. *In vitro* culture of rat preantral follicles with emphasis on follicular interactions. Molec Reprod Dev, vol.55, p.65–74, 2000.

Zhao, J.; Tavene, M.A.M.; Van der Weijden, G.C.; Bevers, M.M and Van Den Hurk, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. Mol Reprod Develop, v.58, p. 287–296, 2001.

13. CAPÍTULO VII (Fase III)

Meio contendo Hormônio Folículo Estimulante Humano (hFSH) e Tiroxina (T_4) mantém a sobrevivência e promove o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos em cultivo de longa duração

(Medium containing Human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) and Thyroxine (T_4) maintains the survival and promotes in vitro growth of caprine preantral follicles in long duration culture)

Meio contendo Hormônio Folículo Estimulante Humano (hFSH) e Tiroxina (T₄) mantém a sobrevivência e promove o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos em cultivo de longa duração

(Medium containing Human Follicle Stimulating Hormone (hFSH) and Thyroxine (T₄) maintains the survival and promotes in vitro growth of caprine preantral follicles in long duration culture)

Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar a influência da interação do FSH humano (10 ng/mL) com T₄ (20 ng/mL) na sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, por um período de longa duração (28 dias). Pequenos fragmentos de tecido ovariano não cultivado e cultivados foram processados para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram uma redução na taxa de sobrevivência de folículos em todos os meios testados (um a 28 dias) quando comparado ao controle fresco. Entretanto T₄(20)/FSH(10) manteve a taxa de semelhante ao controle, após sete dias de cultivo. Os meios testados por um e 28 dias, reduziram o percentual de folículos primordiais em todos os períodos de cultivo. Contudo, o meio contendo T₄(20)/FSH(10) no dia um de cultivo manteve-se semelhante ao controle fresco. Entretanto nenhum dos meios testados foram capazes de manter o percentual dos folículos em desenvolvimento. Observou-se que o diâmetro folicular no meio com T₄(20)/FSH(10) manteve-se semelhante ao controle fresco. As análises ultraestruturais confirmaram a integridade de folículos cultivados por sete dias em meio acrescido de T₄(20)/FSH(10). Em conclusão, o meio com T₄(20)/FSH(10) é capaz de manter a sobrevivência, promover a ativação dos folículos primordiais e manter a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos, quando cultivados *in vitro* por até sete dias.

Palavras-chave: Ativação, caprino, folículos pré-antrais, hFSH, T₄.

Abstract

The aim of this study was to investigate the influence of the interaction of human FSH (10 ng/ml) with T₄ (20 ng/mL) on survival, activation and growth of preantral follicles cultured *in vitro*, for a period of long duration (28 days). Small fragments of non-cultured and cultured ovarian tissue were processed for classic histology and transmission electron microscopy. The results showed a reduction in the survival rate of follicles in all the media tested (one to 28 days) when compared to the fresh control. However T₄(20)/FSH(10) maintained the rate similar to the control, after seven days of culture. The media tested by one and 28 days reduced the percentage of primordial follicles in all periods of culture. However, the medium containing T₄(20)/FSH(10) on day one of culture remained similar to the fresh control. However none of the tested media were able to keep the percentage of the developing follicles. It was observed that the follicular diameter in the medium with T₄(20)/FSH(10) remained similar to the fresh control. The ultrastructural analysis confirmed the integrity of follicles cultured for seven days in a medium supplemented with T₄(20)/FSH(10). In conclusion, the medium with T₄(20)/FSH(10) is able to maintain the survival, promote the activation of primordial follicles and maintain the ultrastructural integrity of caprine preantral follicles when cultured *in vitro* for until seven days.

Keywords: Activation, caprine, preantral follicles, FSH, T₄.

Introduction

The limitation in the supply of fertilizable mature oocytes represents an important obstacle to increase the success of assisted reproduction techniques. Accordingly, the use of *in vitro* oocytes of cultured and matured follicles is an alternative to the improvement of these techniques (Telfer et al., 2008). Over the last decades, some advances have been achieved during the *in vitro* culture of preantral follicles. However the rate of embryo production is still low in domestic animals (Arunakumari et al., 2010; Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011). This low efficiency can be caused by the composition of the media used during the culture

period. These are unable to withstand the constant evolution of the developing follicle needs (Peng et al., 2010).

During the reproductive life of the female, a large number of primordial follicles are stimulated to grow, in a process known as follicular activation, and the vast majority (99.9%) can become atretic before ovulation (Skinner, 2005). Despite the high rate of atresia that occurs in primordial follicles during *in vivo* growth and during maturation, these can be a valuable source for studies about the *in vitro* development of oocytes and the production of embryos (Carroll et al., 1990; O'Brien et al., 2003). However, until recently, little is known about how the primordial follicles are activated and stimulated to grow and develop. Furthermore, it is known that, in domestic mammals, early follicular development follows a very rigorous and complex process (Gougeon, 1996). Therefore, a long period of culture may be required for the development of preantral follicles. However, few studies of long-term *in vitro* culture have obtained follicular activation rates (sheep: Muruvi et al., 2005; human: Sadeu et al., 2006; goat: Rossetto et al., 2009). This may be related to the use of simple culture media, without the addition of a series of growth factors or hormones that can satisfy the demands required by the follicles during the different stages of growth.

Among the most commonly used hormones in the culture media the Follicle Stimulating Hormone (FSH) outstands for its role in early folliculogenesis in mammals. FSH is a gonadotropin known for regulating the proliferation and differentiation of granulosa cells during the beginning (antral) of *in vivo* follicle development (Gutierrez et al., 1997; Hillier, 2001). In goats, the addition of 50 ng/ml of FSH to the culture medium of preantral follicles maintained the survival and ultrastructural integrity of the follicles (Matos et al., 2007).

The Thyroxine hormone (T_4) has also been noted for its participation in the fertility of mammals (Cecconi et al., 2004). The effects of these hormones on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis are related to the differentiation of granulosa cells (Silva et al., 2004) and stimulation of ovulation (Serakides et al., 2001). Researches have confirmed that the addition of FSH and T_3 to the *in vitro* culture medium promotes the growth of preantral follicles and that this interaction is mediated through the increase in the expression of mRNA to FSH receptors (rFSH) through a GDF-9 dependent mechanism. It is believed that these two hormones (FSH and T_3) interact synergistically inhibiting the apoptosis of granulosa cells in small preantral follicles (Asahara et al., 2003).

The present study was designed with the aim to investigate the influence of the interaction between human FSH (10 ng/mL) and T₄ (20 ng/ml) on the survival, activation and growth of preantral follicles cultured *in vitro*, for a long duration period (28 days). These concentrations were selected considering previous studies conducted by our team, which showed promising results with the use of these hormones.

Material e Métodos

Source of ovaries

Ovaries (n = 10) from 5 adult non-pregnant mixed-breed goats (1-3 years of age) were collected from a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds and then washed again in MEM supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported to the laboratory in MEM at 4 °C within 1 h postmortem (Chaves et al., 2008). Unless otherwise mentioned, human FSH (hFSH), Thyroxine and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Experimental protocol

The organ culture system utilized herein was previously described in detail (Matos et al., 2007; Celestino et al., 2010). In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments. Subsequently, ovarian cortex tissue samples from each ovarian pair were cut into 9 slices (approximate size: 3 x 3 mm, with 1 mm thickness) using a scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either fixed for histological and ultrastructural analysis (fresh control) or placed in culture for 1 (d1), 7 (d7), 14 (d14), 21 (d21) and 28 (d28) days. Caprine tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 1 mL of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator and all the media were incubated for 1 hour prior to use. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2 to 7.4) supplemented with ITS (10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), which was called α -MEM⁺ (culture control).

For the experimental conditions, the ovarian cortex fragments were cultured in α -MEM+ alone (culture control) and α -MEM+ supplemented with concentrations of hFSH (10 ng/mL) in association T_4 (20 ng/mL) as showed in the Table 1. Each treatment was repeated five times and the culture media was changed every 2 days.

Table 1. Different means tested during *in vitro* culture of long duration

Culture medium	Abbreviation
α -MEM ⁺ (culture control for 1, 7, 14, 21 and 28 days)	α -MEM ⁺
α -MEM ⁺ (T_4 + FSH for 1, 7, 14, 21 and 28 days)	T_4 /FSH

Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

Before culture (fresh control) and after 1, 7, 14, 21 and 28 days in culture, all tissue pieces were fixed in Carnoy's solution for four hours and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), the caprine ovarian cortex tissues were cut into 7 μ m sections, which were mounted on glass slides and stained by Periodic Acid Schiff (PAS) - hematoxylin. Follicle stage and morphology were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined by a microscope (Olympus, Japan) under 400x magnification.

The developmental stages of follicles have been defined previously (Silva et al., 2004) as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened and cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells; and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). Only the preantral follicles (primordial, intermediate, primary and secondary) were considered in the analysis, and the antral stage was not included because of the very small number of antral follicles present in the ovarian fragments. The preantral follicles were also classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and lacked a pyknotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall,

150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x five repetitions = 150 follicles).

To evaluate follicular activation, the percentages of healthy primordial and growing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in each medium. In addition, follicle and oocyte diameters were measured in healthy follicles only. Follicle diameter was recorded from edge to edge of the outer layer of granulosa cells or from the outside edge of the theca cell layer when present. Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded in each measurement and the average of these two values was calculated. Each follicle was examined in every section in which it appeared and matched with the same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once.

Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles

To better evaluate follicular morphology, ultrastructural analysis was performed on preantral follicles from non-cultured tissue (fresh control), follicles cultured in the treatments that had the best results for morphology, activation and growth. Briefly, small pieces (1 mm³) of caprine ovarian tissues were fixed for 4 hours at room temperature in karnovsky fixative (2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2). After fixation, the samples were washed twice in 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 resin. Afterwards, semi-thin sections (3 µm) were cut using an ultramicrotome (MT2-B, Sorvall, USA), stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy under 400x magnification. Ultra-thin sections (60 to 70 nm) were obtained from preantral follicles classified as morphologically normal in semi-thin sections, according to the criteria adopted for histological analysis. Subsequently, ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a transmission electron microscope EM 109 Zeiss (EM, Berlin, Germany) operating at 80 Kv (Donato et al., 2009). Parameters such as the density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, vacuolization and integrity of the basement membrane were evaluated.

Statistical analysis

The variables were submitted to Normality (Lilliefors) and Homoscedasticity (Cochran) tests and posteriorly to the analysis of variance at a probability of 5%. In case a significance was presented, the Tukey test was carried out (PROC ANOVA; SAS, 2002).

Results

Caprine preantral follicle survival before and after in vitro culture

A total of 1,650 preantral follicles were analyzed by classic histology. Figures 1A, B and C show normal follicles from the fresh control and after the culture in α -MEM⁺ supplemented with T₄/FSH (day seven) or T₄/FSH (day 14), respectively. Figures 1D, E and F illustrate degenerated follicles after the culture in α -MEM⁺ (cultured control, day 28) or in media containing T₄/FSH (day 21) or T₄/FSH (day 28), respectively. In degenerated follicles retracted oocytes and disorganization of granulosa cells were observed.

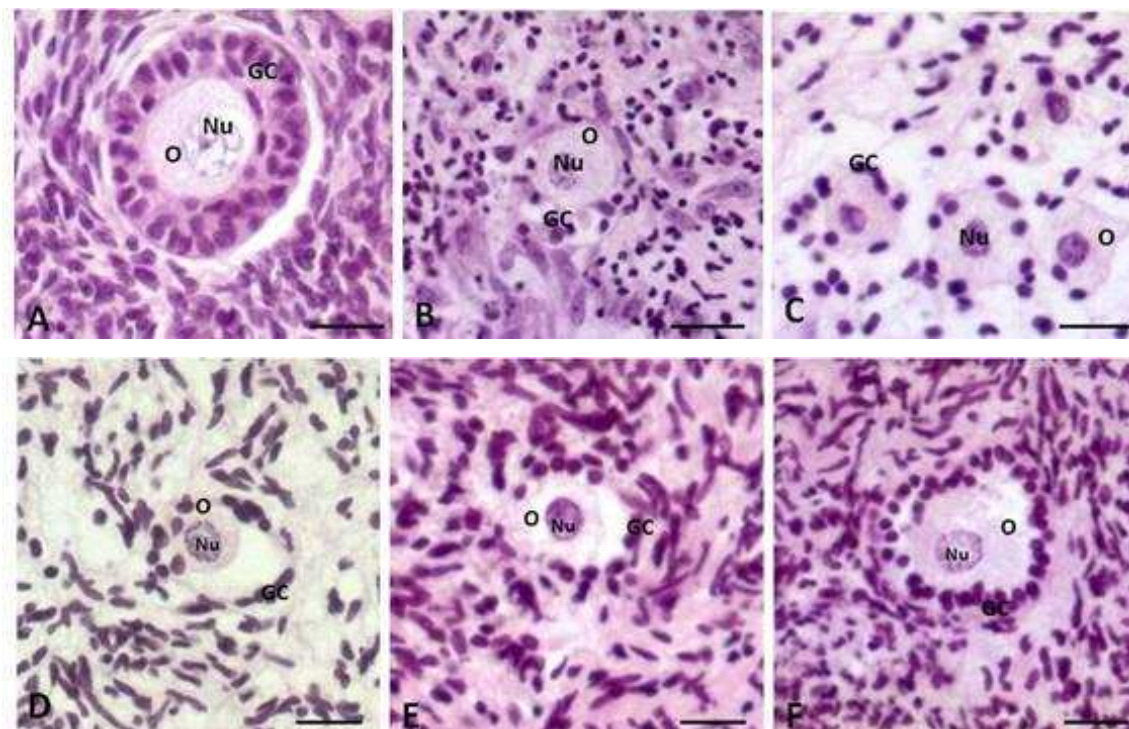


Figure 1. Histological sections of ovarian fragments tissue after staining Periodic Acid-Schiff's hematoxylin showing morphologically normal follicles (A, fresh control), (B, T₄/FSH - D7) e (C, T₄/FSH - D14). The degenerate follicles were represented in the letters (D, α -MEM⁺ - D28); (E, T₄/FSH - D21) e (F, T₄/FSH - D28). O: oocyte, Nu: nucleus oocyte, GC: granulosa cells (Original magnification 200×). Scale bars represent 20 μ m.

The percentages of morphologically normal preantral follicles in the fresh control and after one, seven, 14, 21 and 28 days of *in vitro* culture are shown in Table 2. In relation to the progression of culture from one to 28 days, there was a reduction ($P < 0.05$) in the percentage of morphologically normal follicles in almost all treatments, compared to the fresh control (97.3%). However, with seven days of culture, the medium supplemented with T₄/FSH (20/10ng/mL, $P > 0.05$), showed a rate of normal follicles similar to the non-cultured control.

When the α -MEM⁺ medium (cultured control) and the medium containing T₄/FSH were compared among themselves, for one to 28 days of culture, there was no difference ($P > 0.05$) in the percentage of normal follicles. With the progression of the culture from one to 28 days, all media were able to maintain ($P > 0.05$) the percentage of

normal follicles during 21 days. However, the rate of normal follicles reduced when extending the culture for 28 days ($P < 0.05$).

Table 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1, 7, 14, 21 or 28 days in the absence or presence of T_4 /FSH (concentrations in ng/mL).

Treatments					
Control	97,3 $\pm$ 1,1				
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
α -MEM ⁺	83,3 $\pm$ 2,0 ^{*aA}	82,7 $\pm$ 1,9 ^{*bA}	78,0 $\pm$ 2,6 ^{*aAB}	80,7 $\pm$ 1,6 ^{*aA}	66,7 $\pm$ 4,6 ^{*aB}
$T_{4(20)}/FSH_{(10)}$	90,0 $\pm$ 0,0 ^{*aA}	90,7 $\pm$ 1,6 ^{bA}	80,7 $\pm$ 4,5 ^{*aAB}	72,7 $\pm$ 2,6 ^{*aAB}	66,0 $\pm$ 6,2 ^{*aB}

*Differs significantly from control follicles ($P < 0.05$); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture ($P < 0.05$); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P < 0.05$).

Activation of primordial follicles of goats after the in vitro culture

The percentages of primordial and developing follicles in fresh ovarian tissue were 71.3% and 31.3%, respectively (Table 3). After one, seven, 14, 21 and 28 days of culture, there was a reduction in this rate ($P < 0.05$) in all media used, except in the one that contained T_4 /FSH (20/10ng/mL, $P > 0.05$) on day 1 of culture compared to the non-cultured control in primordial follicles. However, the rates of developing follicles of all media were similar to the non-cultured control ($P > 0.05$), regardless of the time of culture. When the media were compared among themselves, no difference ($P > 0.05$) was observed in both rates of primordial and developing follicles. With the progression of the culture period from one to 28 days, no differences in the percentages of primordial and developing follicles were observed ($P > 0.05$).

Table 3. Percentage (mean $\pm$ SEM) of primordial follicles and developing (intermediate, primary and secondary) in control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1, 7, 14, 21 or 28 days in the absence or presence of T₄/FSH (concentrations in ng/mL).

Primordial follicles

Treatments						
Control	71,3 $\pm$ 4,2					
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	
α -MEM ⁺	42,7 $\pm$ 5,9 ^{*aA}	34,7 $\pm$ 3,9 ^{*aA}	42,0 $\pm$ 3,9 ^{*aA}	32,0 $\pm$ 2,6 ^{*aA}	38,0 $\pm$ 3,3 ^{*aA}	
T ₄ (20)/FSH ₍₁₀₎	48,7 $\pm$ 6,1 ^{aA}	38,0 $\pm$ 8,1 ^{*aA}	44,7 $\pm$ 8,4 ^{*aA}	38,0 $\pm$ 4,4 ^{*aA}	33,3 $\pm$ 7,9 ^{*aA}	

Developing follicles

Treatments						
Control	31,3 $\pm$ 7,4					
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	
α -MEM ⁺	40,7 $\pm$ 7,1 ^{aA}	48,0 $\pm$ 3,8 ^{aA}	36,0 $\pm$ 4,7 ^{aA}	48,7 $\pm$ 3,7 ^{aA}	28,7 $\pm$ 3,2 ^{aA}	
T ₄ (20)/FSH ₍₁₀₎	41,3 $\pm$ 6,1 ^{aA}	52,7 $\pm$ 9,4 ^{aA}	36,0 $\pm$ 8,1 ^{aA}	34,7 $\pm$ 3,3 ^{aA}	32,7 $\pm$ 8,6 ^{aA}	

*Differs significantly from control follicles (P<0.05); ^{a,b} differs significantly among concentrations in each day of culture (P<0.05); ^{A,B} differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment (P<0.05).

In vitro growth of caprine preantral follicles

According to Table 4, there was a reduction in the oocyte diameter (P<0.05) throughout the culture in all media used, except when the follicles were cultured for one day in medium supplemented with T₄/FSH. However, the α -MEM⁺ (cultured control) on day one of culture and the supplemented with T₄/FSH cultured up to seven days media

maintained the follicular diameter ($P>0.05$) when compared to the non-cultured control. When the media were compared among themselves, there was no difference ($P>0.05$) in oocyte and follicle diameters. With the progression of culture from one to seven days, the α -MEM⁺ and the supplemented with T₄/FSH media maintained oocyte and follicular diameter ($P>0.05$), occurring later a reduction of both, when extending the culture up to 28 days.

Table 4. Caprine oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1, 7, 14, 21 or 28 days in the absence or presence of interaction T₄/FSH (concentrations in ng/mL).

Oocyte diameter (μ m)						
Treatments						
Control	26,0 $\pm$ 0,6					
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	
α -MEM ⁺	24,2 $\pm$ 0,8 ^{aA}	22,7 $\pm$ 0,7 ^{*aAB}	21,2 $\pm$ 0,6 ^{*aB}	20,8 $\pm$ 1,0 ^{*aB}	20,3 $\pm$ 0,5 ^{*aB}	
T ₄ (20)/FSH ₍₁₀₎	24,7 $\pm$ 0,8 ^{aA}	23,7 $\pm$ 0,6 ^{*aAB}	20,7 $\pm$ 0,8 ^{*aBC}	21,7 $\pm$ 0,9 ^{*aBC}	19,6 $\pm$ 0,6 ^{*aC}	

Follicle diameter (μ m)						
Treatments						
Control	33,4 $\pm$ 0,8					
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	
α -MEM ⁺	32,5 $\pm$ 1,2 ^{aA}	30,2 $\pm$ 1,2 ^{*aAB}	27,8 $\pm$ 0,7 ^{*aB}	27,8 $\pm$ 1,3 ^{*aB}	27,6 $\pm$ 0,7 ^{*aB}	
T ₄ (20)/FSH ₍₁₀₎	33,2 $\pm$ 1,0 ^{aA}	30,7 $\pm$ 0,7 ^{aAB}	27,5 $\pm$ 0,9 ^{*aBC}	29,0 $\pm$ 1,1 ^{*aB}	25,5 $\pm$ 0,6 ^{*aC}	

*Differs significantly from control follicles ($P<0.05$); ⁺ compared with α -MEM⁺ ($P<0.05$); ^{a,b}differs significantly among concentrations in each day of culture ($P<0.05$); ^{A,B}differs significantly with the progression of the culture period from day 1 to 7 in the same treatment ($P<0.05$).

Ultrastructural features of caprine preantral follicles

The ultrastructural analysis was performed in preantral follicles of the non-cultured control and of follicles cultured for one and seven days in medium with T₄/FSH (20/10ng/mL). This medium with hormones was selected for presenting satisfactory results on the parameters evaluated by the histological analysis.

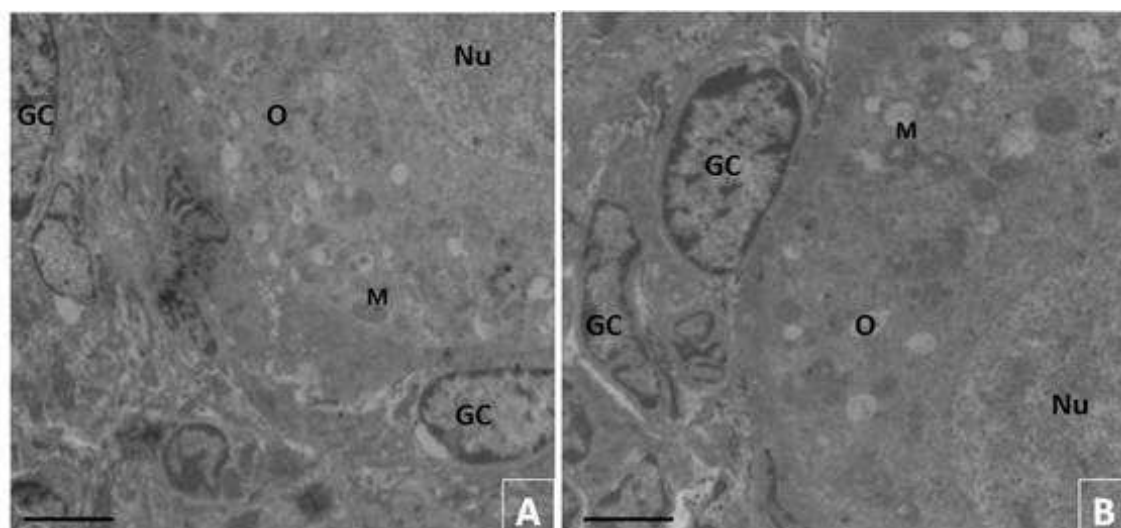


Figure 2. Ultrastructural analysis of preantral follicles from fresh control (A, 3.000x) and cultured for seven days (B, 4.400x) in medium containing T₄/FSH (20/10ng/mL). Note homogeneous cytoplasm and mitochondria rounded, characteristic of the fresh control follicles (A and B). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells; M: mitochondria. (A and B = 5 µm).

The follicles of the non-cultured control revealed an intact nuclear envelope, with a large oocyte nucleus. Moreover, organelles, particularly the mitochondria and endoplasmic reticulum, were uniformly distributed in the cytoplasm. The granulosa cells were well organized around the oocyte (Fig. 3A). When cultured for seven days in medium with T₄/FSH (20/10ng/mL, Fig 3B) the ultrastructural characteristics of the follicles were similar to the non-cultured control, showing ultrastructural normality in the oocytes, basal membranes, nuclear envelope, as well as in the large oocyte nucleus (Fig. 3A and 3B, respectively). In addition, the follicles exhibited uniformly distributed organelles in the cytoplasm, particularly the endoplasmic reticulum and the

mitochondria. The granulosa cells were normal and well organized around the oocyte, presenting also a large and elongated nucleus (Fig. 3B).

Discussion

The addition of hormones and growth factors is essential to the success of *in vitro* culture of preantral follicles (PAF) of domestic animals as demonstrated by several authors (Figueiredo et al., 2008; Jewgenow et al., 1998; Wu & Tian., 2007; Arunakumari et al., 2010; Magalhães et al., 2011). In this context, the development of an *in vitro* culture system is fundamental for the achievement of a greater number of oocytes included in preantral follicles (Figueiredo et al., 2008). Therefore, a better comprehension of the different substances that regulate follicular and oocyte development is fundamentally important for the success of *in vitro* culture systems, with the final objective of producing a greater number of viable embryos.

There are several hormones and growth factors that are tested and used in experiments at the present time. In this study the Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Thyroxine (T_4) were used. FSH is outstanding for carrying out an important participation in early folliculogenesis in mammals, in addition to stimulating the growth, survival and antrum formation in *in vitro* culture systems (Cortvrindt et al., 1997). The thyroid hormones, T_3 and T_4 , demonstrated the capacity to influence in cell differentiation and in the formation of the follicular antrum in PAF submitted to *in vitro* culture (Guyton & Hall, 2006). The association of thyroid hormones with FSH demonstrated in other opportunities to be effective in *in vitro* development of preantral follicles of rats (Kobayashi et al., 2009) and in the development, antrum formation and ovulation of sheep PAF cultured *in vitro* (Arunakumari et al., 2010). This association was also beneficial in the present study, from the evidence that this association (FSH + T_4) showed a satisfactory effect by keeping the oocyte diameter after 1 day of culture and promote the activation of primordial follicles on days 1, 7, 14, 21 and 28 of culture.

When analyzing the survival rate of the cultured preantral follicles in the present work, we note that the group cultured in the α -MEM⁺ medium supplemented with the hormones T_4 /FSH practically maintained the survival rate of the follicles when compared to the α -MEM⁺ medium without supplementation, during the culture for seven, 14, 21 and 28 days. These data corroborate those found by Alves (2012) that using a similar culture medium, maintained the follicular survival for a period of eight

days. Apparently the α -MEM⁺ allows follicular survival considering that it is a compound constituted of amino acids and vitamins, essential for follicular development (Colonna & Mangia, 1983; Rossetto et al., 2009). Additionally, the enrichment of this medium with the hormones T₄ and FSH may contribute even more to the follicular development and survival, due to the direct effect of these in either the stimulation of granulosa cells and growth factors as in the proliferation of FSH and LH receptors and in follicular maturation (Cecconi et al., 2004; Rajarajan et al., 2006; Magalhães et al., 2009a).

During the day 7 (D7) of culture it was possible to observe that this supplemented medium (α -MEM⁺ + T₄ + FSH) was also able to maintain the viability rate of the follicles when compared to the non-cultured control. This situation can be explained due to the latency period of the T₄ hormone, as it is believed that it stays in a latency period of 2 to 3 days after its administration, and its action reaches its maximum peak after 10 days of culture (Guyton & Hall, 2006). Therefore, due to the delay in the activation of this hormone, the positive effect of the association T₄/FSH can be noted only on the 7th day of culture.

However, when comparing the culture progression of the media used in our study, it was verified that the percentage of normal follicles significantly reduced (P<0.05) from D21 to D28 and from D7 to D28 days, in the α -MEM⁺ and T₄/FSH media, respectively. When working with long duration cultures, it should be emphasized that this type of culture has some limitations in relation to survival, growth and differentiation of preantral follicles due to the prolonged culture period. However, it has been found that the addition of substances to the medium can contribute to the improvement of the survival rates after the culture. It is believed that during long culture periods of preantral follicles, the addition of antioxidant substances to the culture medium, such as ascorbic acid, is essential to maintain cellular integrity (Rossetto et al., 2009). This author also reports that the combination of FSH and ascorbic acid is able to promote a synergetic effect providing a significant increase in oocyte and follicular diameter after seven days of culture. Therefore, the reduction of viable follicles from day 21 to 28 of culture observed in our work could be avoided by adding some substance with a similar effect to the described.

Moreover, as found in other studies, the low concentration of FSH used in the present study may have made the follicular survival unviable during a prolonged period of culture. This fact can be previously verified by other researchers, as Silva et al.

(2004), who found no significant effect of FSH on the survival of follicles after 5 days of culture, possibly due to a high concentration of FSH (100ng/mL) used. Conversely, Matos et al. (2007) were able to maintain follicular survival after seven days of culture with the addition of 50ng/mL of FSH to the culture medium. Therefore, we can evaluate that the concentration of FSH used in this study was sufficient to maintain the survival until the seventh day of culture, however, it is suggested that after this period this concentration was insufficient, because it was not able to maintain follicular survival in the long duration culture.

Different results obtained using FSH in the culture of preantral follicles can be justified due, especially, to its origin and purity level. Despite the use of FSH from the pituitary extract of domestic species such as pigs (pFSH) and sheep (oFSH) as well as of humans (hFSH) in several studies, it is believed that the recombinant FSH (rFSH) produced from the recombinant DNA technique is the purest and most homogeneous (Magalhães et al., 2009b). However, its high cost makes its use in scientific research unviable. It is believed that due to the use of hFSH in the present work, the results achieved in the long duration cultures may have been damaged, mainly by its purity level and heterogeneity, that directly interfere in cultures for prolonged periods.

The follicular activation is measured by the ability of differentiation of granulosa cells, resulting in the transition of primordial follicles to intermediate, primary, and secondary follicles (Vitt et al., 2000). However, the knowledge about the factors and mechanisms involved in the activation of primordial follicles is scarce, mainly because of the difficulty of isolating these follicles (Campbell, 2009). The evidence of follicular activation in preantral follicles cultured *in vitro* is noted for the reduction of the number of primordial follicles and consequent increase of developing follicles along the days of culture (Martins et al., 2010; Saraiva et al., 2010b). In all media tested in this study (α -MEM⁺ and T₄/FSH) there was activation of primordial follicles on days 1, 7, 14, 21 and 28 of culture, except on day 1 of the T₄/FSH medium. This fact can be observed by the reduction of primordial follicles compared to the control, however, a concomitant increase in developing follicles throughout the days of culture that was expected did not occur, since in all treatment the rates of developing follicles were similar to the non-cultured control. These findings disagree with the one found by Matos et al. (2007), in which by working with the same concentration of FSH (10 ng/mL), they observed that there was not a reduction of primordial follicles and concomitant increase of developing follicles on day 1 of culture. However, at higher concentrations (50 and 100 ng/mL),

this author obtained results similar to ours. However, the source of FSH used differed between studies, in the work in question the porcine FSH was used, different from that used in our work, human FSH.

Nevertheless, in the present study despite the reduction of primordial follicles during all days of culture, the increase in the developing follicles was not observed on any day of culture, in any researched media. Thus, it can be inferred that none of the tested media were able to sustain follicular activation initiated by them in primordial follicles on days 1, 7, 14, 21 and 28 of culture, mainly by the similarity between the rates of developing follicles to the non-cultured control and the media tested during all days of culture. These results contradict with the results of Matos et al. (2007), in which after seven days of culture, the follicles maintained their development. Combining our data with follicular survival, herein presented, we suggest that the development of the follicles in question was not continuous after the 1st day of culture due to the rise of their mortality rate.

Despite the considerable anti apoptotic effect of gonadotropic hormones (LH and FSH) (Markstrom et al., 2002) mediated by the action of IGF-I (Chun et al., 1994), in our study it was not possible to observe their activation and development after day 1 of culture, reflecting in high mortality rates in the tested media and similarity between the developing follicles to the non-cultured control and α -MEM⁺ and T₄/FSH media. This may have occurred due to the gaseous atmosphere of the culture kiln by not providing a suitable environment for the culture of the follicles. Furthermore, it is possible that the proposed media were not totally sufficient to supplement and sustain the development of the follicles, since the growth factors and hormones are fundamental for the development of the follicle in each stage of its development and occasionally small differences of concentrations or synergism between the two hormones can negatively contribute to follicular survival.

In relation to the diameter of the oocyte and the follicle, none of the tested media were capable of maintaining the growth of the follicles through the culture, except for α -MEM⁺ on day 1 of culture, and T₄/FSH on days 1 and 7 of culture. In contrast, studies have already proved that the addition of FSH to the culture medium was able to promote the increase of preantral follicles cultured *in vitro* (Itoh et al., 2002; Matos et al., 2007; Arunakumari et al., 2010). In the presence of 10 and 50 ng/mL of FSH, Matos et al. (2007) observed an increase in the diameter of both the oocyte and the caprine follicle on day 7 of culture. Itoh et al. (2002) also demonstrated that 50ng/mL of FSH increased

both the diameter of the oocyte and of bovine follicles cultured for 13 days. These authors are based on the concept of the existence of FSH receptors during the progressive development of PAF, in both the transition from primordial to primary follicles and to secondary follicles (Oktay et al., 1997). Therefore, it is possible that FSH acts on both cell types to promote growth and follicular development (M'eduri et al., 2002).

In agreement with these authors Arunakumari et al. (2010) reported an increase in the diameter in sheep PAF but using other inducers of growth as IGF-I and GH and also the combination of FSH + T₄. However, it is not always that the T₄/FSH association can be considered capable of stimulating the development of caprine PAF. Wongbandue et al. (2013) also did not achieve satisfactory results with the addition of T₄, but they used the hormone at the concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 µg/mL added in base culture medium M199 supplemented with 2.13 µg/mL of FSH, besides growth factors and antibiotics. At none of these concentrations there was a difference or gain in the diameter in feline follicles cultured for 0, 3, 7 and 14 days. This study is in agreement with those found in our study, and the most coherent explanation is that the expression of T₄ receptors in granulosa cells possibly develops in stages of follicular development, different from what was used in this study. Although follicular diameter did not increase in our work through the culture, it did not present a reduction on days 1 and 7 of culture of the T₄/FSH medium, if it happened indeed it could indicate a process of atresia. Thus, the observation of the similarity of the diameter in relation to the non-cultured control group greatly showed the viability of the medium tested in the initial period of culture.

Ultimately, in our work we used the TEM for a better ultrastructural evaluation of the quality of the follicles. This tool has been used in several studies to prove the existence of possible ultrastructural damage caused by culture systems that may not be morphologically perceptible (Van den Hurk et al., 1998; Zhao et al., 2000; Salehnia et al., 2002). In the present study, the ultrastructural features of the follicles cultured in the presence of FSH and T₄ for seven days were maintained similar to the non-cultured control. The cellular structures, such as endoplasmic reticulum and mitochondria, were evenly distributed in the cytoplasm and the granulosa cells were ultrastructurally normal and well organized around the oocyte. Other studies also demonstrate that FSH maintains the ultrastructure of caprine PAF after the *in vitro* culture for seven days (Matos et al., 2007; Martins et al., 2008). Matos et al. (2007) also demonstrated that the ultrastructural integrity of the follicles was maintained after 1 day of culture in α-MEM⁺

medium and after 7 days in α -MEM⁺ + FSH (50ng/mL). On the other hand, Rossetto et al. (2009) demonstrated the integrity of follicles cultured after 14 days in media containing ascorbic acid and FSH.

In the case of a culture for a prolonged time, the ultrastructural integrity of PAF was also observed by Gutierrez et al. (2000), that evaluated culture media for bovine PAF with the addition of FSH, EGF and IGF-I for 28 days. In this system, most follicles maintained their morphology throughout the culture, in the presence of a layer of theca and basement membrane surrounding the granulosa cells. Moreover, these authors also observed the antrum formation, which occurred between the days 10 and 28 of culture. However, because our study was conducted with other species, the chronological comparison of these events is not possible.

Given the anteriorly presented and discussed results we note that although it has not provided a substantial growth in the follicular and oocyte diameter, the medium tested in this experiment T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎ did not impair the activation and viability of caprine preantral follicles cultured *in vitro* for a period of seven days. The synergistic effect between T₄ and FSH can be explained by the action of thyroid hormones in the amplification of FSH effect on the differentiation of granulosa cells, fact demonstrated by Maruo et al. (1987) and experimentally proved later by Arunakumari et al. (2010). The action of thyroid hormones on the expression of mRNA of FSH receptors in granulosa cells is still very controversial and needs to be studied and defined more precisely.

Conclusion

The medium tested in this experiment T₄₍₂₀₎/FSH₍₁₀₎ is able to maintain the survival, follicular activation and ultrastructural integrity preantral follicles of goat cultured *in vitro* for a period of up to seven days, which validates and enables the use of the medium tested in culture systems for this species.

Acknowledgments

To CNPq for the financial support to the research. To CAPES for providing the scholarship to the Doctorate student. To the Nucleous of Microscopy and Microanalysis of UFV for the support in ultrastructural analysis.

References

- Alves, A. M. C. V.; Chaves, R. N.; Rocha, R. M. P.; Lima, L. F.; Andrade, P. M.; Lopes, C. A. P.; Souza, C. E. A.; Moura, A. A. A.; Campello, C. C.; Bão, S. N.; Smitz, J.; and Figueiredo, J. R. Dynamic medium containing growth differentiation factor-9 and FSH maintains survival and promotes *in vitro* growth of caprine preantral follicles after long-term *in vitro* culture, *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, p. 955-965, 2012.
- Arunakumari, G., Shanmugasundaram, N., and Rao, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-894, 2010.
- Asahara, S.; Sato, A.; Ali Aljonaid, A, and Maruo, T. Thyroid Hormone Synergizes with Follicle Stimulating Hormone to Inhibit Apoptosis in Porcine Granulosa Cells Selectively from Small Follicles *Kobe J. Med. Sci*, v. 49, p. 107-116, 2003.
- Campbell, B. K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*, v. 6, p.159-171, 2009.
- Carroll, J., D. G. Whittingham, M.J. Wood, E. Telfer, R.G. Gosden. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil*, v. 90, p. 321-327, 1990.
- Cecconi, S.; Rossi, G.; Coticchio, G.; Maccharelli, G.; Borini, A.; Canipari, R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development *in vitro*. *Fertil Steril*, v. 81, p. 919–924, 2004.

Celestino, J. J. H.; Bruno, J. B.; Lima-Verde, I. B.; Matos, M. H.; Saraiva M. V.; Chaves, R. N.; Martins, F. S.; Almeida, A. P.; Cunha, R. M.; Lima, L. F.; Name, K. P.; Campello, C. C.; Silva, J. R.; Bão, S. N.; Figueiredo, J. R. Steadystate level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. Molecular Reproduction and Development, v. 77, n. 3, p. 231-40, 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 et al. Chilling ovarian fragments during transportation improve viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. Reproduction Fertility and Development, v. 20, p. 640-647. 2008.

Chun, S. Y.; Bilig, H.; Tilly, J. L.; Furuta, I.; Tsafiriri, A.; Hsueh, A. J. W. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. Endocrinology, v. 135, p. 1845–1853, 1994.

Colonna, R.; Mangia, F. Mechanisms of amino acid uptake in cumulusenclosed mouse oocytes. Biol. Reprod, v. 28, p. 797–803, 1983.

Cortvrindt, R., Smits, J. and Van Steirteghem, A. C. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. Human Reproduction, vol.12, n. 4, pp.759–768, 1997.

Donato, M.A.M.; Saraiva, K.L.A.; Silva, A.K.S.; Wanderley, M.I, Peixoto, C.A. Follicle development and luteal cell morphology altered by phosphodiesterase-5 inhibitor. Micron, v. 40, p. 845-850, 2009.

Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., Amorim, C.A., and Silva, J.R.V. In:Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA (Eds, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à Reprodução animal, p. 303-327, 2008.

Gougeon, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Ver, v. 17, p. 121–154, 1996.

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. *Biol Reprod*, v.56, p.608-616, 1997.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 62, p.1322-1328, 2000.

Guyton, A. C., Hall, J. E. *Fisiologia Médica*. 11^a edição. Elsevier. Edição Internacional. 2006.

Hillier, S.G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 179, p. 39-46, 2001.

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. *Biol. Reprod*, v. 67, p. 1099–1105, 2002.

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.

Kobayashi, N. et al. Growth Differentiation Factor-9 Mediates Follicle-Stimulating Hormone-Thyroid Hormone Interaction in the Regulation of Rat Preantral Follicular Development. *Endocrinology*, v. 15, 2009.

Magalhães, D.M.; Araujo, V.R.; Lima-Verde, I.B.; Matos, M.H.T.; Silva, R.C.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*, v. 46, n. 5, p. 378-386, 2009a.

Magalhães, D.M.; Fernandes, D.D.; Araujo, V.R.; Almeida, A.P.; Matos, M.H.T.; Figueiredo, J.R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.33, n.4, p.171-182, 2009b.

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

Markström, E.; Svensson, E. C.; Shao, R., Svanberg, B.; Billig, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. Reproduction, v. 123, n. 1, p. 23-30, 2002.

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. Reprod. Fert. Develop, 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 F.S. Braz J Med Biol Res, v..43, p.728-736, 2010.

Maruo,T.; Hayashi,M.; Matsuo,H.; Yamamoto,T.; Okada,H.; Mochizuki, M. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. Endocrinology vol.121, p.1233–1241, 1987.

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., and 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.

M'eduri, G., Charnaux, N., Driancourt, M.-A., Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H. & Migrom, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? J. Clin. Endocrinol. Metab, v. 87, p. 2266–76, 2002.

Muruvi, W., H.M. Picton, R.G. Rodway, I.M. Joyce. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. Theriogenology, v. 64, p. 1357–1370, 2005.

O'Brien, M.J., J.K. Pendola, J.J. Eppig. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. Biol Reprod, v. 68, p. 1682-1686, 2003.

Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. J Clin Endocrinol Metab, v.82, p.3748–51, 1997.

Peng, X., Yang, M., Wang, L., Tong, C., and Guo, Z. *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. J. Assist. Reprod. Genet, v. 27, p. 247-257, 2010.

Rajarajan, K.; Rao, B.S.; Vagdevi, R.; Tamilmani, G.; Arunakumari, G.; Sreenu, M.; Amarnath, D.; Naik, B.R.; Rao, V.H. Influence of various growth factors on *in vitro* development of goat preantral follicles. Small Rumin Res, vol. 63, p.204–212, 2006.

Rossetto, R., Lima-Verde, I. B., Matos, M. H. T., Saraiva, M. V. A., Martins, F. S., Faustino, L. R., Araújo, V. R., Silva, C. M. G., Name, K. P. O., Bão, S. N., Campello, C. C., Figueiredo, and J. R., Blume, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. Domest. Anim. Endocrinol, v. 37, p. 112-123, 2009.

Sadeu, J.C., R. Cortvrindt, R. Ron-El, E. Kasterstein, J. Smits. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen–thawed human fetal ovarian tissue. Fertil Steril, v. 85, p. 1130–1141, 2006.

Salehnia, M.; Moghadam, E.A.; Velojerdi, M.R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fert. Steril*, v. 78, p. 644–645, 2002.

Saraiva, M.V.A., Rossetto, R., Brito, I.R., Celestino, J.J.H., Silva, C.M.G., Faustino, L.R., Almeida, A.P., Bruno, J.B., Magalhães, D.M., Matos, M.H.T., Campello, C.C., and Figueiredo, J.R.. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reprod. Sci*, v. 17, p. 1135-1143, 2010a.

Saraiva, M.V.A.; Celestino, J.J.H.; Araújo, V.R.; Chaves, R.N.; Almeida, A.P.; Lima-Verde, I.B.; Duarte, A.B.G.; Silva, G.M.; Martins, F.S.; Bruno, J.B.; Matos, M.H.T.; Campello, C.C.; Silva, J.R.V.; Figueiredo, J.R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, p. 1-10, 2010b.

SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Skinner, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v. 11, p. 461-471, 2005.

Serakides, R.; Nunes, V. A.; Nascimento, E.; Ribeiro, A. F. C.; Silva C. M.; Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinology e Metabologia*, v. 45, p. 258-264, 2001.

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.

Telfer, E. E.; Mclaughlin, M.; Ding, C.; Thong, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, v. 23, n. 5, p. 1151-1158, 2008.

Van den Hurk, R., Spek, E.R., Hage, W.J., Fair, T., Ralph, J.H. & Schotanus, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reprod*, v. 4, p. 833–841, 1998.

Vitt, U.A., Mcgee, E.A., Hayashi, M., and Hsueh, A.J.W. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, v. 141, p. 3814–3820, 2000.

Wongbandue, G.; Jewgenow, K.; Chatdarong, K. Effects of thyroxin (T₄) and activin A on *in vitro* growth of preantral follicles in domestic cats. *Theriogenology*, v. 79, p. 824–832, 2013.

Wu, J.; Tian, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*, v. 15, n. 3, p. 233-240, 2007.

Zhao, J., Dorland, M., Taverne, M.A.M., Van Der Weijden, G.C., Bevers, M.M. & Van Den Hurk, R. *In vitro* culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Mol. Reprod. Develop*, v. 55, p. 65–74, 2000.

14. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A adição de 10 ng/mL de hFSH ao meio de cultivo promove a ativação e a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* por até 7 dias.
- A utilização de IGF-I no meio de cultivo, na concentração de 100 ng/mL, mantém a ativação dos folículos em desenvolvimento com 1 dia de cultivo. No entanto, não é suficiente para manter a sobrevivência folicular por 7 dias.
- T₄, na concentração de 20 ng/mL no meio de cultivo, promove a manutenção da sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais, durante 7 dias de cultivo.
- A associação de T₄/FSH (20/10ng/mL), no meio de cultivo, estimula a sobrevivência, crescimento e manutenção dos aspectos ultraestruturais de folículos pré-antrais cultivados durante 1 e 7 dias.
- Durante o cultivo *in situ* de longa duração (28 dias), a utilização de T₄ (20ng/mL) associado ao hFSH (10ng/mL) adicionado ao meio base, mantém a morfologia, bem como a viabilidade e a ultraestrutura de folículos pré-antrais caprinos por 7 dias e, ainda, estimula a ativação folicular.

15. PERSPECTIVAS

Para a maximização do potencial reprodutivo, especialmente de fêmeas domésticas, é importante estudar a foliculogênese a fim de compreender os mecanismos e fatores envolvidos nesse processo. Até os dias atuais, muitos esforços têm sido concentrados nesse sentido, visando a busca por sistemas de cultivo *in vitro* eficientes, capazes de permitir o adequado e completo desenvolvimento folicular. Apesar do estabelecimento de meios e condições de cultivo já bastante promissores, ainda é limitado o conhecimento acerca da foliculogênese em caprinos, bem como os resultados alcançados até o momento, o que tem sido considerado um desafio para as equipes que trabalham com estes animais. Além disso, a completa maturação dos oócitos oriundos de folículos pré-antrais, principal alvo da biotécnica de MOIFOPA, ainda atinge índices insatisfatórios nesta espécie.

Inúmeros fatores de crescimento e/ou hormônios, bem como seus receptores e suas vias de sinalização tem sido identificados trabalhando em conjunto para o desenvolvimento folicular através de mecanismos endócrinos, autócrinos e parácrinos. Os resultados desta Tese também evidenciaram a participação de T₄, IGF-I e hFSH no desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ*. Desta forma, as informações aqui obtidas poderão ser utilizadas para aperfeiçoar a elaboração e o fornecimento de meios de cultivo capazes de propiciar ótimas condições para um completo crescimento folicular, preservando a viabilidade celular e revolucionando a produção *in vitro* de embriões. No entanto, estudos complementares poderão ser realizados visando à utilização destas substâncias em associação e em diferentes momentos de adição, caracterizando um meio de cultivo eficiente, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais *in situ* e/ou isolados.