



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Vanessa Raquel Pinto de Barros

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MELATONINA (MT1) E
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSHR) E INFLUÊNCIA DA
MELATONINA E DO FSH EM MEIO DE CULTIVO SEQUENCIAL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS
ISOLADOS**

PETROLINA – PE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Vanessa Raquel Pinto de Barros

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MELATONINA (MT1) E
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSHR) E INFLUÊNCIA DA
MELATONINA E DO FSH EM MEIO DE CULTIVO SEQUENCIAL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS
ISOLADOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Tavares de Matos

PETROLINA – PE

2013

*À minha amada avó materna,
Maria do Rosário Ewerton Moreno Pinto, por
seu imensurável amor,
do qual sentirei falta por todos
os dias da minha vida.*

DEDICO

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, fé e força para seguir meu caminho.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), que através de sua equipe de funcionários (professores, secretários, técnicos e coordenadores), contribuiu para minha formação profissional.

Ao meu tio, Antonio de Jesus Moreno Pinto, por sua dedicação à minha formação intelectual e psicológica.

À minha mãe, Vânia Maria Moreno Pinto, e ao seu esposo Agnaldo Dias Clemente, que sempre serão minha base de sustentação. Agradeço pelo apoio constante, principalmente nos momentos difíceis. Deus me abençoou quando colocou em minha vida uma mãe tão maravilhosa e um padrasto que se tornou um grande amigo.

Ao meu irmão, Pablo Wander Pinto de Barros, para quem busco sempre ser exemplo de dedicação aos estudos e que por estar longe, morro de saudades.

Aos meus animais de estimação, Huck, Xaninha, Cheirinho, Preta, Pulga, Minhoca, Ulisses, Sheik, Limão e Hitler, por alegrarem os meus dias, por me verem chorar sem entender o que acontecia e apenas com seus olhos dentro dos meus, me mostrarem o amor verdadeiro.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV): Agnes Yasmin Cavalcante, Bruna Bortoloni Gouveia, Thae Lane Barbosa Lins, Ricássio Barberino, Vanúzia Menezes, Taís Jobard, Luciana da Paz, Luanna Oliveira, Sérgio Diego e Éllida Bezerra, não somente por terem me ajudado a realizar esse trabalho, mas pela amizade e carinho que tenho por cada um e por ter encontrado em vocês, pessoas preciosas com um coração imenso.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Maria Helena Tavares de Matos, pela oportunidade de dar os primeiros passos da iniciação científica, pela orientação e disponibilidade em todos os aspectos e, principalmente, por ser meu grande exemplo, o qual desejo seguir.

À minha adorada Valdevane Rocha Araújo, que foi um anjo na minha vida. Mesmo ocupada, com todos os problemas de uma tese para realizar, se propôs a me ajudar e foi perfeita em tudo comigo. São atitudes assim que jamais esquecerei.

Ao professor Seldon Almeida de Souza, meu grande amigo! Não tenho palavras para descrever todo o meu carinho e respeito por você. Esteve comigo durante meus melhores e piores momentos, sempre me apoiando e me dando forças. Ajudou-me a crescer como pessoa e como profissional e só tenho a dizer o meu muito obrigada!

Ao meu amigo Rodrigo de Sousa Gonçalves, por ter passado ao meu lado momentos de grandes alegrias e tristezas e, desta forma, ter me ajudado a ter forças para sempre seguir em frente. Nossa amizade foi palco de muito aprendizado e de tantas situações inacreditáveis. Mas graças a Deus continuamos e passamos por cima de muita coisa e só desejo que continue crescendo a cada dia que passa.

À minha grande amiga Keidylânia da Costa Santos, a minha pequena que esboça sorrisos maravilhosos. Minha amiga de “festas”, de passar viradas de Ano no msn, de aproveitar dias com coincidências maravilhosas, de desabafar os problemas, de apenas passar horas na webcam vendo a outra pintar a unha e de tantos outros momentos que somente nós duas saberemos. Nossa amizade cresceu muito, temos carinho e respeito uma pela outra e espero em Deus que possa ser assim pelo resto da minha vida.

A meu colega Thiago Vinicius Costa Nascimento, outra peça importantíssima nesse meu trabalho. Ajudou muito, disponibilizou-se a todo tempo e eu só tenho a agradecer.

Ao grande professor Fernando Leandro, que durante a minha jornada do mestrado me ensinou uma grande lição. Como naquela frase “Fazer o bem sem olhar a quem”, fui surpreendida por um gesto de atenção do professor quando pedi auxílio durante um concurso. Ele foi extremamente atencioso comigo, mesmo sem saber “com quem estava falando” e ao fim de todo processo, suas palavras me ajudaram a conseguir enfrentar grandes concorrentes e um dia, pude receber minha recompensa.

Aos professores Daniel Ribeiro Menezes, Mário Adriano Ávila Queiroz (Colegiado de Medicina Veterinária) e Adriano Victor Lopes da Silva (Colegiado de Engenharia Agrônômica). Grandes profissionais que também se disponibilizaram a me ajudar quando eu estava finalizando minha dissertação, para os quais demonstrarei minha eterna gratidão.

Ao abatedouro ABATAL em especial nas pessoas da Michele, Paulo, Valderi e Dr. Eliseu. Por quase 10 meses, frequentei o abatedouro para realização dos experimentos e estas pessoas se dispuseram a ajudar no que foi necessário, agradeço de coração.

À Fundação de Amparo à Ciência e a Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto (Processo: 503746/2009-6).

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelo grande auxílio da correção desta dissertação.

Epígrafe

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein

RESUMO

A expressão dos receptores da melatonina tipo 1 (MT1) e do hormônio folículo estimulante (FSHR) em ovários caprinos e os efeitos destes hormônios, em um meio sequencial, sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados foram avaliados. A expressão do MT1 e FSHR foi realizada utilizando a técnica de imunohistoquímica e a marcação foi considerada positiva quando observada a coloração marrom sob microscopia óptica. Para o cultivo *in vitro*, folículos (diâmetro entre 150 e 200 μm) foram cultivados durante 12 dias em $\alpha\text{-MEM}^+$ (controle) ou concentrações fixas de melatonina (100 ou 1000 pg/mL) ou meio sequencial contendo melatonina (100 pg/mL: do dia 0 a 6; 1000 pg/mL: dia 6 a 12) (Experimento 1), ou ainda, no controle ou FSH sequencial (100 ng/mL dia 0 a 6; 500 ng/mL dia 6 a 12) ou melatonina sequencial adicionada de FSH sequencial (Experimento 2). Parâmetros como sobrevivência, formação de antro, crescimento folicular e taxa de recuperação de oócitos completamente crescidos *in vitro* foram avaliados. As células da granulosa de folículos secundários apresentaram uma fraca marcação para o MT1. As células da granulosa murais e células do cumulus de folículos antrais iniciais e finais apresentaram uma imunocoloração moderada e forte, respectivamente. Oócitos de folículos primordiais e primários apresentaram uma moderada marcação para o FSHR, assim como as células da granulosa de folículos secundários. Além disso, as células da granulosa murais e células do cumulus de folículos antrais iniciais e avançados demonstraram uma imunorreação moderada e forte, respectivamente. A melatonina sequencial aumentou a sobrevivência e a taxa de recuperação de oócitos em comparação ao controle ou a melatonina (1000 pg/mL) no dia 12. No experimento 2, todos os tratamentos aumentaram a sobrevivência folicular, formação de antro e taxa de recuperação de oócitos em comparação ao controle, no entanto não houve diferenças entres os tratamentos. Este estudo demonstrou a presença do MT1 e FSHR em ovários caprinos. Além disso, a utilização de concentrações definidas de melatonina, adicionadas em momentos específicos do cultivo e de um modo progressivo, pode ser utilizada com sucesso para preservar a sobrevivência folicular e promover o crescimento *in vitro* de oócitos caprinos.

Palavras-chave: Ovário. Oócitos. Hormônios. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

The expression of melatonin type 1 (MT1) and follicle stimulating hormone receptors (FSHR) in caprine ovaries and the effects of these hormones, in a sequential medium, on *in vitro* development of isolated preantral follicles were evaluated. The expression of MT1 and FSHR were performed using immunohistochemistry technique and was considered positive when a brown staining was observed under light microscopy. For *in vitro* culture, follicles (diameter between 150 and 200 μm) were cultured during 12 days in $\alpha\text{-MEM}^+$ (control) or in fixed concentrations of melatonin (100 or 1000 pg/mL) or in sequential medium containing melatonin (100 pg/mL: from day 0 to 6; 1000 pg/mL: from day 6 to 12) (Experiment 1), or in the control or in sequential FSH (100 ng/mL from day 0 to 6; 500 ng/mL from day 6 to 12) or sequential melatonin plus sequential FSH medium (Experiment 2). Parameters such as survival, antrum formation, follicular growth and rate of fully *in vitro* grown oocyte recovery were evaluated. The granulosa cells of secondary follicles showed a weak immunostaining for MT1. Mural granulosa and cumulus cells from early and late antral follicles showed a moderate and strong immunostaining, respectively. Oocytes from primordial and primary follicles showed a moderate reaction for FSHR, as well as granulosa cells of secondary follicles. In addition, mural and cumulus cells of early and late antral follicles expressed a moderate and strong reaction, respectively. The sequential melatonin medium increased the survival and the rate of oocyte recovery compared with the control or melatonin (1000 pg/mL) in day 12. In Experiment 2, all treatments increased follicular survival, antrum formation and the rate of oocyte recovery compared with the control, however, there were no differences between the treatments. This study showed the presence of MT1 and FSHR in caprine ovaries. Furthermore, the use of defined concentrations of melatonin, added in specific periods of the culture and in a progressive way, can be used to maintain follicular survival and to promote the growth of caprine oocyte *in vitro*.

Keywords: Ovary, oocyte, hormone, immunohistochemistry, culture

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
<p>Figura 1. Classificação dos folículos pré-antrais e antrais. Folículo primordial (A), primário (B), secundário (C), terciário (D) e pré-ovulatório (D). N: Núcleo, O: oócito, CG: células da granulosa, zp: zona pelúcida, CT: células da teca, A: antro. Fonte: Silva et al., 2004</p>	23
<p>Figura 2. Organização de conexinas em conexons, canais intercelulares e placas de Gap junctions. Adaptado De Kidder e Winterhager (2001), com a permissão de Fronteiras em Biociências: http://www.bioscience.org.</p>	24
<p>Figura 3. Esquema representativo das etapas envolvidas na biossíntese da melatonina na célula, mostrando os precursores e as enzimas participantes do processo. Adaptado de Rocha et al., 2011.</p>	32
<p>Figura 4. Esquema representativo dos receptores da melatonina, MT1 e MT2 (receptores de membrana acoplados a proteína G) e MT3 (quinona redutase 2). Adaptado de Tamura (2009).</p>	33
<p>Figura 5. Esquema ilustrativo da atuação dos receptores para FSH. Fonte: Saraiva et al., 2010.</p>	36

CAPÍTULO 1

<p>Figure 1. Immunolocalization of MT1 protein in caprine ovarian follicles. Negative control (A and F), primordial and primary (B), secondary (C), early antral (D) and large antral follicle (E). O: oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; TC: theca cell; Arrow: MGC: mural granulosa cell.</p>	69
<p>Figure 2. Immunolocalization of FSHR protein in caprine ovarian follicles. Negative control (A and G), primordial (B), primary (C), secondary (D), early antral (E) and large</p>	70

antral follicle (F). O: oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; TC: theca cell; Arrow: MGC: mural granulosa cell.

- Figure 3. Secondary follicles at day 0 (A: Control; F: Sequential FSH), antral follicles after 6 (Fig. 3B; G) and 12 days (Fig. 3C; H) of culture, extruded (Fig. 3D; I) and degenerated follicles (Fig. 3E; J). Experiment 1: A-E and Experiment 2: F-J. o: oocyte; white arrow: antrum cavity; GC: granulosa cells. Scale bar: 100 μ m. 71
- Figure 4. Experiment 1: Percentage of normal (A) and extruded follicles (B), antrum formation (C) and follicular diameter (D) in the control and different treatments using melatonin during 12 days of culture. 72
- Figure 5. Experiment 2: Percentage of normal (A) and extruded follicles (B), antrum formation (C) and follicular diameter (D) in the control and different sequential media during 12 days of culture. 73

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
Table 1. Relative intensity of immunohistochemical staining for MT1 in the ovaries of goats.	63
Table 2. Relative intensity of immunohistochemical staining for FSHR in the ovaries of goats.	64
Table 3. Percentage of oocyte recovery rate after 12 days of culture of caprine preantral follicles in the control or different melatonin treatment (experiment 1).	65
Table 4. Percentage of oocyte recovery rate after 12 days of culture of caprine preantral follicles in the control or different melatonin and/or FSH treatment (experiment 2).	66

LISTA DE ABREVIACOES

- a: Antrum (antro)
- ANOVA: Analysis of variance (análise de varincia)
- ATP: Adenosine-5'-triphosphate (adenosina-5' - trifosfato)
- BAX: Bcl-2 associated X protein (proteína X associada ao Bcl-2)
- Bcl-2: B-cell lymphoma protein 2 (linfoma de célula B2)
- bFGF: Basic fibroblast growth factor (fator de crescimento fibroblstico básico)
- BMP-15: Bone morphogenetic protein-15 (proteína morfogentica do osso-15)
- BMP-2/-4/-6: Bone morphogenetic protein-2/-4/-6 (proteína morfogentica do osso-2/-4/-6)
- BMP-7/-8b: Bone morphogenetic protein-7/-8b (proteína morfogenética do osso-7/-8b)
- BSA: Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
- Ca⁺⁺: Calcium ion (ion cálcio)
- cAMP: Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (adenosina-3',5'-monofosfato cíclico)
- cc: Cumulus cells (células do cumulus)
- CG: Células da granulosa
- CGP: Células germinativas primordiais
- c-Kit: Kit ligand receptor (Receptor para kit ligand)
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CO₂: Dióxido de Carbono
- CCOs: Cumulus oocyte complexes (complexo cumulus-oócito)
- DAB: Diaminobenzidina
- DNA: Deoxyribonucleic acid (cido desoxirribonucléico)
- EGF: Epidermal growth factor (fator de crescimento epidermal)
- FGF: Fibroblast growth factor (fator de crescimento de fibroblasto)
- Fig.: Figure (figura)
- FIV: Fecundao *in vitro*
- Fox12: Forkhead box L2 (proteína forkhead L2)
- Foxo3a: Forkhead transcription factor (fator de transcrio Foxo forkhead)
- FSH: Follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)
- FSHr: FSH recombinante
- FSHR: FSH receptor (receptor de FSH)

G: Gauge (calibre)
GC: Granulosa cell (célula da granulosa)
GDF-9: Growth differentiation factor-9 (fator de crescimento e diferenciação-9)
GDP: Guanosine diphosphate (guanosina difosfato)
GH: Growth hormone (hormônio do crescimento)
GnRH: Gonadotropin-releasing hormone (hormônio liberador de gonadotrofinas)
GV: Germinal vesicle (vesícula germinal)
GVBD: Germinal vesicle breakdown (quebra da vesícula germinal)
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
IGF-1/-2: Insulin like growth factor-1/-2 (fator de crescimento semelhante à insulina-1/2)
IHQ: Imunohistoquímica
ITS: Insulin, transferrin and selenium (insulina, transferrina e selênio)
IVM: *In vitro* maturation (maturação *in vitro*)
K⁺: Íon potássio
KL: Kit ligand
L/l: Litro
LAMOFOPA: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais
LH: Luteinizing hormone (hormônio luteinizante)
LIF: Leukemia inhibitory factor (fator inibidor de leucemia)
M: Molar
MEL: Melatonin (Melatonina)
MEM: Minimal essential medium (meio essencial mínimo)
MEM⁺: Supplemented minimal essential medium (meio essencial mínimo suplementado)
MII: Metaphase II (metáfase II)
MIV: Maturação *in vitro*
mL: Mililitro
mM : Milimolar
MOIFOPA: Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
mOsm/L: Miliosmol/litro
ng: Nanograma
O: Oocyte (Oócito)

P < 0.05: Probabilidade de erro menor do que 5%

Pg: Picograma

PCR: Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

RNA_m: Ribonucleic acid messenger (ácido ribonucléico mensageiro)

RT-PCR: Reverse transcription- polimerase chain reaction (reação em cadeia polimerase transcriptase reversa)

SAS: Statistical analysis system (sistema de análise estatística)

SEM: Standard error of means (erro padrão da média)

UNIVASF: Universidade Federal do Vale do São Francisco

α-MEM: Alpha minimal essential medium (meio essencial mínimo alfa)

α-MEM⁺: Supplemented alpha minimal essential medium (meio essencial mínimo alfa suplementado)

μM : Micromolar

% : Percentage (porcentagem)

μg : Micrograma

μL : Microlitro

μm : Micrômetro

± : Mais ou menos

°C : Graus Celsius

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIACOES.....	v
1.INTRODUÇÃO.....	19
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 MORFOFISIOLOGIA OVARIANA.....	21
2.2 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS.....	21
2.3 POPULAÇÃO OVARIANA E ATRESIA.....	26
2.4. BIOTÉCNICA DE MOIFOPA.....	27
2.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS.....	28
2.6 SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ ANTRAIIS.....	28
2.6 A COMPOSIÇÃO DO MEIO E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR <i>IN VITRO</i>	29
2.7 MELATONINA.....	31
2.8 HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH).....	35
2.9 ESTADO ATUAL DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ ANTRAIIS	37
2.10 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	38
3. JUSTIFICATIVA.....	0
4.OBJETIVOS.....	42
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
CAPÍTULO 1	
ABSTRACT.....	44
INTRODUCTION.....	45
MATERIAL AND METHODS.....	46
RESULTS.....	52
DISCUSSION.....	54
REFERENCES.....	58
FIGURE CAPTIONS.....	66
5. CONSIDERAOES FINAIS.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a caprinocultura apresenta um ciclo de crescimento mundial o qual se intensificou nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, como o Brasil. Esse quadro representa uma evolução em relação ao passado, pois esta espécie desempenha importante papel econômico e social em todo território nacional, especialmente na região do Vale do São Francisco. Dessa forma, há uma ampla necessidade de incremento na assistência desses animais, tanto para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, como para a multiplicação mais eficiente dos genótipos, que pode ser alcançada a partir do desenvolvimento de biotécnicas da reprodução (FONSECA, 2005).

É conhecido que os ovários das diferentes espécies mamíferas, como a espécie caprina, contêm milhares de folículos em estádios iniciais, chamados de folículos pré-antrais, os quais são considerados o estoque de gametas femininos. No entanto, a grande maioria dos folículos (cerca de 99%) não conseguem alcançar as fases mais avançadas de desenvolvimento, morrendo por um processo chamado atresia (MATSUDA et al., 2012). Devido a esta grande perda do potencial reprodutivo das fêmeas, vem sendo aprimorada a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), também denominada como Ovário Artificial. O objetivo desta biotécnica é o resgate dos folículos pré-antrais dos ovários e o seu posterior desenvolvimento *in vitro*, evitando assim, a atresia folicular. Para isso, sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos vem sendo desenvolvidos. Porém, apesar de manter a sobrevivência folicular, o principal desafio para os pesquisadores ainda é aumentar as taxas de maturação e de produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos caprinos inclusos em folículos pré-antrais, a fim de produzir no futuro um grande número de descendentes viáveis (FIGUEIREDO et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento folicular é regulado por hormônios e fatores de crescimento que agem de forma endócrina, parácrina e/ou autócrina (MATSUDA et al., 2012). Dentre os hormônios envolvidos na reprodução destacam-se a melatonina e o FSH.

A melatonina é produzida, principalmente, na glândula pineal e é sintetizada e secretada durante a noite (CLAUSTRAT et al., 2005). A presença de receptores para melatonina em ovários de camundongos fêmeas, ratas, humanos e suínos já foi

demonstrada (LEE et al., 2001; SOARES Jr. et al., 2003; NILES et al., 1999; KANG et al., 2009). Alguns estudos mostraram que a melatonina pode agir como antioxidante, diminuindo os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio nos folículos ovarianos (TAMURA et al., 2012). Além disso, estudos evidenciaram que a melatonina pode diminuir as taxas de atresia folicular após cultivo de folículos pré-antrais *in vitro* (ADRIAENS et al., 2006).

Outra substância bastante estudada em diversos grupos de pesquisa é o Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Estudos *in vitro* demonstraram que este hormônio mantém a integridade folicular e promove a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos (MATOS et al., 2007a; ROSSETO et al., 2009) e além disso, pode aumentar o diâmetro folicular e inibir a apoptose em outras espécies (ITOH et al., 2002; MATOS et al., 2007b; MAGALHÃES et al., 2009) após cultivo *in vitro*.

Para uma melhor compreensão desta dissertação será realizada uma revisão de literatura abordando os temas: morfofisiologia ovariana, formação e desenvolvimento de folículos ovarianos, população ovariana e atresia, biotécnica de MOIFOPA, cultivo e sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, a composição do meio e o desenvolvimento folicular *in vitro*, a técnica de imunohistoquímica e os hormônios utilizados no presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfofisiologia ovariana

O ovário caprino é constituído por muitos tipos de células diferenciadas, que trabalham em conjunto para promover um ambiente ideal para o desempenho de suas funções endócrinas e gametogênicas (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006). Este órgão é constituído pelas regiões cortical e medular. Na primeira região, localizada mais externamente, estão presentes os folículos ovarianos, que podem ser encontrados em distintos estádios de desenvolvimento. No córtex, ainda são observados corpos lúteos, hemorrágicos e albicans (LIU et al., 2006; RICHARDS; PANGAS, 2010). Por outro lado, a região medular é constituída por tecido conjuntivo frouxo, algumas células musculares lisas, nervos, vasos linfáticos, artérias e veias que se estendem para o córtex ovariano, nutrindo e sustentando o ovário (CORMACK, 1991).

Após o nascimento, nota-se no ovário caprino, um *pool* de folículos em fase de repouso ou quiescentes, que constitui a reserva ovariana. Essa reserva inclui os folículos classificados como primordiais, além de pequenos folículos primários. Estes folículos representam entre 91 e 98% do total da população folicular ovariana. Em todas as espécies de mamíferos, os folículos deixam o estoque de folículos quiescentes em um fluxo contínuo, seja por apoptose ou por entrada para a fase de crescimento (GOUGEON, 2010).

2.2 Formação e desenvolvimento dos folículos ovarianos

Nas fêmeas mamíferas, a oogênese consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do oócito haplóide fecundado. Um complexo mecanismo intercelular está envolvido na regulação da oogênese (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

Resumidamente, os oócitos são originados a partir das CGP do endoderma do saco vitelínico, que migram por movimento amebóide até a região das gônadas primitivas (CORTVRINDT & SMITZ, 2001). Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP,

dentro do ovário, multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias, as quais possuem alta atividade mitótica e transcricional (EPPIG et al., 2001). Em seguida, as oogônias sofrem meiose e se transformam em oócitos primários, apresentando um núcleo em prófase I, estágio de vesícula germinativa (SUH et al., 2002). A progressão da divisão meiótica ocorre somente na puberdade, com a liberação do pico pré ovulatório de LH, formação dos oócitos secundários e outra parada da meiose na fase de metáfase II (HUTT; ALBERTINI, 2007). A meiose será retomada novamente somente após a fecundação do oócito pelo espermatozóide, originando o oócito haplóide fecundado, e marcando assim, o fim do desenvolvimento oocitário (FIGUEIREDO et al., 2008).

O folículo é considerado como a unidade morfofuncional do ovário e é constituído de um oócito circundado por células somáticas (granulosa e/ou tecais) (MATSUDA et al., 2012). O processo em que ocorre a formação, o desenvolvimento e a maturação do folículo é chamado de foliculogênese. Durante a foliculogênese, ocorrem alterações na morfologia folicular, caracterizadas pelo crescimento oocitário, pela diferenciação e proliferação das células da granulosa e pelo aparecimento das células tecais (SILVA, 2005; BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Com base nessas alterações morfológicas, os folículos podem ser classificados de acordo com o grau de evolução em folículo pré antral (primordial, primário e secundário) e antral (terciário e pré ovulatório) (Figura 1) (SILVA et al., 2004).

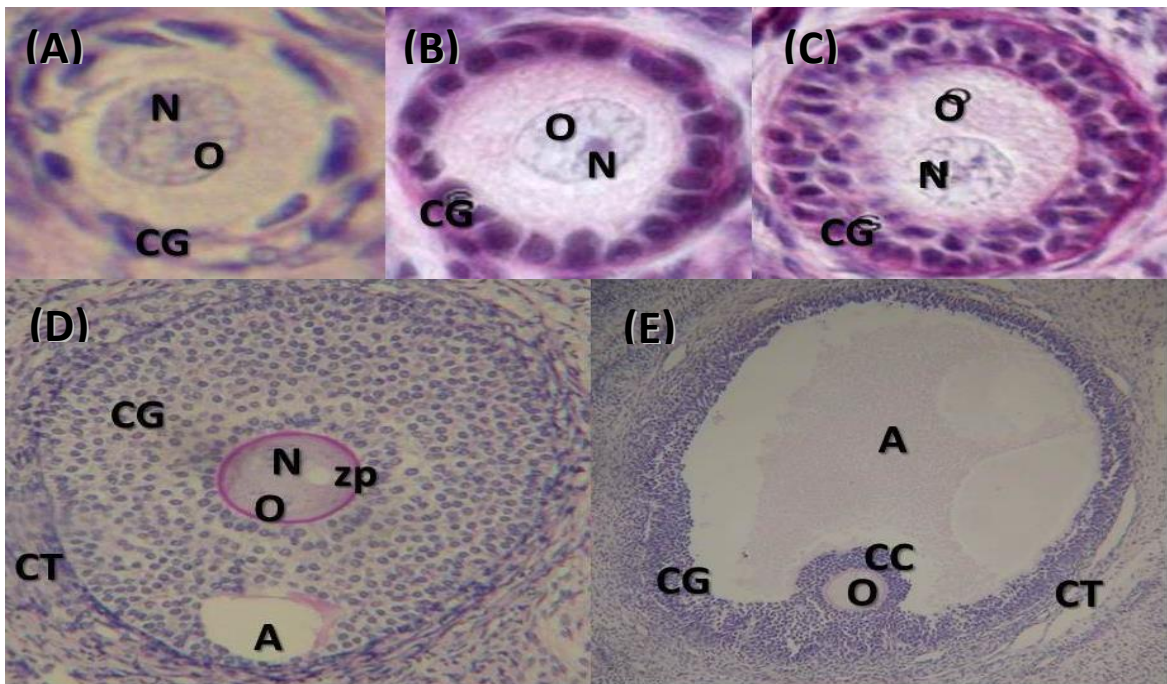


Figura 1. Classificação dos folículos pré-antrais e antrais. Folículo primordial (A), primário (B), secundário (C), terciário (D) e pré-ovulatório (E). N: Núcleo, O: oócito, CG: células da granulosa, zp: zona pelúcida, CT: células da teca, A: antro. Fonte: Silva et al., 2004

Para a formação do folículo ovariano mais precoce, o oócito primário é circundado por uma camada de células somáticas pavimentosas, conhecidas como células da pré-granulosa, formando assim, o folículo primordial (OKTEN e URMA, 2010). Em geral, na espécie caprina, os folículos primordiais possuem diâmetros oocitário e folicular de 28 e 36 μm , respectivamente (BEZERRA et al., 1998). O início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), sendo considerado o maior evento biológico que controla o potencial reprodutivo das fêmeas (MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009). Esse crescimento dos folículos primordiais é também conhecido como ativação e as características morfológicas observadas são o aumento do diâmetro oocitário e a alteração na morfologia das células da pré-granulosa, que passam de pavimentosa para cúbica. Alguns fatores multidirecionais de comunicação entre os oócitos e as células somáticas, determinados componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, atuam de forma autócrina e parácrina, desempenhando um papel na transição e subsequente crescimento destes folículos (OKTAY et al., 1997:2000; EPPIG, 2001; SKINNER, 2005). Entre os conhecidos fatores que auxiliam na ativação folicular, pode-se citar o Kit ligand (KL), produzido pelas células da granulosa e seu receptor c-kit, expresso no oócito e células da teca (KEZELE; NILSSON; SKINNER, 2002; NILSSON; SKINNER, 2004). O KL promove o

crescimento do oócito, bem como o recrutamento e a proliferação das células da teca do estroma circundante (NILSSON; SKINNER, 2004). Além disso, fatores como o Foxo3a (Forkhead transcription factor) (LIU et al, 2007) e o Foxl2 (Forkhead box L2) são importantes para a diferenciação de células da pré-granulosa em células da granulosa, durante a ativação folicular (REDDY; ZHENG; LIU, 2010).

Com a ativação dos folículos primordiais, o oócito passa a ser circundado por uma camada completa de células da granulosa com morfologia cúbica, sendo então denominados de folículos primários (GOUGEON e BUSSO, 2000). Em geral, esses folículos possuem diâmetro oocitário e folicular de 38 e 49 μm , respectivamente (BEZERRA et al., 1998). Nesta fase de crescimento, uma rede de gap junctions, que são canais intercelulares da membrana, começam a aparecer na camada granulosa. Esses canais permitem que nutrientes, íons inorgânicos, segundos mensageiros e pequenos metabólitos passem de célula para célula (GOUGEON, 2010). Cada um desses canais é composto de proteínas chamadas de conexinas (CX), que estão dispostas numa configuração hexamérica (OKTEN e URMAN, 2010) (Figura 2). A CX43 é a mais abundante no ovário e é expressa nas CGs no início da foliculogênese (GOUGEON, 2010; ACKERT et al., 2001).

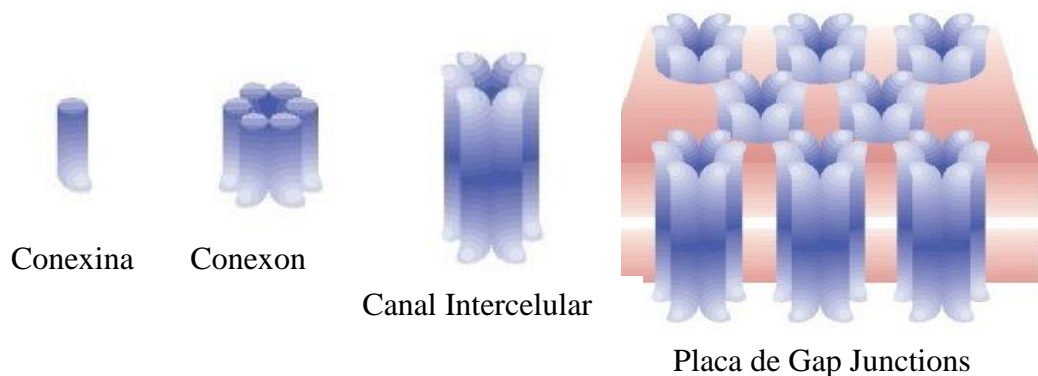


Figura 2. Organização de conexinas em conexons, canais intercelulares e placas de Gap junctions. Adaptado de Kidder e Winterhager (2001), com a permissão de Fronteiras em Biociências: <http://www.bioscience.org>.

Ao longo do desenvolvimento, as CGs se multiplicam em diversas camadas ao redor do oócito e as células da teca se formam, caracterizando os folículos

secundários. Com o desenvolvimento do folículo secundário, também aumenta o número de microvilos e inicia-se a formação da zona pelúcida (LUCCI et al., 2001). As células da teca desempenham um importante papel no crescimento do folículo ovariano por serem a principal fonte de síntese de andrógenos no ovário, fornecendo precursores para a esteroidogênese e síntese de estrógeno nas células da granulosa (OKTEN e URMAN, 2010). Além disso, as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs)-4 e -7, de origem tecal, são capazes de promover o crescimento do folículo primário em ambos os modelos *in vivo* e *in vitro* em roedores (NILSSON e SKINNER, 2003; LEE et al, 2004). As células da teca também se comunicam bidirecionalmente com as células da granulosa através da produção do fator de crescimento do hepatócito (HGF) e o fator de crescimento do queratinócito (KGF), que induzem as CGs à produção de KL. O KL por sua vez, promove a expressão de HGF e KGF nas células da teca (OKTEN e URMAN, 2010).

Com maior crescimento, os folículos atingem um diâmetro de 200 μm e entram na fase antral. É também nesta fase que o folículo começa a exibir alguns espaços cheios de fluido no interior das camadas das células da granulosa, que irá coalescer para formar a cavidade antral, juntamente com o aumento da vascularização da camada de teca, a continuação do crescimento do oócito e a proliferação das células da granulosa e da teca (OKTEN e URMAN, 2010). O fluido folicular que preenche a cavidade antral contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides, secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006). Ainda nesta fase, as células da teca sofrem alterações morfológicas e funcionais e aquelas células localizadas próximas à membrana basal passam a ser denominadas teca interna, enquanto as localizadas periféricamente são chamadas de teca externa.

Na fase final do desenvolvimento folicular, observa-se a formação do folículo pré ovulatório, o qual é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas, denominadas de células do cumulus. As células da granulosa produzem inibina, enquanto as células da teca produzem andrógenos, que são utilizados pelas células da granulosa para sintetizar o 17β -estradiol (estradiol). A ação do estradiol e da inibina no sistema hipotálamo-hipofisário é diminuir a secreção de FSH (conhecido como *feedback* negativo) e suprimir o crescimento de folículos subordinados. Durante esse tempo, o folículo dominante adquire receptores de LH nas células da granulosa e aumenta a sua dependência e

então, finalmente, resulta na ovulação induzida por um pico de LH (MATSUDA et al., 2012). Em todas as espécies mamíferas, a formação de folículos pré ovulatórios ocorre geralmente a partir da puberdade (DRIANCOURT, 2001).

2.3 População ovariana e atresia

A população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma grande variação individual (KATSKA–KSIĄZKIEWICZ et al., 2006), sendo de aproximadamente 1.500 em camundongo fêmea (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000), 20.000 na cabra (BEZERRA et al., 1998); 33.000 na ovelha (AMORIM et al., 2000) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). Apesar desta grande população folicular presente no ovário dos mamíferos, a maioria destes (cerca de 99,9%) não chega à ovulação, morrendo por um processo denominado atresia (MATSUDA et al., 2012). Embora a perda dos folículos ovarianos através deste processo seja muito alta, este é um evento crucial para a manutenção da homeostase do ovário mamífero, o que assegura ciclicidade animal (AMSTERDAM et al., 2003).

O processo de atresia, usualmente, ocorre de forma diferenciada entre folículos pré-antrais e antrais. Em folículos pré-antrais, os primeiros sinais de morte folicular surgem no oócito, onde se pode observar a retração da cromatina nuclear e a fragmentação oocitária (SILVA et al., 2002). Após a formação do folículo antral ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa (JORIO et al., 1991). Independente do tipo folicular, a atresia pode ocorrer pela via apoptótica ou pela via degenerativa, a necrose (CHEN et al., 2005; VALDEZ et al., 2005).

Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER et al., 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS et al., 2001). Jennings et al. (1975) demonstraram que mudanças na permeabilidade da membrana celular causam alterações nos níveis intracelulares de Na^+ , K^+ e Cl^- , os

quais estão associados com modificações no volume e aumento no líquido intracelular. Além da isquemia, outros fatores que podem levar à degeneração são estímulos tóxicos e imunológicos, que também podem induzir a apoptose.

No que concerne à via apoptótica, é amplamente aceito que o processo de apoptose é controlado por um número de proteínas intracelulares e é o principal responsável pela perda da reserva ovariana (GOUGEON, 2010). Sabe-se que se trata de um evento geneticamente determinado, ou seja, depende da expressão de genes pró e anti apoptóticos, sendo caracterizado por uma série de alterações bioquímicas e morfológicas, com a extensiva perda de volume celular, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (RACHID et al., 2000). Dentre estes fatores, as proteínas Bcl-2 e bax, provavelmente, desempenham um papel fundamental neste processo (GOUGEON, 2010). Estudos demonstraram que em ratos deficientes de Bcl-2 houve uma diminuição no número de folículos presentes no ovário após o nascimento (RATTS et al., 1995), enquanto que a superexpressão de Bcl-2 levou a uma diminuição na apoptose folicular (HSU et al., 1997). Por outro lado, a deficiência da proteína Bax leva a um prolongamento da vida do ovário (PEREZ et al., 1999).

2.4. Biotécnica de MOIFOPA

Considerando-se o fato de que a quase totalidade dos oócitos será eliminada pelo processo de atresia, caso eles permaneçam no interior dos ovários, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos (MOIFOPA) tem como objetivos: (1) resgatar ou isolar os folículos pré-antrais a partir dos ovários antes que eles sofram o processo de atresia, (2) conservar estes folículos visando à estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período, (3) cultivar os folículos pré-antrais e, conseqüentemente, os oócitos imaturos neles inclusos, até sua completa maturação, prevenindo-os da atresia e (4) proporcionar a produção de embriões em larga escala (FIGUEIREDO et al., 2007). Para que esses objetivos sejam alcançados, ainda se faz necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular, considerando o sistema de cultivo a ser empregado, o método utilizado para o isolamento folicular, a

espécie animal selecionada para o estudo, bem como a composição do meio (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.5. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma importante etapa da biotécnica de MOIFOPA. O cultivo é uma técnica de grande importância, uma vez que poderá fornecer um grande número de oócitos, os quais poderão ser utilizados para diversas biotecnologias, como a produção *in vitro* de embriões, transferência nuclear, produção de animais transgênicos, desenvolvimento de células-tronco embrionárias, dentre outras, podendo ainda ser utilizada para auxiliar na preservação da fertilidade de mulheres jovens sujeitas à quimioterapia. Além disso, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma ferramenta que permite aperfeiçoar o conhecimento básico sobre os mecanismos envolvidos na foliculogênese ovariana (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010). Este sistema tem sido utilizado para avaliar também a importância de hormônios (ROCHA et al., 2013) e fatores de crescimento (SILVA et al., 2012), bem como da vascularização (FORTUNE et al., 2000) e da apoptose (FLAWS et al., 2001; O`BRIEN et al., 2003) a fim de se descobrir as condições de cultivo ideais para cada fase do desenvolvimento folicular.

2.6. Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* para folículos pré-antrais pode ser muito útil para a compreensão do complexo mecanismo da foliculogênese nos seus estágios iniciais de desenvolvimento (FIGUEIREDO et al., 2011). Os folículos pré-antrais podem ser cultivados inclusos em tecido ovariano (cultivo *in situ*), seja em ovários inteiros (roedores: FORTUNE et al., 2003) ou em fragmentos de ovários (caprinos: ROCHA et al., 2013; ovinos: LIMA et al., 2013; bovinos: ANDRADE et al., 2012; humanos: FABBRI et al., 2012). Esse tipo de cultivo tem a vantagem de manter a integridade estrutural folicular e as interações entre as células foliculares e do estroma (LIMA et al., 2013), possibilitar uma maior praticidade de execução do trabalho, além de permitir estudar com mais facilidade a ativação de

folículos primordiais. Entretanto, o tecido cortical pode agir como uma barreira à perfusão do meio de cultivo, resultando em um crescimento de folículos primordiais somente até o estágio de folículo secundário (FORTUNE, 2003; MARTINS et al., 2008).

Já o sistema de cultivo folicular envolvendo o isolamento mecânico e/ou enzimático dos folículos ovarianos pré-antrais, permite o monitoramento individual do crescimento folicular, bem como verificar o efeito *in vitro* de diferentes substâncias sobre cada etapa do seu desenvolvimento (ABIR et al., 2001). Este sistema pode ser realizado de forma bidimensional (camundongo: LORET DE MOLA et al., 2004), na qual o folículo pode ser cultivado diretamente sobre o suporte de plástico, sobre uma matriz ou pode ser realizado em microgotas de meio de cultivo sob óleo mineral, utilizando placas de Petri ou em placas de multipoços que requerem maior volume de meio, porém dispensam o uso de óleo. Já o cultivo tridimensional, na qual o folículo é incluso em uma matriz, como por exemplo, o colágeno (HIRAO et al., 1994) ou hidrogel de alginato (HORNICK et al., 2012), deve assegurar a manutenção da arquitetura tridimensional do folículo durante seu desenvolvimento *in vitro*, ser permeável ao meio permitindo o acesso dos hormônios e fatores de crescimento às células foliculares e ainda, permitir o crescimento folicular sem prejudicar sua forma (SMITZ et al., 2010).

Para realização do sistema de cultivo isolado, métodos mecânicos de isolamento têm sido mais comumente adotados, em relação ao enzimático, por proporcionar a recuperação de um grande número de folículos pré-antrais a partir de ovários de vacas (ITOH et al., 2002), cabras (ARUNAKUMARI et al., 2007), ovelhas (AMORIM et al., 2000), ratas (ZHAO, 2000) e camundongos fêmeas (LENIE et al., 2004), além de manter a integridade da estrutura folicular, na qual a membrana basal permanece intacta e as interações entre oócito, células da granulosa e células da teca são mantidas (DEMEESTERE et al., 2005). Dentre os métodos mecânicos, os mais utilizados são a microdissecção, para folículos acima de 150 μm de diâmetro (SILVA et al., 2012) e o isolamento com *tissue chopper* para folículos com diâmetro inferior a 150 μm (MARTINEZ-MADRID et al., 2004), ou ainda, a associação de ambas as técnicas (GUPTA et al., 2008).

2.7. A composição do meio e o desenvolvimento folicular *in vitro*

Além das diferenças dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, existem também muitas diferenças espécies-específicas, como: i) o período para a conclusão da foliculogênese e oogênese; ii) o tamanho dos folículos ovulatórios e oócitos maduros, e iii) as diferenças na natureza, concentrações e efeitos dos fatores de crescimento, que influenciam o folículo e produção de oócitos *in vivo*. Essas diferenças são altamente relevantes no desenvolvimento de sistemas que suportam o completo crescimento *in vitro* e a maturação do oócito. No entanto, em todos os protocolos, algumas características são vitais para otimizar o crescimento *in vitro*: o fornecimento de nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento (PICTON et al., 2008).

Meios de cultivo comerciais foram desenvolvidos com o intuito de promover um adequado crescimento *in vitro* de células. Dentre eles podemos ressaltar o Meio Essencial Mínimo (MEM), que tem sido utilizado em diferentes espécies, permitindo a manutenção da viabilidade folicular (GAO et al., 2007; SILVA et al., 2010). Esse meio é rico em componentes importantes para manutenção da viabilidade e o crescimento folicular *in vitro*, como eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). Apesar disso, diversas pesquisas demonstraram a necessidade de se incrementar o meio de cultivo com a adição de outros componentes.

Alguns estudos têm mostrado que a adição de antioxidantes, como o selenito de sódio, aumenta a taxa de crescimento *in vitro* e a maturação de folículos pré-antrais de camundongos fêmeas (ABEDELAKHI et al., 2008; 2010). Além disso, a transferrina é relatada como uma importante substância a ser adicionada ao meio, pois alguns autores sugerem que o processo de maturação folicular está relacionado aos altos níveis de transferrina e seus receptores na célula (DEMESTERE et al., 2005). O ácido ascórbico também é um importante antioxidante utilizado no meio de cultivo *in vitro*. Trabalhos demonstram que esta substância promove a manutenção da viabilidade e o desenvolvimento folicular em caprinos (ROSSETTO et al., 2009; SILVA et al., 2011) e também, auxilia na ativação folicular em bovinos (ANDRADE et al., 2012). Além desses componentes antioxidantes, substratos energéticos como a glutamina e a hipoxantina, quando adicionados ao meio de cultivo de base, mantém a porcentagem de folículos morfologicamente normais durante o cultivo (FIGUEIREDO et al., 1994; SILVA et al., 2004b).

Outras substâncias, como hormônios e fatores de crescimento também vêm sendo adicionadas ao meio de cultivo *in vitro*. A insulina tem sido 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). Recentemente, Chaves et al. (2012) demonstraram que a insulina, na concentração de 10 ng/mL, apresentou melhores taxas de retomada da meiose, bem como a presença de oócitos em metáfase II a partir do cultivo de folículos pré-antrais caprinos. Dentre outros hormônios, podemos citar a melatonina e o FSH, os quais serão descritos nos tópicos a seguir.

2.8 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal, como também em outros locais: retina, glândula lacrimal extra-orbitária, trato gastrointestinal, pele e ovário (HARDELAND et al., 1993; HUETHER, 1993; ITOH et al., 1999).

Este hormônio é sintetizado e secretado durante a noite (ciclo escuro). Conforme os dias começam a ficar mais curtos, a exposição dos animais à melatonina aumenta, informando ao organismo a duração da noite e conseqüentemente, o período do ano correspondente (SRINIVASAN et al., 2009). A melatonina auxilia na organização da sazonalidade, especialmente em espécies com fotoperíodo negativo, como os caprinos (ARENDET, 1998). O fotoperíodo negativo, período de dias curtos, estimula a produção de melatonina, que sinaliza os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo, estimulando a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e a adeno-hipófise para liberação das gonadotrofinas FSH e LH (SCHAEFFER E SIROTKIN, 1997). Em cabras, observou-se um perfil sérico de secreção da melatonina de acordo com as estações anuais: picos séricos no outono e inverno e queda na primavera e verão (ALILA-JOHANSSON et al., 2001).

A síntese da melatonina ocorre na glândula pineal e a via biossintética da melatonina inicia com a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano por intermédio da ação da triptofano-5-hidroxilase (T-5-H). Seguindo a rota, a enzima

5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTD) catalisa a oxidação do 5-hidroxitriptofano em serotonina. Sequencialmente, a serotonina é convertida em N-acetilserotonina através de uma reação de acetilação da enzima N-acetiltransferase (NAT) e, por fim, a enzima acetilserotonina O-metiltransferase (ASOMT) (REITER et al., 2009) catalisa a reação de metilação para a formação da melatonina (Figura 3). Uma vez sintetizada, a melatonina não é armazenada nas células da pineal, mas é rapidamente liberada para a corrente sanguínea e em seguida, para outros fluidos corporais, tais como a bile (KOPPISETTI et al., 2008), líquido céfalo-raquidiano (ROUSSEAU et al., 1999), saliva (VAKKURI et al., 1985), sêmen (BORNMAN et al., 1989) e líquido amniótico (KIVELA et al., 1989).

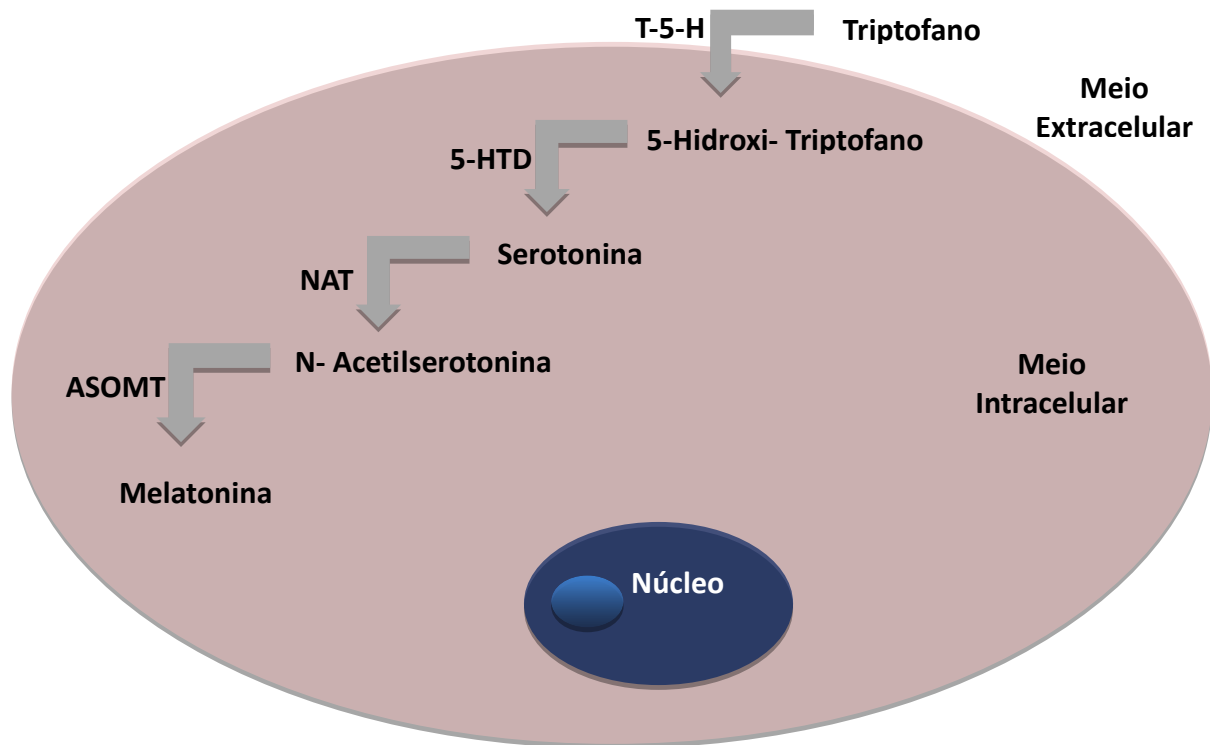


Figura 3. Esquema representativo das etapas envolvidas na biossíntese da melatonina na célula, mostrando os precursores e as enzimas participantes do processo. Adaptado de Rocha et al., 2011.

Apesar de sua ação central na reprodução, sugere-se que a melatonina tenha uma ação periférica no ovário, uma vez que foi demonstrada a sua presença no fluido folicular de humanos (RÖNNBERG et al., 1990) e de seus receptores em células da granulosa de folículos antrais (ratas: NILES et al., 1999 ; humanos: YIE et al., 1995; SOARES et al., 2003).

A ação da melatonina é mediada por três tipos de receptores: MT1, MT2 e MT3 (NILES et al., 1999; WITT-ENDERBY et al., 2003), destacando-se, em mamíferos, a ação do MT1 e do MT2, ambos pertencentes à família de receptores ligados à proteína G (REPPERT et al., 1996). A ativação destes receptores promove a dissociação das proteínas G em dímeros α e $\beta\gamma$, que interagem com várias moléculas efetoras envolvidas na transmissão da sinalização celular (MASANA e DUBOCOVICH 2001), que incluem a adenilil ciclase, fosfolipase C, fosfolipase A2, canais de potássio e cálcio e guanilil ciclase (DUBOCOVICH & MARKOWSKA, 2005). Por intermédio desses receptores, a melatonina pode exercer diferentes papéis na fisiologia animal, como a regulação do sono e da temperatura, ritmicidade circadiana e sazonal, como também na fisiologia reprodutiva, no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (WEHR et al., 2001) (Figura 4). Já foi relatado que a melatonina desempenha um papel no metabolismo lipídico, pois influencia no metabolismo do colesterol (TAMURA et al., 2008a), e na função do corpo lúteo para produção de progesterona (TAMURA et al., 1998).

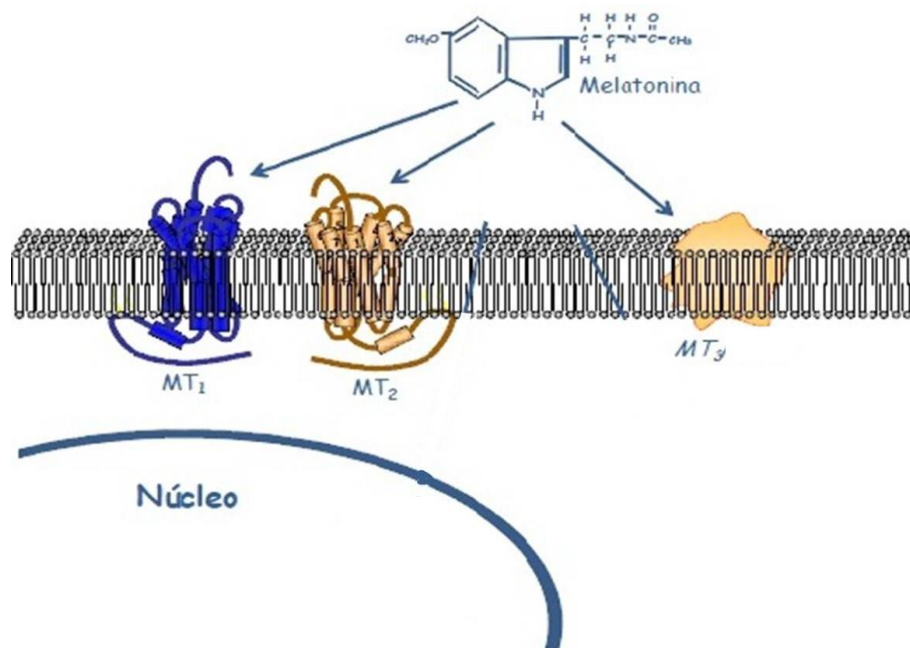


Figura 4. Esquema representativo dos receptores da melatonina, MT1 e MT2 (receptores de membrana acoplados a proteína G) e MT3 (quinona redutase 2). Adaptado de Tamura (2009).

De acordo com Pandi-Pemural et al. (2008), os receptores MT1 e MT2 são expressos em diversas partes do Sistema Nervoso Central (hipocampo e córtex

cerebelar, por exemplo) e em órgãos periféricos (ovário, glândula mamária, trato gastrointestinal, etc). A presença de receptores para melatonina já foi detectada, através da técnica de PCR, em ovários de fêmeas de camundongos, ratas, humanos, bovinos e suínos (LEE et al., 2001; SOARES Jr. et al., 2003; NILES et al., 1999; EL-RAEY, 2011; KANG et al., 2009)

Embora a melatonina exerça efeito através de seus receptores, esta também pode atuar como um potente sequestrador direto de espécies reativas de oxigênio (EROs) (POEGGELER et al., 1993; SCHINDLER et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado que a melatonina possui a capacidade de reagir com as EROs, tais como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico (NO) (HARDELAND, 2005). Além do efeito antioxidante da melatonina, os metabólitos que são formados durante suas interações também possuem essa capacidade, como por exemplo, N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (HARDELAN, 2005; TAN et al., 2007). Gao et al. (2012) demonstraram que a melatonina possui um potente efeito antioxidante suprimindo a produção de EROs e promovendo o desenvolvimento embrionário de embriões vitrificados. Os mecanismos envolvidos na ação antioxidante da melatonina estão no fato de tratar-se de uma molécula altamente eletrorreativa. Ela age primariamente como um poderoso doador de elétrons e detoxifica EROs eletrodeficientes (VIJAYALAXMI et al., 2002). Além deste mecanismo de ação, a melatonina estimula a atividade de outras enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e catalase (TAMURA et al., 2008b). Kim e Lee (2000) demonstraram que a melatonina também tem efeito radioprotetor em folículos pré-antrais de camundongos fêmeas, diminuindo a porcentagem de degeneração folicular quando estas fêmeas foram irradiadas com uma dose letal de um radioterápico. Outro estudo utilizando modelos *in vivo*, observou que a suplementação em longo prazo com melatonina retarda o envelhecimento reprodutivo de ratas sem qualquer efeito sobre o número de folículos primordiais (MEREDITH et al., 2000).

Já em relação à presença da melatonina em meios de cultivo *in vitro* de células, Woo et al. (2001) ao testarem diferentes concentrações de melatonina (10 pM – 100 nM), mostraram que esse hormônio é capaz de atuar na maturação e diferenciação das células da granulosa, conforme observado pelo aumento da

expressão de receptores de LH nessas células em humanos. Adriaens et al. (2006) observaram que a concentração de 100 μM de melatonina aumentou significativamente a produção de progesterona e androstenediona em folículos pré-antrais de fêmeas de camundongos cultivados *in vitro*. O mesmo resultado foi obtido com folículos antrais suínos cultivados *in vitro* com 100 ng/mL de melatonina, embora não tenham sido observados efeitos na produção de estradiol (TANAVDE e MAITRA, 2003).

Um estudo demonstrou que diferentes concentrações (0,01 – 10 $\mu\text{g/mL}$) de melatonina, utilizadas no cultivo *in vitro* de células da granulosa de humanos, podem modular a expressão de outros fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) (SCHAEFFER e SIROTKIN, 1997). Além disso, essa indolamina também está envolvida com a maturação oocitária e a formação do hormônio indutor de maturação que promove a quebra da vesícula germinal (CHATTORAJ et al., 2005). Manjunatha et al. (2009) utilizaram 20 e 50 μM de melatonina no meio de maturação *in vitro* e obtiveram maiores percentuais de maturação e produção embrionária. Mais recentemente, Rocha et al. (2013) ao associarem a melatonina (1000 pg/mL) ao FSH (50 ng/mL), observaram um aumento do diâmetro folicular, após 7 dias de cultivo *in vitro* de tecido ovariano caprino.

2.9. Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O FSH é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelas células gonadotróficas localizadas na hipófise anterior, contendo uma subunidade α em comum e uma subunidade β hormônio específica (BROWN e McNEILLY, 1999). Este hormônio é liberado de forma constitutiva, isto é, grande parte do hormônio é liberada na velocidade em que é produzida, embora uma pequena parcela possa ser armazenada para ser liberada em resposta ao GnRH (FARNWORTH, 1995).

O receptor do hormônio hipofisário FSH (FSHR) é composto de um grande domínio extracelular N-terminal, sete domínios transmembranários e um domínio C-terminal intracelular acoplado à proteína G (SALESSE et al., 1991). A ligação desta gonadotrofina ao seu receptor ativa as proteínas G associadas, promovendo a conversão de guanosina difosfato (GDP) em guanosina trifosfato (GTP), que se liga à subunidade α da proteína G, estimulando a adenilciclase (AC) a gerar AMP cíclico

(cAMP). Este, por sua vez, aciona uma cascata de fosforilação nas proteínas quinases dependentes de cAMP (PK-A). Desta forma, a ativação da PK-A controla múltiplos aspectos da função celular por meio da fosforilação de substratos proteicos. Uma vez que a interação receptor-ligante tenha se estabelecido, o complexo é internalizado por endocitose e degradado pelos lisossomos, sendo o receptor reciclado de volta à membrana celular por exocitose (HILLIER et al., 1996) (Figura 5).

A interação do FSH com seu receptor inicia uma cadeia de reações intracelulares que incluem a ativação de mais de 100 genes que codificam diferentes respostas (HUNZICKER-DUNN e MAIZELS, 2006), tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de esteroides e a expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidermal (EGF), IGF-1 e LH (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

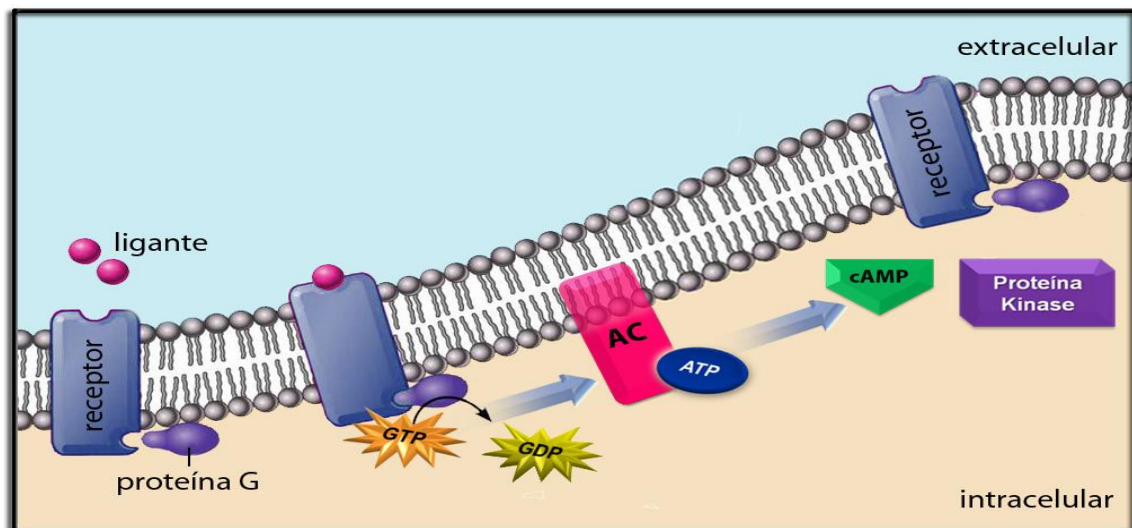


Figura 5. Esquema ilustrativo da atuação dos receptores para FSH. Fonte: Saraiva et al., 2010.

Diversos estudos já demonstraram a presença do RNAm para o FSHR, a partir de folículos primários, nas células da granulosa em humanos, búfalos e caprinos (OKTAY et al., 1997; SARAIVA et al., 2011; SHARMA et al., 2011) e em oócitos, células da granulosa e epitélio superficial de ovários suínos (DURLEJ et al., 2011). Estes estudos reforçam a ideia da ação do FSH sobre o crescimento dos folículos pré-antrais.

Esse hormônio pode agir indiretamente estimulando a síntese e secreção de fatores parácrinos nos grandes folículos (O'SHAUGHNESSY; DUDLEY; RAJAPAKSHA, 1996; SARAIVA et al., 2011) auxiliando assim o crescimento de pequenos folículos. Alguns trabalhos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como Kit Ligand (KL), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9), Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (bFGF) e Proteína Morfogênica do Osso-15 (BMP-15), que têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (THOMAS et al., 2005; TANG et al., 2012).

O FSH tem sido utilizado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, promovendo o desenvolvimento, a manutenção da viabilidade e a sobrevivência folicular em fêmeas de camundongos (SPEARS et al., 1998), ratas (McGEE et al., 1997), mulheres (WRIGHT et al., 1999), vacas (GUTIERREZ et al., 2000), cabras (ZHOU & ZHANG, 2005; MAGALHÃES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010), ovelhas (CECCONI et al., 1999) e porcas (MAO et al., 2002) e até a obtenção de embriões (SARAIVA et al., 2010a).

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

Um grande progresso já tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Foi observado o crescimento de folículos pré-antrais isolados de felinos (JEWGENOW, 1996) e marsupiais (BUTCHER; ULLMAN, 1996), porém sem formação de antro. Nas espécies humana (TELFER et al., 2008), bovina (McLAUGHLIN et al., 2010) e canina (SERAFIN et al., 2010), grandes folículos secundários isolados foram cultivados *in vitro* por diferentes períodos e se desenvolveram até a fase antral. Resultados mais satisfatórios foram obtidos com suínos, bubalinos, ovinos e caprinos, em que se alcançou a produção de embriões após cultivo *in vitro* de grandes folículos secundários (WU; TIAN, 2007; GUPTA et al., 2008; ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; SARAIVA et al., 2010b; MAGALHÃES et al., 2011). Embora importantes conquistas tenham sido obtidas com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais nas referidas espécies, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. Em camundongos, o cultivo de folículos primordiais também resultou no

nascimento de um filhote após crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos inclusos nos folículos cultivados (EPPIG e O'BRIEN, 1996). Já no início da década atual, O'Brien et al. (2003), utilizando um sistema de cultivo em dois passos (cultivo de ovário inteiro seguido de cultivo de folículos secundários isolados) relataram ainda a produção de embriões e o nascimento de camundongos viáveis (59 crias) a partir oócitos de folículos primordiais cultivados *in vitro*. Recentemente, Wang et al. (2011) utilizando oócitos derivados de folículos pré-antrais secundários obtidos após vitrificação de tecido ovariano de camundongos fêmeas, também conseguiram alcançar a produção de embriões e o nascimento de crias viáveis após cultivo *in vitro*.

2.11 Imunohistoquímica

Uma técnica que pode auxiliar no estudo da foliculogênese inicial podendo ser associada ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é a imunohistoquímica. O conceito fundamental de imunohistoquímica é a demonstração de antígenos em secções de tecido através de anticorpos específicos. A ligação antígeno-anticorpo é observada com uma reação histoquímica visível ao microscópio óptico (utilizando cromógenos) ou de fluorescência (utilizando marcadores fluorescentes) (RAMOS-VARA, 2005). Esta técnica vem sendo utilizada com frequência para avaliar a expressão de fatores de crescimento e hormônios, bem como seus receptores, presentes nos ovários, além de ser utilizada também para verificar a proliferação das células da granulosa (ABIR et al., 2006).

Segundo Hoffman et al. (2008), o maior desafio para se realizar adequadamente a técnica de imunohistoquímica é determinar se um antígeno tem atividade contra um anticorpo específico. Para isto, o uso de anticorpos para imunocoloração requer que a concentração ótima deste seja utilizada. Essa concentração e a habilidade para detectar um determinado antígeno podem ser influenciadas por alguns fatores: (1) quantidade de antígeno presente no tecido, (2) a afinidade dos anticorpos utilizados, (3) quantidade de produto ou substrato insolúvel que é depositada na reação, e (4) a estratégia utilizada para visualização.

Através da imunohistoquímica, vários trabalhos vêm demonstrando a presença de receptores e/ou proteínas para várias substâncias, que influenciam

direta ou indiretamente a atividade ovariana como, por exemplo, o hormônio do crescimento (GH) (SOLÓRZANO et al., 2012), ativina (SILVA et al., 2004b), fator de crescimento epidermal (EGF) (SILVA et al., 2006a), KL (SILVA et al., 2006b) e FGF-1 (BERISHA et al. 2004). Desta forma, esta técnica torna-se importante para auxiliar na localização das diversas substâncias que podem agir na foliculogênese, contribuindo assim, para uma melhor compreensão deste processo.

3. Justificativa

A caprinocultura exerce um importante papel socioeconômico no Nordeste do Brasil por se tratar de importante fonte de alimento e renda. Desta forma, o desenvolvimento de biotécnicas que possibilitem uma rápida multiplicação de animais geneticamente superiores pode melhorar significativamente a qualidade de vida da população rural da região Nordeste. Nesse sentido, a compreensão da fisiologia ovariana em caprinos, associada ao desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução animal, como por exemplo, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e a fecundação *in vitro*, abrem inúmeras possibilidades para proporcionar um melhoramento genético dos rebanhos e um aumento na produtividade animal. Assim, o estudo dos fatores que controlam o desenvolvimento folicular ovariano na espécie caprina pode ser de grande importância para o desenvolvimento agropecuário do Nordeste brasileiro.

Ao nascimento, o ovário dos caprinos contém milhares de oócitos e cerca de 90% destes estão inclusos nos folículos pré-antrais. Entretanto, a grande maioria desses oócitos não ovula e morre por atresia durante as fases de crescimento e maturação. A atresia faz com que o potencial do ovário, para produção de oócitos maduros, seja pouco aproveitado. Considerando-se esta alta taxa de atresia folicular, a biotécnica de MOIFOPA visa criar artificialmente *in vitro* as condições necessárias para que pequenos oócitos inclusos em folículos pré-antrais recuperados dos ovários possam sobreviver, crescer, maturar e posteriormente serem fecundados *in vitro*, reduzindo-se o processo de atresia que ocorre nos ovários. A biotécnica de MOIFOPA aliada à análise da expressão dos fatores que controlam a foliculogênese é de grande importância para a pesquisa fundamental e para a reprodução animal.

Diante disso, uma substância que parece exercer influência sobre a foliculogênese inicial é a melatonina, cujos receptores já foram demonstrados em ovários de camundongos fêmeas, ratas e humanos. Além disso, estudos mostraram que a melatonina pode diminuir as taxas de atresia folicular e promover o crescimento após cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Outro hormônio bastante estudado é o FSH, que também mantém a sobrevivência e promove o crescimento folicular *in vitro*. Através da técnica de imunohistoquímica, estudos demonstraram a presença da proteína para o FSHR em ovários humanos, suínos e em búfalos.

Entretanto, em caprinos a expressão dos receptores de melatonina e FSH ainda não foi verificada através da técnica de imunohistoquímica. O conhecimento acerca da expressão destes receptores contribuirá enormemente para elucidação da foliculogênese em cabras. Além disso, ainda não é conhecido o efeito da melatonina, isoladamente ou associada ao FSH, sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais:

- Estudar a expressão dos receptores da melatonina e do FSH em ovários caprinos;
- Investigar o efeito da melatonina, isoladamente ou em associação com o FSH, sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

4.2. Objetivos Específicos

- Verificar a expressão dos MT1 e do (FSHR) nas diferentes categorias (folículo primordial, primário, secundário e antral) e compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa e da teca) em ovários caprinos, utilizando a técnica de imunohistoquímica;
- Avaliar o efeito da melatonina, isoladamente ou em associação com o FSH, sobre parâmetros como sobrevivência, crescimento, formação de antro e taxa de recuperação de oócitos.

CAPÍTULO 1.

Immunolocalization of Melatonin and Follicle Stimulating Hormone receptors in caprine ovaries and their effects during *in vitro* development of isolated preantral follicles

V. R. P. Barros^A, A. Y. P. Cavalcante^A, T. J. S. Macedo^A, R. S. Barberino^A, T. L. B. Lins^A, B. B. Gouveia^A, V. G. Menezes^A, M. A. A. Queiroz^C, V. R. Araújo^B, R. C. Palheta Júnior^D, M. C. P. Leite^E, M. H. T. Matos^{A,F}

^ANucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

^BLAMOFOPA, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceara, 60740-000, Fortaleza-CE, Brazil

^CLaboratory of Bromatology and Animal Nutrition, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

^DLaboratory of Physiology, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

^ECenter of Agrarian, Ambiental and Biological Sciences, Federal University of Reconcavo of Bahia, 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brazil.

^FCorresponding author. Email: helena.matos@univasf.edu.br

Running head: Melatonin and FSH in goat follicle culture

*Correspondence should be addressed to:

Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal (CPGCA)

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1

CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839

Abstract

The expression of melatonin type 1 (MT1) and FSH (FSHR) receptors in caprine ovaries and the effects of these hormones on the in vitro development of isolated preantral follicles were evaluated. Follicles ($\leq 200 \mu\text{m}$) were cultured for 12 days in α -MEM (control) or melatonin (100 or 1000 pg/ml) or sequential melatonin medium (100 pg/ml: from day 0 to 6; 1000 pg/ml: from day 6 to 12) (experiment 1) and in control or sequential FSH (100 ng/ml from day 0 to 6; 500 ng/ml from day 6 to 12) or sequential melatonin or this latter plus sequential FSH (experiment 2). MT1 and FSHR expression was observed in granulosa cells from secondary and antral follicles. The oocytes from primordial and primary follicles also express FSHR. Sequential melatonin increased the percentage of normal follicles and oocyte recovery compared with the control or melatonin (1000 pg/ml) at day 12. In experiment 2, all the treatments increased the normal follicles and growth compared with the control. In conclusion, this study demonstrated the presence of MT1 and FSHR in caprine ovaries. The addition of increased concentrations of melatonin (sequential medium) has a significant impact on the in vitro development of caprine preantral follicles.

Additional keywords: Ovary, oocyte, hormone, immunohistochemistry, culture

Introduction

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is secreted during the dark hours by pineal gland, and it regulates a variety of important central and peripheral actions related to circadian rhythms and reproduction (TAMURA et al., 2013). Most of the melatonin actions are mediated through interaction with its receptors, type 1 (MT1) and type 2 (MT2), which are G-protein coupled membrane bound receptors (REPPERT et al., 1994; REPPERT et al., 1995). According to Pandi-Perumal et al. (2008), MT1 and MT2 receptors are widely distributed in the body, being expressed in the central nervous system and in peripheral organs (e.g., ovary, mammary gland, gastrointestinal tract). In the ovaries, RT-PCR analysis revealed the expression of MT1 mRNA in mouse granulosa cells from primary follicle stage onward (LEE et al., 2001), rat granulosa cells from secondary and antral follicles (SOARES Jr. et al., 2003), human granulosa cells from preovulatory follicles (NILES et al., 1999), bovine cumulus oocyte complexes (EL-RAEY et al., 2011), swine cumulus cells (KANG et al., 2009). Despite these studies, there are no data on localization and expression of MT1 protein in the different follicular stages in caprine ovaries.

Activation of these receptors in photoperiodic species regulates the breeding season through the modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by melatonin, which may act synergically with follicle stimulating hormone (FSH) during folliculogenesis and steroidogenesis (ROCHA et al., 2011). Recent in vitro findings have demonstrated an increase in preantral follicle diameter after culturing caprine ovarian tissue with the association of melatonin and FSH (ROCHA et al., 2013). Other studies have shown that melatonin reduced the rates of mouse follicle atresia (ADRIAENS et al., 2006) and that its metabolites are antioxidants and free radical scavengers (REITER, 2003; KANG et al., 2009; GAO et al., 2012; REITER et al., 2000). However, it is not fully understood the role of melatonin in modulating reproduction, especially its effects on the caprine ovarian follicles.

FSH has been used in the in vitro culture of preantral follicles in several species, maintaining the follicular viability and promoting the follicular growth (GUTIERREZ et al., 2000; MATOS et al., 2007, SARAIVA et al., 2010). It is known that FSH can also have an indirect role on preantral follicle development through the release of growth factors by the larger antral follicles and stromal cells (BRITO et al., 2012; TANG, 2012). Some studies have demonstrated mRNA expression for FSH receptor (FSHR) in granulosa cells from primary follicle stages onward, leading to a consensus that FSH would act only in those cells during the follicular growth (human: OKTAY et al., 1997; caprine: SARAIVA et al., 2011). Using immunohistochemical studies, some authors have found protein expression for FSHR in oocytes from primary follicle stage onward (swine and human: MÉDURI et al., 2002; swine: DURLEJ et al., 2011), in oocytes of primordial and primary follicles as well as in granulosa cells of primary follicles (swine: DURLEJ et al., 2011) and in granulosa cells of bubaline growing follicles (SHARMA et al., 2011). However, the expression for FSHR protein during folliculogenesis in caprine ovaries is still not known.

Given the important roles of melatonin and FSH during folliculogenesis, the aims of this study were 1) to characterize protein expression for MT1 and FSHR in caprine ovaries by immunohistochemistry and 2) to evaluate the effect of these hormones on the in vitro development of isolated caprine secondary follicles.

Material and methods

Source of ovaries

Ovarian cortical tissues (n=10 ovaries) were collected at a local abattoir from five adult (1 - 3 years old) non-pregnant mixed-breed goats (*Capra hircus*). Immediately postmortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol and then twice in Minimum Essential Medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with antibiotics (100 µg/ml

penicillin and 100 µg/ml streptomycin). Then, ovaries were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Dinâmica, São Paulo, Brazil). Unless noted otherwise, supplements, hormones and chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Immunohistochemical localization of MT1 and FSHR

After 18 h of fixation, ovarian tissue was dehydrated with increasing concentrations of ethanol (Dinâmica, São Paulo, Brazil), clarified in xylene (Dinâmica, São Paulo, Brazil) and embedded in paraffin wax (Dinâmica, São Paulo, Brazil). Then, sections of 5 µm from each block were cut on a microtome (EasyPath, São Paulo, Brazil) and mounted in salinized glass slides (ImmunoSlide - EasyPath, São Paulo, Brazil).

Immunohistochemistry was performed as described in previous studies (SILVA et al., 2004; HOFFMAN et al., 2008) with some modifications. The slides were incubated in citrate buffer (Dinâmica, São Paulo, Brazil) at 98-100°C in a microwave for 7 minutes to retrieve antigenicity and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with 3% H₂O₂ and methilic ethanol for 10 min. Non-specific binding sites were blocked using 1% normal mouse serum (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS; Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, USA). Subsequently, the sections were incubated in a humidified chamber for 18 h at 4°C with the polyclonal rabbit anti-MT1 (1:40; Santa Cruz Biotechnology, USA) and anti-FSHR (1:30) antibodies. Then, the sections were incubated for 45 minutes with mouse anti-IgG biotinylated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluted 200 times in PBS, containing 1% normal mouse serum. The sections were incubated for further 45 minutes with avidin-biotin complex (1:600; Vectastain Elite ABC kits; Vector laboratories, USA). The protein localization was demonstrated with diaminobenzidine (DAB; 0.05% DAB in PBS, pH 7.6, 0.03% H₂O₂) and the sections were

counterstained with hematoxylin (Vetec, São Paulo, Brazil) for 10 seconds. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with IgGs from the same species in which the primary antibody was raised.

Follicular classification

Preantral follicles were classified as primordial (oocyte surrounded by a single layer of squamous or squamous and cuboidal granulosa cells), primary (oocyte surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells) or secondary (oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells). Antral follicles were classified as early (< 3 mm, presence of an antral cavity) or large (presence of a cavity filled with follicular liquid and well developed theca layers). In the different follicular compartments (oocyte, granulosa and theca cells), the immunostaining was classified as occasionally found (-/+), absent (-), weak (+), moderate (++) or strong (+++). The slides were examined using a microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under 400X magnification.

Isolation and selection of preantral follicles

For in vitro culture, additional pair of caprine ovaries (n=60) were collected and washed as described above. The ovaries were transported within one hour to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES and antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 4°C (CHAVES et al., 2008).

In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in fragmentation medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Goat preantral follicles, approximately 200 µm in diameter without antral cavities, were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645

Nikon, Tokyo, Japan) and mechanically isolated by microdissection using 26-gauge (26 G) needles. These follicles were then transferred to 100 μ l droplets containing basic culture medium for evaluation of quality. Only secondary follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: an intact basement membrane, two or more layers of granulosa cells and a visible and healthy oocyte that was round and centrally located within the follicle, without any dark cytoplasm. Isolated follicles were pooled and then randomly allocated to the treatment groups, with approximately 30-60 follicles per group, depending on the experiment.

In vitro culture of preantral follicles

After selection, the follicles were individually cultured (one follicle per droplet) in 100 μ l droplets of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). Incubation was conducted at 39°C and 5% CO₂ in air for 12 days. The basic control medium was consisted of α -MEM (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3.0 mg/ml bovine serum albumin (BSA), ITS (10 μ g/mL of insulin, 5.5 μ g/ml transferrin, 5.0 ng/ml selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 μ g/ml ascorbic acid and then referred as α -MEM⁺.

This work was divided into two experiments that occurred at different times. In the first experiment (n=24 ovaries; about 30 follicles per treatment group), preantral follicles obtained from each animal were randomly distributed in the following treatments: α -MEM⁺ alone (control) or associated with fixed concentrations of melatonin (MEL 100 or 1000 pg/ml; according to ROCHA et al., 2013) or in α -MEM⁺ that was supplemented with increased concentrations of melatonin throughout culture periods, corresponding to sequential melatonin: melatonin 100 pg/ml (from day 0 to day 6) and melatonin 1000 pg/ml (from day 6 to day 12). In the second experiment (n=36 ovaries; approximately 60 follicles per treatment

group), secondary follicles were randomly distributed in the following treatments: α -MEM⁺ alone (control) or using recombinant FSH (Nanocore, São Paulo, Brazil) in increasing concentrations (Sequential FSH: from day 0 to day 6 = 100 ng/ml; from day 6 to day 12 = 500 ng/ml; according to SARAIVA et al., 2011) or in the presence of sequential melatonin (best results in the first experiment) or this latter group associated with sequential FSH medium. Every other day, 60 μ l of the culture media was replaced with fresh media in each droplet. In all the FSH treatments and in the sequential medium with melatonin, a change of the complete volume (100 μ l) of the medium was performed every 6 days.

Morphological evaluation of follicle development

The morphological aspects of all preantral follicles were assessed every 6 days using a pre-calibrated ocular micrometer in a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) at 100x magnification. Only those follicles showing an intact basement membrane, with bright and homogeneous granulosa cells and an absence of morphological signs of degeneration, were classified as morphologically normal follicles. Follicular atresia was recognized when a darkening of the oocytes and surrounding cumulus cells, misshapen oocytes or decreased follicle diameter was noted. The rupture of the basement membrane was also observed and characterized as oocyte extrusion.

The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the diameter of healthy follicles, measured from the basement membrane, which included two perpendicular measures of each follicle, and (iii) the growth rate, calculated as the diameter variation during the culture period.

Previous studies demonstrated that caprine oocytes smaller than 100 μ m were not able to resume meiosis (CROZET et al., 2000). Based on that finding, we analyzed the recovery

percentage of acceptable quality oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$) at the end of the 12-day culture period. For this purpose, oocytes were dissected out from follicles with fine needles (26G) under a stereomicroscope from all of the surviving follicles. The recovery percentage of oocytes was calculated as the number of acceptable quality oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$) recovered out of the total number of cultured follicles.

Statistical analysis

Data from follicle survival, extruded follicles, antrum formation and retrieval of grown oocytes after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the chi-squared test. Follicular diameter and growth rates were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances using PROC UNIVARIATE do SAS 9.0 procedure. The residues that did not show a normal distribution were logarithmically transformed ($\log_{10}(X + 1)$) for normal distribution adjustment. Since requirements underlying the Analysis of Variance were present, ANOVA was executed using PROC MIXED of SAS (2002) with REPEATED statement to account for autocorrelation between sequential measurements. The model included the effects of treatment (melatonin and FSH concentrations), time of culture (Days 0, 6 and 12) and their interactions. When main effects or interactions were significant, means were compared by Tukey's test. Data from follicular growth in the experiment 1 were analyzed in the same way, however using PROC GLM procedure. In experiment 2, data from follicular diameter and growth rate were analyzed as shown in experiment 1, but because of the heterogeneity of variances, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used through PROC NPAR1WAY do SAS 9.0. These results were expressed as the means \pm standard error mean (SEM), and differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Immunohistochemical localization of MT1 and FSHR in caprine ovarian follicles

Table 1 and Figure 1 show the expression pattern of immunohistochemical staining for MT1 in caprine ovaries. Oocytes from all developmental stages did not show any positive reaction for MT1. It also was not observed in granulosa cells of primordial and primary follicles. However, a weak immunostaining for MT1 was observed in granulosa cells of secondary follicles. In addition, cumulus and mural granulosa cells from early and large antral follicles showed a moderate and strong reaction for MT1, respectively. Theca cells occasionally showed a positive reaction for the MT1 protein. No staining was observed in stromal cells neither in negative controls.

The results demonstrated a moderate reaction for FSHR protein in oocytes of primordial and primary follicles, respectively (Table 2; Fig. 2). Nevertheless, oocytes of secondary and antral follicles did not show a positive reaction for FSHR. Protein expression for FSHR was occasionally found in granulosa cells of primordial and primary follicles, while in granulosa cells of secondary follicle it showed a moderate reaction. In addition, cumulus and mural granulosa cells from early antral follicles showed a moderate reaction for FSHR, while the expression was strong in large antral follicles. Caprine theca cells occasionally showed a positive reaction for the FSHR protein. No staining was observed in stromal cells neither in negative controls.

Follicle development after in vitro culture

Experiment 1

The preantral follicles showed centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membranes (Fig. 3A). After 6 and 12 days of culture, antral cavity in

caprine ovarian follicles could be observed in all the treatments (Fig. 3B-C), as well extruded (Fig. 3D) and degenerated follicles (Fig. 3E).

The Figure 4A shows the percentage of morphologically normal follicles in experiment 1. The follicular survival decreased significantly from day 0 to 6 and from day 6 to 12 in all the treatments, except in sequential melatonin group, which maintained the percentage of morphologically normal follicles from day 6 to 12 of culture. Considering the same culture period, sequential melatonin treatment significantly increased the percentage of morphologically normal follicles at day 12 compared with the control group or melatonin at the concentration of 1000 pg/ml. Moreover, some follicles in culture ruptured their basal cell membrane and the addition of melatonin to the culture medium significantly reduced the precocious extrusion of oocytes compared with the control after 12 days of culture (Fig. 4B). The presence of melatonin did not influence antrum formation ($P>0.05$; Fig. 4C).

All the treatments induced a progressive and significant increase of the follicular diameter throughout the period of culture (Fig. 4D). However, there were no significant differences in follicular diameter (Fig. 4D) or in the daily growth rate (20.6% for the control x 19.8% for MEL 100 x 22.6% for MEL 1000 and 21.9% for sequential melatonin) among treatments. Notably, in comparison with the control or melatonin at the concentration of 1000 pg/ml, the sequential melatonin treatment significantly increased the percentage of oocytes larger than 100 μm at the end of culture (Table 3).

Experiment 2

Based on the results of survival and on the percentage of oocyte recovery at the end of culture described above (experiment 1), we verify the effects of sequential melatonin medium plus a sequential FSH medium on follicle development after in vitro culture. Figure 3 shows caprine ovarian follicles before (Fig. 3F) and after in vitro culture in experiment 2. As early as day 6

of culture, antral cavity could be observed in all the treatments (Fig. 3G-H), as well as extruded (Fig. 3I) and atretic follicles (Fig. 3J).

The percentage of morphologically normal follicles in experiment 2 decreased significantly from day 0 to 6 and from day 6 to 12 in all the treatments containing melatonin and/or FSH (Fig. 5A). Nevertheless, the rates of follicle extrusion did not differ among the treatments after 12 days of culture (Fig. 5B). In addition, all the sequential medium containing melatonin and/or FSH induced higher ($P<0.05$) percentage of normal follicles, antral cavity formation (Fig. 5C), follicular diameter (Fig. 5D) and daily growth rate (15.7% for the control; 22.5% for sequential FSH; 23.7% for sequential melatonin and 24.1% for sequential melatonin + FSH) when compared with the control treatment. Despite that sequential media did not show differences on follicular growth, the follicles cultured in medium containing FSH showed more visible antral cavity than those cultured in medium containing only melatonin. At the end of culture, all the treatments significantly increased the percentage of oocytes larger than 100 μm compared with the control (Table 4).

Discussion

This study demonstrated for the first time a variable pattern of intensity and distribution of the MT1 and FSHR expression in caprine ovarian follicles using immunohistochemical analysis. Besides that, this study verifies the effect of melatonin and FSH alone or in association on in vitro development of isolated caprine secondary follicles for 12 days. We observed that addition of melatonin or FSH in the culture medium maintains follicular integrity and stimulates in vitro follicular development of caprine secondary follicles. These results are according to previous studies, which show the importance of melatonin pathways in mammalian folliculogenesis (TAMURA et al. 2009; ROCHA et al. 2013). In the current study, immunostaining for MT1 was observed in granulosa cells from secondary follicle

stage, and its expression increased in antral follicles. Some RT-PCR studies have localized mRNA for MT1 in granulosa cells of other species (human: NILES et al., 1999; mouse: LEE et al., 2001; rat: SOARES Jr. et al., 2003; swine: KANG et al., 2009; bovine: EL-RAEY et al., 2011). Therefore, the physiologic involvement of melatonin during granulosa cell proliferation and follicular maturation may be due to the expression of its receptors.

The gonadotrophin agent binding on FSHR induces granulosa cell proliferation in both preantral and antral follicles (CAI et al., 2007; SARAIVA et al. 2011). Similar to swine follicles (DURLEJ et al. 2011), the expression pattern of the protein for FSHR, in our study, was observed in oocytes from primordial and primary follicles in caprine ovaries. Some authors have demonstrated the immunoreactivity of FSHR in both swine and human oocytes from all developmental stage follicles, except in primordial follicles (MEDURI et al., 2002). In contrast, other study did not observe the immunoreactivity of FSHR in bubaline oocytes (SHARMA et al., 2011). Similar to our study, DURLEJ et al. (2011) used an avidin-biotin-complex (ABC) peroxidase method, which is a more sensitive method since enzyme product further amplifies the signal (HOFFMAN, 2008). This method may explain the differences observed between our results and those from Sharma et al. (2011). Therefore, our immunohistochemical results indicate that FSHR may be directly involved in the initial growth of primordial follicles in caprine, adversely to the accepted dogma. FSHR protein was localized in granulosa cells, especially from secondary follicle stage onward. Similar results were observed in granulosa cells of growing follicles in different species (human and swine: MEDURI et al., 2002; swine: DURLEJ et al., 2011; bubaline: SHARMA et al., 2011). Moreover, using PCR some authors have reported mRNA expression for FSHR in granulosa cells from primary follicle stage onward (rat: CAMP et al., 1991; human: OKTAY et al., 1997; caprine: SARAIVA et al., 2011). The different findings according to follicle stage may be due to the used tests. In caprine, the difficult to isolate oocytes and granulosa cells from

primordial follicles may not allowed to the quantification of mRNA for FSHR in this follicular stage (Saraiva et al., 2011).

Based on our immunohistochemistry findings, in which there was an increase of MT1 immunoexpression according to follicular development, we performed an in vitro culture of isolated secondary follicles using fixed concentrations of melatonin or increasing concentrations in a sequential way (experiment 1). The percentage of morphologically normal follicles decreased significantly in the control group and 1000 pg/ml of melatonin compared with the sequential melatonin medium after 12 days of culture. Although we did not evaluate MT1 immunostaining after in vitro culture, it is likely that these results are associated with an increased MT1 receptor levels and consequently increased responsiveness to melatonin. The antioxidant effects of melatonin (TAKASAKI et al., 2003; TAKADA et al., 2012) may also explain the maintenance of survival and the decrease in precocious oocyte extrusion when melatonin was added to the culture medium, compared with the control after 12 days.

In experiment 1, the sequential melatonin treatment (63.6%) positively influenced the increase of oocytes larger than 100 μm compared with the control (33.3%) and 1000 pg/ml melatonin group (26.7%). Previous studies have demonstrated that caprine oocytes smaller than 100 μm were not able to resume meiosis (CROZET et al., 2000). Thus, the gradual increase of melatonin concentration in the culture of caprine follicles is a crucial point for oocyte development, contributing to the higher rates of fully grown oocytes to in vitro maturation (IVM). Recent findings have shown that melatonin may be added to an IVM media, improving the oocyte cytoplasmic maturation and subsequent clinical outcomes in woman (KIM et al., 2013). Therefore, besides a long-term culture, an examination of oocyte maturation certainly should be performed in future experiments.

Considering the positive effect of FSH supplementation on caprine follicle development in vitro (SARAIVA et al. 2011; ARAÚJO et al. 2011) and the present pattern of

FSHR expression in follicles, we performed the experiment 2. At the end of the culture period, all sequential medium containing melatonin and/or FSH increased the percentage of morphologically normal follicles, antral cavity formation, follicular growth and the percentage of oocytes larger than 100 μm when compared with the control (α -MEM). Rocha et al (2013) have also demonstrated that caprine tissues cultured for 7 days in medium containing both FSH (50 ng/ml) and melatonin (1,000 pM) increased follicular and oocyte diameters compared to the control medium (α -MEM). Therefore, we suggest that both hormones act positively for oocyte growth, thus obtaining structures with convenient diameter to be destined to IVM. These findings encourage future studies of follicle culture since melatonin is cheaper than FSH.

In conclusion, this study demonstrated the presence of MT1 and FSHR protein in caprine ovaries, indicating the involvement of these hormones in the early stages of folliculogenesis. The presence of FSHR in oocyte of primordial and primary follicles suggests additional sites of FSH action in caprine ovaries. Furthermore, the use of defined concentrations of melatonin, added in specific moments of the culture and in a progressive way, can be successfully used to preserve follicle survival and promote caprine follicle and oocyte growth. New studies focused on the role of melatonin in in vitro maturation of caprine oocytes are important to better understand its mechanisms of action.

Acknowledgements

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Process 503746/2009-6). V. R. P. Barros is a recipient of a grant from FACEPE (Brazil).

References

- Adriaens, I., Jacquet, P., Cortvrindt, R., Janssen, K., and Smitz J. (2006) Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*. **228**, 333–343.
- Araújo, V.R., Silva, G.M., Duarte, A.B., Magalhães, D.M., Almeida, A.P., Gonçalves, R.F., Bruno, J.B., Silva, T.F., Campello, C.C., Rodrigues, A.P., and Figueiredo, J.R. (2011). Vascular endothelial growth factor-A (165) (VEGF-A(165)) stimulates the in vitro development and oocyte competence of goat preantral follicles. *Cell. Tissue Res*. **346**, 273-281.
- Brito, I.R., Lima, I.M., Saraiva, M.V., Silva, C.M., Magalhães-Padilha, D.M., Araújo, V.R., Barreto Luz, V., Barbalho Silva, A.W., Campello, C.C., Silva, J.R., and Figueiredo, J.R. (2012). Expression levels of mRNA-encoding PDGF receptors in goat ovaries and the influence of PDGF on the in vitro development of caprine pre-antral follicles. *Reprod. Domest. Anim*. **47**, 695-703.
- Cai, J., Lou, H.Y., Dong, M.Y., Lu, X., Zhu, Y.M., Gao, H.J., and Huang, H.F. (2007). Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. *Fertil. Steril.*, **87**, 1350– 1356.
- Camp, T.A., Rahal, J.O., and Mayo, K.E. (1991). Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol. Endocrinol*. **5**, 1405–1417.
- Chaves, R.N., Martins, F.S., Saraiva, M.V., Celestino, J.J., Lopes, C.A., Correia, J.C., Verde, I.B., Matos, M.H.T., Bao, S.N., Nome, K.P., Campello, C.C., Silva, J.R., and Figueiredo, J.R. (2008). Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev*. **20**, 640 –647.

Crozet, N., Dahirel, M., and Gall, L. (2000). Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **118**, 367-373.

Durlej, M., Knapczyk-Stwora, K., Duda, M., Galas, J., and Slomczynska, M. (2011). The Expression of FSH Receptor (FSHR) in the Neonatal Porcine Ovary and its Regulation by Flutamide. *Reprod. Domest. Anim.*, **46**, 377–384.

El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A.E., Sosa, G.A., El-Roos, M.E., and Nagai, T. (2011). Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 250-62.

Gao, C., Han, H.B., Tian, X.Z., Tan, D.X., Wang, L., Zhou, G.B., Zhu, S.E., and Liu, G.S. (2012). Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *J. Pineal Res.* **52**, 305–311.

Gutierrez, C.G., Ralph, J.H., Telfer, E.E., Wilmut, I., and Webb, R. (2000). Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **62**, 1322-1328.

Hoffman, G.E. (2008). Seeing Is Believing: Use of Antibodies in Immunocytochemistry and In situ Hybridization. In ‘Seeing Is Believing: Antibodies and How To use Them’. (Ed G. Hoffman G) pp. 03-17. (Washington, DC: Society for Neuroscience).

Hoffman, G.E., Wei, L.E., and Luciane, V. S. (2008). The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2.12**.

Kang, J.T., Koo, O.J., Kwon, H.J., Park, H.J., Jang, G., Kang, S.K., and Lee, S.C. (2009). Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J. Pineal Res.* **47**, 107.

Kim, M.K., Park, E.A., Kim, H.J., Choi, W.Y., Cho, J.H., Lee, W.S., Cha, K.Y., Kim, Y.S., Lee, D.R., and Yoon, T.K. (2013). Does supplementation of *in-vitro* culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS? *Reprod. Biomed. Online.* **26**, 22-29.

- Lee, C., Do, B.R., Lee, Y., Park, J., Kim, S., Kim, J., Roh, S., Yoon, Y., and Yoon, H. (2001). Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. *Mol. Reprod. Dev.* **59**, 126–132.
- Matos, M.H., Lima-Verde, I.B., Luque, M.C., Maia Jr., J.E., Silva, J.R., Celestino, J.J., Martins, F.S., Bao, S.N., Lucci, C.M., and Figueiredo, J.R. (2007). Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*. **15**, 173-182.
- Méduri, G., Charnaux, N., Driancourt, M.A., Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H., and Migrom, E. (2002). Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2266-2276.
- Niles, L.P., Wang, J., Shen, L., Lobb, D.K., and Younglai, E.V. (1999). Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **156**,107–110.
- Oktaç, K., Briggs, D., and Gosden, R.G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3748-3751.
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J., Zisapel, N., and Cardinali, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* **85**, 335–353.
- Reiter, R.J. (2000). Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol. Sci.* **15**, 246-250.
- Reiter, R.J., and TAN, D.X. (2003). Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc. Res.* **58**, 10–19.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., and Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. **13**, 1177–1185.

Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., and Gusella, J.F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**, 8734–8738.

Rocha, R.M.P., Matos, M.H.T., Lima, L.F., Saraiva, M.V.A., Alves, A.M.C.V., Rodrigues, A.P.R.R., and Figueiredo, J.R. (2011) Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. *Acta Veterinaria Brasilica*. **5**,147-157.

Rocha, R.M.P., Lima, L.F., Alves, A.M.C.V., Celestino, J.J.H., Matos, M.H.T., Lima-Verde, I.B., Bernuci, M.P., Lopes, C.A.P., Bão, S.N., Campello, C.C. Rodrigues, A.P.R., and Figueiredo, J.R. (2013). Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes in vitro development of caprine preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* **44**,1-9.

Saraiva, M.V., Rossetto, R., Brito, I.R., Celestino, J.J., Silva, C.M., Faustino, L.R., Almeida, A.P., Bruno, J.B., Magalhães, D.M., Matos, M.H., Campello, C.C., and Figueiredo, J.R. (2010). Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reprod. Sci.* **17**, 1135-1143.

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., and Bruno, J.B. (2011). 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*. **19**, 205-214.

Sharma, G.T., Dubey, P.K., and Kumar, G.S. (2011). Localization and Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral Follicles. *Reprod. Domest. Anim.* **46**, 114–120.

Silva, J.R.V., Van Den Hurk, R., Van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J., and Figueiredo, J.R. (2004). Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J. Endocrinol.* **183**, 405–415.

Soares, J.M., Masana, M.I., Ersahin, C., and Dubocovich, M.L. (2003). Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Ther Exp Pharmacol.* **306**, 694–702.

Takada, L., Junior, A.M., Mingoti, G.Z., Balieiro, J.C., Cipolla-Neto, J., and Coelho, L.A. (2012). Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. *Res. Vet. Sci.* **92**, 124-127.

Takasaki, A., Nakamura, Y., Tamura, H., Shimamura, K., and Morioka, H. (2003). Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. *Reprod. Med. Biol.* **2**, 139–144.

Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X., Sugino, N., and Reiter, R.J. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil. Steril.* **92**, 328-343.

Tamura, H., Takasak, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y., and Sugino, N. (2013). Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr.. J.* **60**, 1-13.

Tang, K., Yang, W.C., Xiang, L., Can-Jie, W., Lei, S., and Li-Guo, Y. (2012). GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, **131**, 129– 134.

Table 1. Relative intensity of immunohistochemical staining for MT1 in the ovaries of goats.

	Primordial	Primary	Secondary	Early	Large
Structure	follicle	follicle	follicle	antral follicle	antral follicle
Oocyte	-	-	-	-	-
Granulosa cell	-	-	+		
Cumulus cell				++	+++
Mural granulosa cell			-	++	+++
Theca cell				+/-	+/-

Immunostaining: (+/-) occasionally found; (-) absent; (+) weak; (++) moderate; (+++) strong.

Table 2. Relative intensity of immunohistochemical staining for FSHR in the ovaries of goats.

	Primordial	Primary	Secondary	Early	Large
Structure	follicle	follicle	follicle	antral follicle	antral follicle
Oocyte	++	++	-	-	-
Granulosa cell	+/-	+/-	++		
Cumulus cell				++	+++
Mural granulosa cell				++	+++
Theca cell			-	+/-	+/-

Immunostaining: (+/-) occasionally found; (-) absent; (+) weak; (++) moderate; (+++) strong.

Table 3. Percentage of oocyte recovery rate after 12 days of culture of caprine preantral follicles in the control or different melatonin treatment (experiment 1).

Treatments	Oocyte recovery (n)
Control	26,6 (7/30) ^b
MEL 100	50,0 (16/32) ^{ab}
MEL 1000	33,3 (11/32) ^b
Sequential MEL	63,6 (21/32) ^a

MEL: melatonin.

^{a,b}Differ among treatments.

Table 4. Percentage of oocyte recovery rate after 12 days of culture of caprine preantral follicles in the control or different melatonin and/or FSH treatment (experiment 2).

Tratamentos	Oocyte recovery (n)
Control	20,0 (13/60) ^b
Seq FSH	71,66 (43/60) ^a
Seq MEL	58,33 (35/60) ^a
Seq MEL + FSH	65,0 (39/60) ^a

MEL: melatonin.

^{a,b} Differ among treatments.

Figure captions

Figure 1. Immunolocalization of MT1 protein in caprine ovarian follicles. Negative control (A and F), primordial and primary (B), secondary (C), early antral (D) and large antral follicle (E). O: oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; TC: theca cell; Arrow: MGC: mural granulosa cell.

Figure 2. Immunolocalization of FSHR protein in caprine ovarian follicles. Negative control (A and G), primordial (B), primary (C), secondary (D), early antral (E) and large antral follicle (F). O: oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; TC: theca cell; Arrow: MGC: mural granulosa cell.

Figure 3. Secondary follicles at day 0 (A: Control; F: Sequential FSH), antral follicles after 6 (Fig. 3B; G) and 12 days (Fig. 3C; H) of culture, extruded (Fig. 3D; I) and degenerated follicles (Fig. 3E; J). Experiment 1: A-E and Experiment 2: F-J. o: oocyte; white arrow: antrum cavity; GC: granulosa cells. Scale bar: 100 μ m.

Figure 4. Experiment 1: Percentage of normal (A) and extruded follicles (B), antrum formation (C) and follicular diameter (D) in the control and different treatments using melatonin during 12 days of culture.

^{A,B} Comparison among treatments within the same day of culture; ^{a,b,c} Comparison between days of the same treatment ($P<0.05$).

Figure 5. Experiment 2: Percentage of normal (A) and extruded follicles (B), antrum formation (C) and follicular diameter (D) in the control and different sequential media during 12 days of culture.

^{A,B} Comparison among treatments within the same day of culture; ^{a,b,c} Comparison between days of the same treatment ($P < 0.05$).

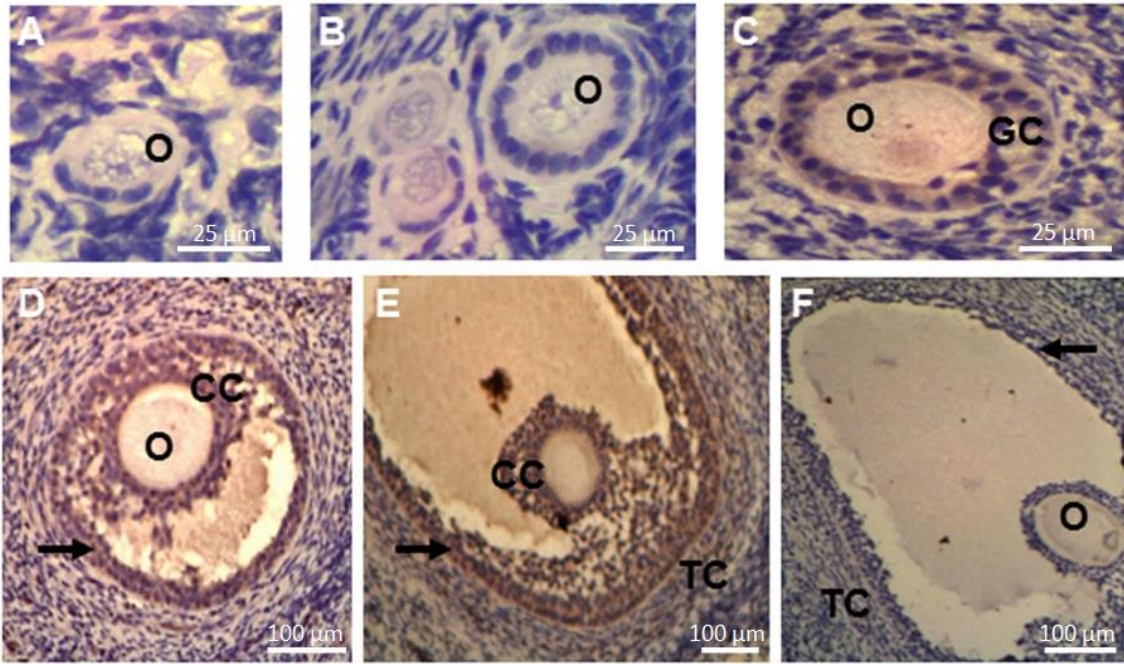


Figure 1.

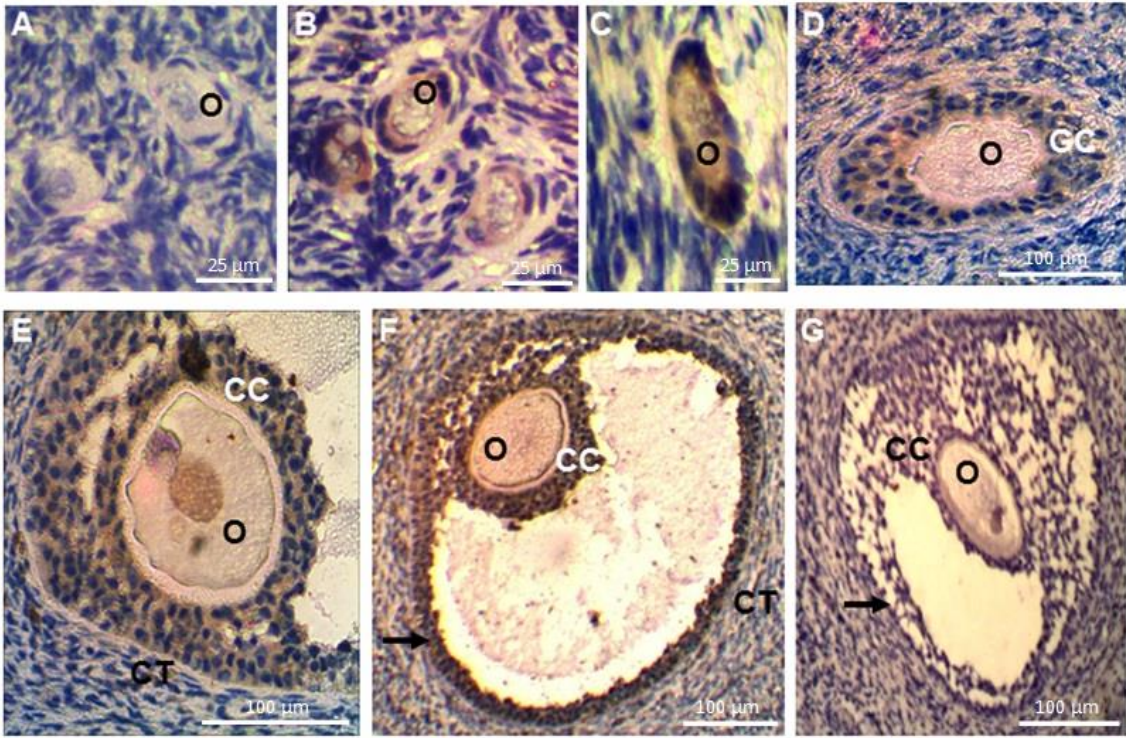


Figure 2.

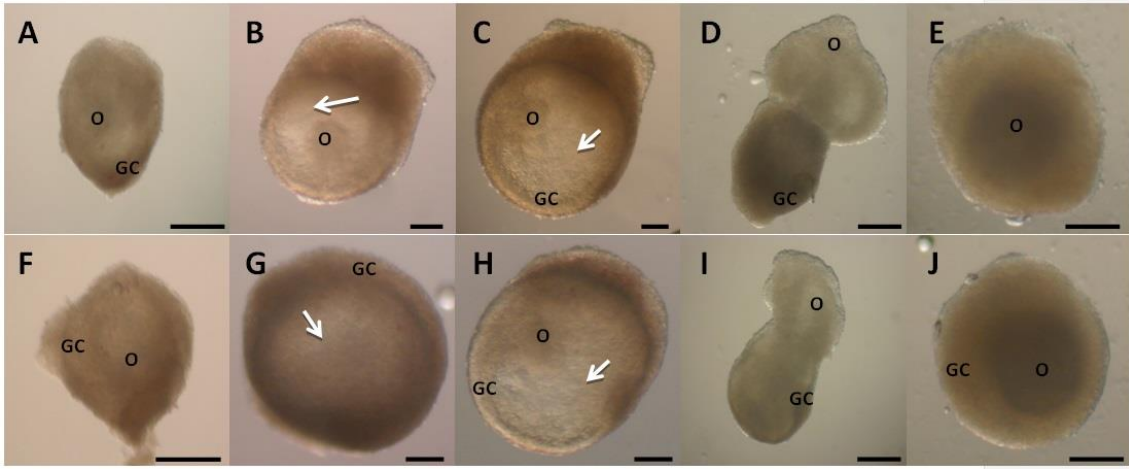


Figure 3.

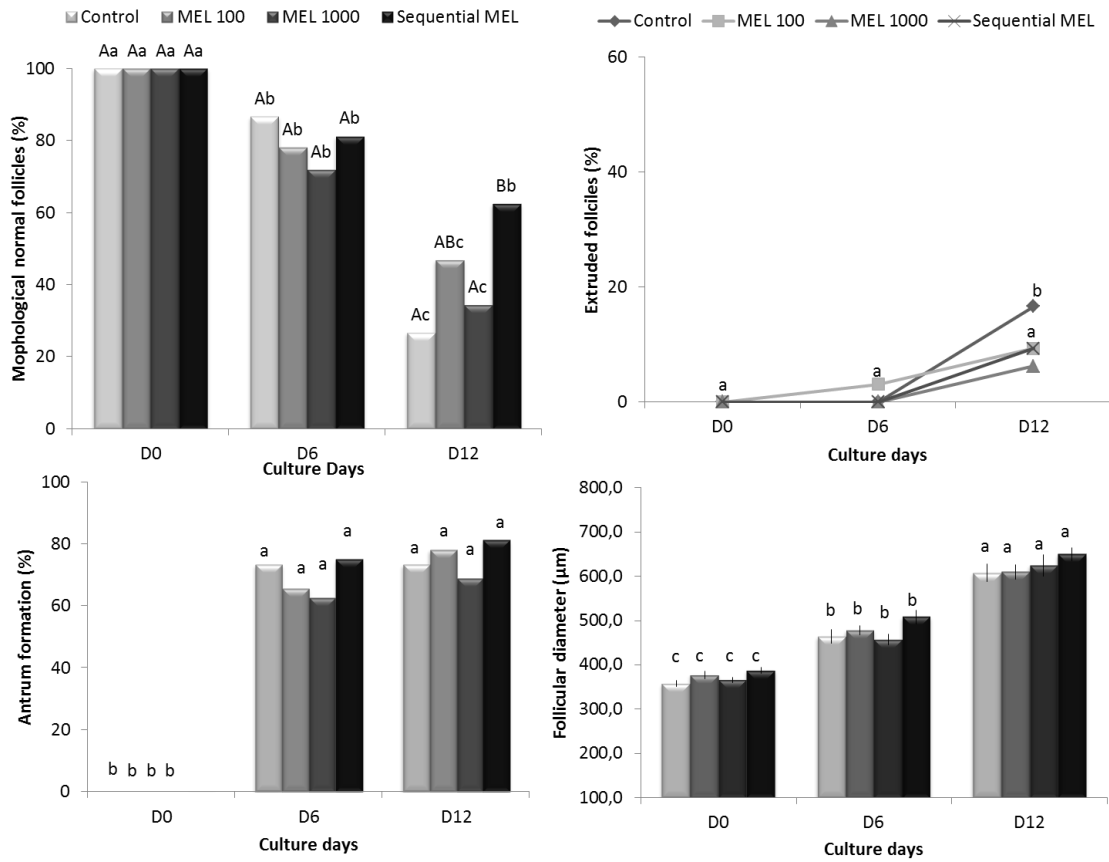


Figure 4.

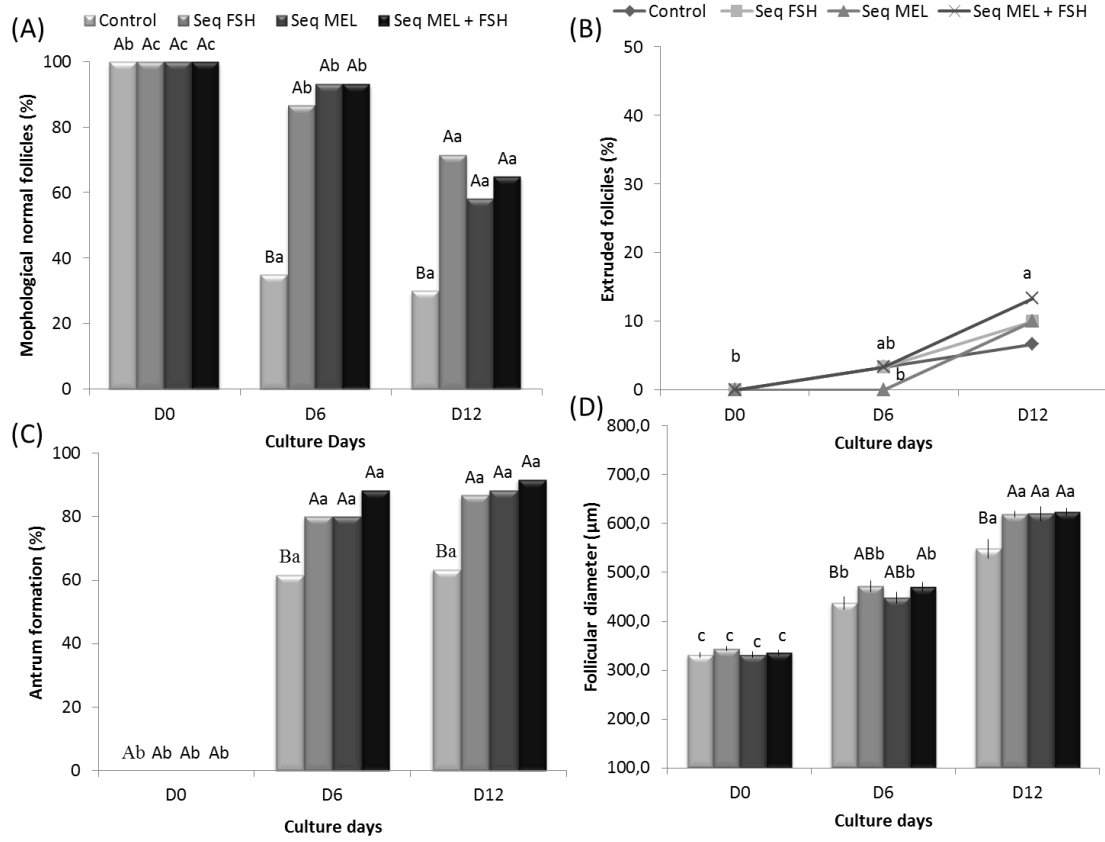


Figure 5.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou a presença dos receptores da melatonina (MT1) e hormônio folículo estimulante (FSHR) em ovários caprinos, bem como a importância da adição de forma sequencial destes hormônios no meio de cultivo durante o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados. Após os resultados obtidos, pode-se inferir que a melatonina desempenha um papel tão eficiente quanto o FSH, na obtenção de folículos saudáveis e oócitos com tamanhos apropriados para serem destinados a MIV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A. The effects of different concentrations of sodium selenite on the *in vitro* maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. **J Assis Reprod Gen**, v.25, p.483–488, 2008.
- ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A.A.; DAVOODI, D. Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. **Hum Reprod**, v.25,p.977–985, 2010.
- ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BENRAFAEL, Z. Turner`s syndrome and fertility: Current status and possible future projects. **Hum Reprod**. v. 7, p. 603-610, 2001.
- 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. **Histo and Histo**, v.21, p.887-898, 2006.
- ACKERT, C.L.; GITTENS, J.E.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J.; KIDDER, G.M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Dev Biol**, v.233, p.258–270, 2001.
- ADRIAENS, I.; JACQUET, P.; CORTVRINDT, R.; JANSSEN, K.; SMITZ, J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. **Toxicology**. v.228, p.333–343, 2006.
- ALILA-JOHANSSON, A.; ERIKSSON, L.; SOVERI, T.; LAAKSO, M. L. Seasonal variation in endogenous serum melatonin profiles in goats: A difference between spring and fall. **J Bio Rhyth**, v. 16, p. 254-263, 2001.
- AMORIM, C. A., RODRIGUES, A. P. R., LUCCI, C. M., FIGUEIREDO, J. R., GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Rum Res**, v.37, p.269-277, 2000.
- AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; RIMON, E.; LAND, A.; COHEN, T.; DOR, Y.; HIRSH, L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Bio Pharml**, v. 66, p. 1355-1362, 2003.
- ANDRADE, E.R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L.A.; HERTEL, M.F.; MELO-STERZA, F.A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v.5, p.1-10, 2012.
- ARAÚJO, V.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.; MAGALHÃES, D.M.; ALMEIDA, A.P.; GONÇALVES, R.F.; BRUNO, J.B.; SILVA, T.F.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES,

A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Vascular endothelial growth factor-A (165) (VEGF-A(165)) stimulates the *in vitro* development and oocyte competence of goat preantral follicles. **Cell. Tissue Res.** v.346, p.273-281, 2011.

ARENDRT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Rev Reprod**, v.3, p.13–22, 1998.

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 Rum 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.884-94, 2010.

BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reprod. Update**, v. 12, p. 537-55, 2006.

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

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 67, p. 162-7, 2004.

BEZERRA, M.B.; RONDINA, D.; LIMA, A.K.F.; OLIVEIRA, L.C.; CECCHI, R.; LUCCI, C.M.; GIORGETTI, A. & FIGUEIREDO, J.R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.8, p.47-56, 1998.

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

BRITO, I.R.; LIMA, I.M.; SARAIVA, M.V.; SILVA, C.M.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ARAÚJO, V.R.; BARRETO LUZ, V.; BARBALHO SILVA, A.W.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Expression levels of mRNA-encoding PDGF receptors in goat ovaries and the influence of PDGF on the *in vitro* development of caprine pre-antral follicles. **Reprod. Domest. Anim.** v.47, p.695-703, 2012.

BORNMAN, M.S.; OOSTHUIZEN, J.M.; BARNARD, H.C.; SCHULENBURG, G.W.; BOOMKER, D.; REIF, S. Melatonin and sperm motility. **Andrologia**, v. 21, p.483-5, 1989.

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

BUTCHER, L.; ULLMANN, S.L. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. **Reprod, Fertil Dev**, v. 8, p. 535-9, 1996.

- CAI, J.; LOU, H.Y.; DONG, M.Y.; LU, X., ZHU; Y.M.; GAO, H.J.; HUANG, H.F. Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. **Fertil. Steril.**, v.87, p.1350–1356, 2007.
- CAMP, T.A.; RAHAL, J.O.; MAYO, K.E. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. **Mol. Endocrinol.** v.5, p.1405–1417, 1991.
- CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. **Biol Reprod**, v. 60, p. 594-601, 1999.
- CHATTORAJ, A.; BHATTACHARYYA, S.; BASU, D.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S.; MAITRA, S.K. Melatonin accelerates maturation inducing hormone (MIH): induced oocyte maturation in carps. **Gen Comp Endocrinol.**, v.140, p.145–55, 2005.
- CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.; CELESTINO, J.J.; LOPES, C.A.; CORREIA, J.C.; VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; BAO, S.N.; NOME, K.P.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. 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.
- CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; RODRIGUES, G.Q.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; LOPES, C.A.P.; ALMEIDA, A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MOURA, A.A.A.; LOBO, C.H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The Effects of Insulin and Follicle-Simulating Hormone (FSH) During In Vitro Development of Ovarian Goat Preantral Follicles and the Relative mRNA Expression for Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles. **Bio Reprod.**, v.87, p.1–11, 2012.
- CHEN, Q.; YANO, T.; MATSUMI, H.; OSUGA, Y.; YANO, N.; XU, J.; WADA, O.; KOGA, K.; FUJIWARA, T.; KUGU, K.; TAKETANI, Y. Cross-talk between fas/fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. **Endocrinology**, v.146, p.808-815, 2005.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. **Reprod Domest Anim.** v.36(1), p.3-9, 2001.
- CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev.**, v.9(1), p.11-24, 2005.
- CORMACK, D.H. **O sistema reprodutor feminino.** In: CORMACK, D.H. Ham Histologia, 9a edição, Ed. Guanabara Koogan, Brasil, p. 485-508, 1991.
- CROZET, N.; DAHIREL, M.; GALL, L. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. **J. Reprod. Fertil.** V.118, p.367-373, 2000.

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

DUBOCOVICH, M.L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine**. v.27, p.101–110, 2005.

DURLEJ, M., KNAPCZYK-STWORA, K., DUDA, M., GALAS, J., AND SLOMCZYNSKA, M. The Expression of FSH Receptor (FSHR) in the Neonatal Porcine Ovary and its Regulation by Flutamide. **Reprod. Domest. Anim.**, v.46, p.377–384, 2011.

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

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A.E.; SOSA, G.A.; EL-ROOS, M.E.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Mol. Reprod. Dev.** v.78, p.250-62, 2011.

EPPIG, J.J. & O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Bio Reprod**, v. 54, p.197-207, 1996.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001.

ERICKSON, G.F. **An analysis of follicles development and ovum maturation**. In: Seminars in Reproductive Endocrinology, san Diego-California, p.233-254, 1986.

FABBRI, R.; PASQUINELLI, G.; PARAZZA, I.; MACCIOCCA, M.; MAGNANI, V.; BATTAGLIA, C.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Effects of cyclic increase in gonadotropins on the *in vitro* development of primordial follicles to antral stage. **Ultrastruct Pathol**. v.36, p.356-61, 2012.

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

FARNWORTH, P.G. Gonadotrophin secretion revised – how many ways can FSH leave a gonadotroph. **J Endocrinol**, v.145, p.387-395, 1995.

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

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A; 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. 303-328, 2008.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P; SILVA, J.R.; SANTOS, R.R. Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. **Reprod Fertil Dev.**, v.23(1), p.40-7, 2011.

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

FONSECA, J. F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos.** In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia; XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia. Anais, p. 16, 2005.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The Primordial to Primary Follicle Transition. **Mol Cell Endocrin.**, v. 163, p. 53-60, 2000.

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

GAO, M.; WANG, Y.; WU, X. *In vitro* maturation of immature oocytes from preantral follicles in prepuberal mice. **J Reprod Cont.** v.18, p.25–32, 2007.

GAO, C.; HAN, H.B.; TIAN, X.Z.; TAN, D.X.; WANG, L.; ZHOU, G.B.; ZHU, S.E.; LIU, G.S. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **J. Pineal Res.** v.52, p.305–311, 2012.

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

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Ann Endocrinol (Paris)**. v.71(3), p.132-43, 2010.
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*. **Biol. Reprod.**, v.62, 1322-1328, 2000.

HARDELAND, R.; REITER, R.J.; POEGGELER, B.; TAN, D.X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.17, p.347–357, 1993.

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine.**, v.27, p.119-30, 2005.

HILLIER, S.G.; KITCHNER, H.C.; NEILSON, J.P. **Scientific essentials of reproductive medicine**. London: WB Saunders. p.32-44, 1996.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, v. 100, p. 333–339, 1994.
HOFFMAN, G.E.; WEI, L.E.; LUCIANE, V. S. The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical. **Curr. Protoc. Neurosci.** v.2, p.12, 2008.

HOFFMAN, G.E. **Seeing Is Believing: Use of Antibodies in Immunocytochemistry and In situ Hybridization**. In 'Seeing Is Believing: Antibodies and How To use Them'. (Ed G. Hoffman G) pp. 03-17. (Washington, DC: Society for Neuroscience), 2008.

HOFFMAN, G.E.; WEI, L.E.; LUCIANE, V. S. The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical. *Curr. Protoc. Neurosci.* V.2.p.12, 2008.

HORNICK, J.E.; DUNCAN, F.E.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow *in vitro*. **Hum Reprod**, v.0, p.1–10, 2012.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal site of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. v.49, p.665–670, 1993.
HSU, S.Y.; HSUEH, A.J.W. Hormonal regulation of apoptosis an ovarian perspective. **Trends Endocrinol Metab.** v. 8, p. 207-213, 1997.

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

HUTT, K. J.; ALBERTINI, D. F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. **Reprod Biomed Online**, v. 14, p. 758-764, 2007.

ITOH M.T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Mol Hum Reprod**. v.5, p.402–8, 1999.

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.

JENNINGS, R.B.; GANOTE, C.E.; REIMER, K.A. Ischemic tissue injury. **Ameri J Path.**, v.81, p.179-197, 1975.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v.45, p.889-895, 1996.

JORIO, A.; MARIANA, J. C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D`man and Timahdite sheep. **Anim Reprod Scien**, v. 26, p. 239-250, 1991.

KANG, J.T.; KOO, O.J.; KWON, H.J.; PARK, H.J.; JANG, G.; KANG, S.K.; LEE, S.C. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **J. Pineal Res.** v.47, p.107, 2009.

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

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

KIDDER, G.M.; WINTERHAGER, E. Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. **Frontiers in Bioscience.** v. 6, p.731–736, 2001.

KIM, J. K.; LEE, C. J. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. **Mutation Research**, v. 449, p. 33-39, 2000.

KIM, M.K.; PARK, E.A.; KIM, H.J.; CHOI, W.Y.; CHO, J.H.; LEE, W.S.; CHA, K.Y.; KIM, Y.S.; LEE, D.R.; YOON, T.K. Does supplementation of in-vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS? **Reprod. Biomed. Online.** v.26, p.22-29, 2013.

KIVELA, A.; KAUPPILA, A.; LEPPALUOTO, J.; VAKKURI, O. Serum and amniotic fluid melatonin during human labor. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.69, p.1065-1068, 1989.

KOPPISETTI, S.; JENIGIRI, B.; TERRON, M.P.; TENGATTINI, S.; TAMURA, H.; FLORES, L.J.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Reactive oxygen species and the hypomotility of the gall bladder as targets for the treatment of gallstones with melatonin: a review. **Dig Dis Sci.**, v.53, p.2592-2603, 2008.

LEE, C.; DO, B.R.; LEE, Y.; PARK, J.; KIM, S.; KIM, J.; ROH, S.; YOON, Y.; YOON, H. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. **Mol. Reprod. Dev.** 59, 126–132, 2001.

LENIE, S.; CORTVRINDT, R.; ADRIAENSSENS.; SMITZ, J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. **Biol Reprod.** v. 71, p. 1730-1738, 2004.

LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.; ALVES, A.M.; SARAIVA, M.V.; ARAÚJO, V.R.; LIMA, I.M.; LOPES, C.A.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured in vitro. **Homeopathy.** v.102, p. 41-8, 2013.

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

LIU, L.; RAJAREDDY, S.; REDDY, P.; DU, C.; JAGARLAMUDI, K.; SHEN, Y.; GUNNARSSON, D.; SELSTAM, G.; BOMAN, K.; LIU, K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. **Development**, v. 34, p. 199–209, 2007.

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Develop. Bio.**, v. 299, p. 1-11, 2006.

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

LORET DE MOLA, J.R.; BARNHART, K.; KOPF, G.S.; HEYNER, S.; GARSIDE, W.; COUTIFARIS, C.B. Comparison of two culture systems for the in-vitro growth and maturation of mouse preantral follicles. **Clin Exp Obste Gyneco**, v.31, p.15–19, 2004.

MAGALHÃES, D.M.; ARAÚJO, 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. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v.33, p. 91-97, 2009.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011.

MANJUNATHA, B.M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P.S.P.; RAVINDRA J.P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on Buffalo *In vitro* embryo development. **Reprod. Domest. Anim.** v.44, p.12-16, 2009.

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

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFRERE S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertili Sterili**. v. 82, p. 1390-1394, 2004.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; 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. **Reprod Fert Develop**, v. 20, p. 916-924, 2008.

MASANA, M. I.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Sci STKE.**, v. 107, p.39, 2001.

MATOS, M.H.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.; MAIA JR., J.E.; SILVA, J.R.; CELESTINO, J.J.; MARTINS, F.S.; BAO, 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, 173-182, 2007a.

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; LOPES, C.A.; MARTINS, F.S.; SANTOS, K.D.; ROCHA, R.M.; SILVA, J.R.; BÃO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. **Reprod Fertil Dev.** v.19, p.677-84, 2007b.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **J Reprod Dev.**, v.58, p.44-50, 2012.

McGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S.Y.; CHUN, S.Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A.J.W. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3-5-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v.138, p.2417–24, 1997.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1-11, 2009.

MCLAUGHLIN, M; BROMFIELD, J.J.; ALBERTINI, D.F. et al. 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.

MEREDITH, S.; JACKSON, K.; DUDENHOEFFER, G.; GRAHAM, L.; EPPLE, J. Long-term supplementation with melatonin delays reproductive senescence in rats, without an effect on number of primordial follicles. **Exp Gerontol.** v.35, p.343-52, 2000.

NILES, L.P.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D.K.; YOUNGLAI, E.V. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. **Mol. Cell. Endocrinol.** V.156, p.107–110, 1999.

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

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. **Mol Cell End.**, v. 12, p. 19–25, 2004.

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. **Bio Reprod**, v. 68, p.1682–1686, 2003.

OKTAY, K., BRIGGS, D., AND GOSDEN, R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.82, p.3748-3751, 1997.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G.; AKMAN, O.; OJAKIAN, G. K.; OKTAY, M. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. **Biol Reprod.**, v. 63, n. 2, p. 457–61, 2000.

OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. **Hum Reprod.** v.25, p.2944-54, 2010.

O'SHAUGHNESSY, P.J.; DUDLEY, K.; RAJAPAKSHA, W.R.A.K.J.S. Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. **Mol Cell Endocri**, v.125, p.169-175, 1996.

PANDI-PERUMAL, S.R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W.; MAESTRONI, G.J.; ZISAPEL, N.; CARDINALI, D.P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Prog. Neurobiol.** v.85, p.335–353, 2008.

PEREZ, G.I.; ROBLES, R.; KNUDSON, C.M.; FLAWS, J.A.; KORSMEYER, S.J.; TILLY, J.L. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. **Nat Genet.**, v. 21, p. 200-203, 1999.

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.

POEGGELER, B.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; CHEN, L.D.; MANCHESTER, L.C. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. **J Pineal Res.**, v.14, p.151-68, 1993.

RACHID, M.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, V.A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v. 52, p. 6, 2000.

RATTS, V.S.; FLAWS, J.A.; KOLP, R.; SORENSON, C.M.; TILLY, J.L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the postnatal female mouse gonad. **Endocrinology.**, v.136, p. 3665-3668, 1995.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Vet Path**, v.42, p 405–426, 2005.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends Endo. Metab.**, v. 21, n. 2, 2010.

REITER, R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **News Physiol. Sci.** v.15, p.246-250, 2000.

REITER, R.J.; TAN, D.X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. **Cardiovasc. Res.** v.58, p.10–19, 2003.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; PAREDES, S.D.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M. Melatonin and reproduction revisited. **Biol. Reprod.** v.81, p.445-456, 2009.

REPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron.** v.13, p.1177–1185, 1994.

REPERT, S.M.; GODSON, C.; MAHLE, C.D.; WEAVER, D.R.; SLAUGENHAUPT, S.A.; GUSELLA, J.F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.92, p.8734–8738, 1995.

REPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol Sci.,** v.17, p.100-2, 1996.

RICHARDS, J. S.; PANGAS, S. A. The ovary: basic biology and clinical implications. **J Clin Invest.,** v. 120, n. 4, p. 963–972, 2010.

ROCHA, R.M.P.; MATOS, M.H.T.; LIMA, L.F.; SARAIVA, M.V.A.; ALVES, A.M.C.V.; RODRIGUES, A.P.R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica.** v.5,p.147-157, 2011.

ROCHA, R.M.P.; LIMA, L.F.; ALVES, A.M.C.V.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; BERNUCI, M.P.; LOPES, C.A.P.; BÃO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.44,p.1-9, 2013.

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 Vet Bras,** v. 4, n. 3, p. 144-152, 2010.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **J Clin Endocrinol Metab.,** v.71, p.493–496, 1990.

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.; BÃO, 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. **Domest Anim Endocrinol.**, v.37, p.112-123, 2009.

ROUSSEAU, A.; PETREN, S.; PLANNTIN, J.; EKLUNDH, T.; NORDIN, C. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin: a pilot study in healthy male volunteers. **J Neural Transm.**, v.106, p.883-888, 1999.

SARAIVA, M.V., ROSSETTO, R., BRITO, I.R., CELESTINO, J.J., SILVA, C.M., FAUSTINO, L.R., ALMEIDA, A.P., BRUNO, J.B., MAGALHÃES, D.M., MATOS, M.H., CAMPELLO, C.C., AND FIGUEIREDO, J.R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reprod. Sci.** **17**, 1135-1143, 2010.

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., AND BRUNO, J.B. 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.** v.19, p.205-214, 2011.

SALESSE, R.; REMY, J.J.; LEVIN, J.M.; JALLAL, B.; GARNIER, J. Towards understanding the glycoprotein hormone receptors. **Biochimie**, v.73, p.109-120, 1991.

SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I.R. Dynamic medium containing FSH, LH and EGF produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Acta Sci Vet**, v.38, p.712, 2010b.

SCHAEFFER, H.J.; SIROTKIN, A.V. Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. **Exp. Clin. Endocr. Diab.** v.105, p.109–112, 1997.

SCHINDLER, A.E.; CHRISTENSEN, B.; HENKEL, A.; OETTEL, M.; MOORE, C. High-dose pilot study with the novel progestogen dienogest in patients with endometriosis. **Gynecol Endocrinol.**, v. 22, p.9-17, 2006.

SERAFIM, M.K.B.; ARAUJO, 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, J.M.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

SCHAEFFER, H.J.; SIROTKIN, A.V. Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, v.105, p.109-12. 1997.

SHARMA, G.T.; DUBEY, P.K.; KUMAR, G.S. Localization and Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral Follicles. **Reprod. Domest. Anim.** v.46, p.114–120, 2011.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reprod. Update**, v. 11, n. 5, p. 461, 2005.

SILVA, C.M.; CASTRO, S.V.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, G.Q.; BRITO, I.R.; ROSSETTO, R.; SARAIVA, M.V.; CAMPELLO, C.C.; LOBO, C.H.; SOUZA, C.E.; MOURA, A.A.; DONATO, M.A.; PEIXOTO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Res Vet Sci**. [Epub ahead of print] 2012.

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.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 8, p. 14-24, 2011.

SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de foliculos e embriões. **Rev Bras Reprod Anim**, v.34, p.233-242, 2010.

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, 2006b.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T.A.; ROELEN, B.A.J.; FIGUEIREDO, J.R. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **J. Endocrinol.** v.183, p.405–415, 2004b.

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

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.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. **Zygote**, v.14, p. 107–117, 2006a.

SOLÓRZANO, S.M.A.; CARRANZA, M.E; PEDERNERA, E.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, A.J. LUNA, M.; ARÁMBURO, C. Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken ovary: Effects of GH on steroidogenesis in cultured follicular granulosa cells. **Gen Comp Endocrinol.**, v.175, p.297–310, 2012.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, W.D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.; BHATNAGAR, K. P.; BRZEZINSKI, A. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. *Gynec Endocrin*, v. 25, p.779–785, 2009.

SOARES JÚNIOR, J.M.; MASANA, M.I.; ERSAHIN, C.; DUBOCOVICH, M.L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Ther Exp Pharmacol*. 306, 694–702, 2003.

SMITZ, J.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J.E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H.M.; PLANCHA, C.; SHEA, L.D.; STOUFFER, R.L.; TELFER, E.E.; WOODRUFF, T.K.; ZELINSKI M.B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod*, v.16, p.395–414, 2010.

SOARES, J.M.JR.; MASANA, M.I.; ERSAHIN, C.; DUBOCOVICH, M.L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous *J Pharmacol Exp Ther*. v.306,p. 694–702, 2003.

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

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

TAKADA, L.; JUNIOR, A.M.; MINGOTI, G.Z.; BALIEIRO, J.C.; CIPOLLA-NETO, J.; COELHO, L.A. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. *Res. Vet. Sci*. v.92, p.124-127, 2012.

TAKASAKI, A.; NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H. Melatonin as a new drug for improving oocyte quality. *Reprod. Med. Biol*. v.2, p.139–144, 2003.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N.; KATO, H. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *J Pineal Res*, v.25, p.135–141, 1998.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; NARIMATSU, A.; YAMAGATA, Y.; TAKASAKI, A.; REITER, R.J.; SUGINO, N. Melatonin treatment in peri- and postmenopausal women elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels without influencing total cholesterol levels. *J Pineal Res.*, v.45, p.101-105 2008a.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R.J.; SUGINO, N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, v.44, p.280–287, 2008b.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertil. Steril.** v.92, p.328-343, 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **J Ovarian Res.** v.26;p. 5:5, 2012.

TAMURA, H.; A., TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocr. J.** v. 60, p.1-13, 2013.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; TERRON, M.P.; FLORES, L.J.; REITER, R.J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J. Pineal Res.** v.42, p.28-42, 2007.

TANAVDE, V.S.; MAITRA, A. *In vitro* modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. **Endocr Res.**, v.29, p.399–410, 2003.

TANG, K.; YANG, W.C.; XIANG, L.; CAN-JIE, W.; LEI, S.; LI-GUO, Y. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.131, p.129– 134, 2012.

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. **Hum Reprod**, v. 23, p. 1151-1158, 2008.

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.

VAKKURI, O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. **Acta Physiol Scand.**, v.124, p. 409-412, 1985.

VALDEZ, K.E.; CUNEO, S.P.; TURZILLO, A.M. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. **Reproduction**, v.130, p.71-81, 2005.

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

VIJAYALAXMI, THOMAS, C.R.JR.; REITER, R.J.; HERMAN T.S. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. **J Clin Oncol.** v.20, p.2575-2601, 2002.

WEHR, T.; AESCHBACH, D.; DUNCAN,W. Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system. **Jf Phys**, v.535, p.937–951, 2001.

WANG, X.; CATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. ***Reproduction***. v.141, p.183-91, 2011.

WOO M.M.M.; TAI C.J.; KANG S.K.; NATHWANI, P.M.; PANG, S.F.; LEUNG, P.C.K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. ***J Clin Endocrinol Metab.***, v.86, p.4789–97, 2001.

WITT-ENDERBY, P.A.; BENNETT, J.; JARZYNKA, M.J.; FIRESTINE, S.; MELAN, M.A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. ***Life Sci.***, v.72, p.2183-98, 2003.

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. ***Hum Reprod***, v.14, p.1555–1562, 1999.

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, p. 233-240, 2007.

YIE, S.; NILES, L.; YOUNGLAI, E. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. ***J Clin Endocrinol Metab.***, v.80, p.1747–1749, 1995.

ZHAO, J. **Development of rat preantral follicles**. PhD thesis, Utrecht University, The Netherlands, 2000.

ZHOU, H., ZHANG Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. ***Dom Anim Endoc***, v.28, p.235-242, 2005.