



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

Jamile Maiara da Silva Santos

**EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO  
FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) EM OVÁRIOS OVINOS E SEU  
EFEITO SOBRE A APOPTOSE E O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS**

Petrolina - PE  
2013

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

Jamile Maiara da Silva Santos

**EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO  
FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) EM OVÁRIOS OVINOS E SEU  
EFEITO SOBRE A APOPTOSE E O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Tavares de Matos

Petrolina - PE  
2013

À minha Mãe, que me ensinou  
as coisas mais essenciais da vida.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Apesar de vivermos com o relógio em nossos pulsos, muitas vezes não nos damos conta de que tudo tem uma hora para começar e uma hora para terminar. Chegou à hora de terminar um ciclo na minha vida, o mestrado. Venho agradecer a algumas pessoas que tornaram esse sonho possível e manifesto a minha gratidão a todas elas...

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meus passos, pelas oportunidades e vitórias obtidas. Agradeço por sempre estar comigo me orientando a tomar decisões corretas, sempre me proporcionando força e coragem para conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, especialmente a minha mãe, Maria Luiza de Jesus Santos, por tanto amor, carinho, compreensão e pedidos de calma. Por me ensinar a ser persistente e determinada. Ela sabe o quanto foi difícil a trajetória para chegar até aqui... A ela, ficam os meus infindáveis agradecimentos.

Ao meu irmão José Cleub Silva Santos Júnior, pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo incentivo e pelos diversos conselhos.

À minha Tia Azinda, que considero como minha segunda mãe, pessoa muito especial e querida para mim. Obrigada por sempre me apoiar.

A uma pessoa muito especial: Marcio Pedro, por ter me ajudado a ter forças para seguir em frente. Sei da sua contribuição e o quanto estou feliz por encontrar em você uma coragem inexplicável.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos. Obrigada pela disponibilidade de orientação, por ter acreditado em mim, por colaborar com o meu crescimento profissional e por ser um exemplo de quem ama o que faz.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV), pelos momentos de discussão e aprendizado. Vocês foram muito importantes nessa caminhada. Agradeço a todos: Bruna Gouveia, Ricássio Barberino, Thae Lanne Lins, Taís Macedo, Luciana Santos, Éllida Bezerra, Yasmin Cavalcante, Vanessa Barros e Rodrigo Gonçalves. Aos que passaram pelo laboratório: Luanna Oliveira e Diego Costa: obrigada por fazerem parte da minha história. À Vanúzia Menezes, obrigada pelas conversas, não somente em assuntos científicos, mas também assuntos pessoais.

Aos professores do Curso da Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pelo apoio e ensinamentos durante esses dois anos de Mestrado.

Especialmente, à Professora Márcia Medeiros de Araújo, que sempre esteve atenta e disposta a me ajudar. Obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo financiamento do projeto (PROCESSO: 482306/2010-6).

À banca de defesa, por colaborarem com o enriquecimento deste trabalho, fortalecendo a minha formação científica.

Só me resta, uma imensa gratidão àquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

## **Epígrafe**

**"No meio de toda dificuldade  
encontra-se a oportunidade."  
(Albert Einstein)**

**SANTOS, J.M.S. EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) EM OVÁRIOS OVINOS E SEU EFEITO SOBRE A APOPTOSE E O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina. Orientadora: Maria Helena Tavares de Matos.**

## **RESUMO**

Os objetivos deste estudo foram avaliar a expressão do FGF-2 nas diferentes categorias (folículo primordial, primário, secundário e antral) e compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa e da teca) e os efeitos do FGF-2 sobre a apoptose e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos. Ovários ovinos (n=12) foram coletados em abatedouro local e destinados à técnica de imunohistoquímica, na qual foi utilizado anticorpo policlonal anti-FGF-2 humano (1:40). A imunocoloração foi classificada como ausente, fraca, moderada ou forte. Para o cultivo *in vitro*, 6 pares adicionais foram coletados, divididos em oito fragmentos de 3x3x1 mm. Um fragmento foi destinado à histologia (controle fresco) e os fragmentos restantes cultivados por 7 dias em meio de cultivo de base (controle -  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) adicionado de suplementos. Para testar o efeito do FGF-2, os fragmentos ovarianos foram cultivados em meio controle ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) sozinho ou adicionado de diferentes concentrações de FGF-2 (1, 10, 50, 100 ou 200 ng/mL). A técnica de TUNEL foi realizada utilizando-se um kit de detecção *in situ* de morte celular. As porcentagens de folículos morfológicamente normais, primordiais e em crescimento, bem como a porcentagem de células apoptóticas foram submetidas ao Teste de Tukey e qui-quadrado, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Os resultados mostraram que a expressão da proteína do FGF-2 foi considerada moderada em oócitos de folículos primordiais, primários e secundários e fraca em células da granulosa de folículos secundários, antrais iniciais e avançados. A porcentagem de folículos normais foi similar ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, 1 e 10 ng/mL de FGF-2 e significativamente maior ( $P < 0,05$ ) do que os demais tratamentos. Houve ativação folicular em todos os tratamentos comparados ao controle fresco. Adicionalmente, tecidos tratados com 10 ng/mL de FGF-2, apresentaram diâmetro folicular significativamente superior ao controle fresco, ao meio controle e 1 ng/mL de FGF-2, além de reduzirem ( $P < 0,05$ ) a taxa de apoptose das células foliculares, comparado aos folículos cultivados nos demais tratamentos. Em conclusão, oócitos de folículos pré-antrais e células da granulosa de folículos secundários e antrais ovinos apresentaram expressão para a proteína do FGF-2. Além disso, a concentração de 10 ng/mL de FGF-2 reduziu a apoptose e estimulou o crescimento de folículos pré-antrais ovinos.

**Palavras-chave:** Ovário, oócito, FGF-2, imunohistoquímica, cultivo.

**SANTOS, J.M.S. EXPRESSION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 (FGF-2) IN OVINE OVARIES AND ITS EFFECT ON PREANTRAL FOLLICLE APOPTOSIS AND GROWTH *IN VITRO*. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina. Orientadora: Maria Helena Tavares de Matos.**

### **ABSTRACT**

The aims of this study were to evaluate FGF-2 expression in different categories (primordial, primary, secondary and antral follicles) and follicular compartments (oocyte, granulosa and theca cells) and its effects on ovine preantral follicle apoptosis and development *in vitro*. Ovine ovaries (n=12) were collected at a local slaughterhouse and destined to immunohistochemistry technique, in which human FGF-2 polyclonal antibody was used (1:40). Immunostaining was classified as absent, weak, moderate or strong. For *in vitro* culture, 6 additional pairs of ovaries were collected, divided into eight fragments of 3x3x1 mm. One fragment was destined to histology (fresh control) and the remaining fragments were cultured for 7 days in basic culture medium (control -  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) with supplements. For testing the effect of FGF-2, ovarian fragments were cultured in the control medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) alone or with FGF-2 concentrations (1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL). TUNEL technique was performed using a kit for *in situ* death cell detection. The percentage of morphologically normal follicles, primordial and growing follicles, as well as the percentage of apoptotic cells, were submitted to Tukey's test and Qui-square, respectively (P<0.05). The results showed that FGF-2 protein expression was moderate in oocytes of primordial, primary and secondary follicles, and weak in granulosa cells of secondary and antral follicles. The percentage of normal follicles was similar (P>0.05) among  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, 1 and 10 ng/mL FGF-2 and significantly higher (P<0,05) than other treatments. There was follicular activation in all treatments compared with the fresh control. Moreover, tissues cultured with 10 ng/mL FGF-2 showed a significantly higher follicular diameter than control medium and 1 ng/mL FGF-2. In addition, 10 ng/mL FGF-2 reduced (P<0.05) the apoptosis rate of follicular cells compared with the follicles cultured in other treatments. In conclusion, oocytes from ovine preantral follicles and granulosa cells from secondary and antral follicles showed expression for FGF-2 protein. Furthermore, at 10 ng/mL, FGF-2 reduced follicular apoptosis and stimulated ovine preantral follicle growth.



## LISTA DE TABELAS

	<b>Páginas</b>
<b>Capítulo 1.</b>	
<b>Tabela 1.</b> Relative intensity of immunohistochemical staining for FGF-2 in the ovaries of sheep.	71
<b>Tabela 2.</b> Mean oocyte and follicular diameter (mean $\pm$ SD) in the fresh control and after <i>in vitro</i> culture of ovine preantral follicle in different concentrations of FGF-2.	72

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do ovário mamífero. Adaptado de <a href="http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html">http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html</a> .	21
<b>Figura 2.</b> Classificação dos folículos pré-antrais e antrais. Folículo primordial (A), transição (B), primário (C), secundário (D) terciário (E) e pré-ovulatório (F). N: Núcleo, O: oócito, G: células da granulosa, ZP: zona pelúcida, CT: células da teca, A: antro. (Adaptado de Silva et al., 2004).	22
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas de apoptose e necrose. (Adaptado de HAIL et al., 2006).	31
<b>Figura 4.</b> Análise filogenética dos 22 genes membros da família FGF em humanos. Estas análises sugerem que esses membros podem se agrupar em 7 subfamílias ( Adaptado de ITOH & ORNITZ, 2004).	37
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do receptor de FGF. O FGFR contendo 3 domínios extracelulares do tipo IgG, domínio transmembrana e 2 domínios intracelulares do tipo tirosina quinase (MURATA et al., 2010).	38
<b>Figura 6.</b> Via de sinalização dos receptores de FGF (GOLDFARB, 2001).	39
<b>Figura 7.</b> Estrutura tridimensional do FGF-2. Protótipo da família dos FGFs, formando uma estrutura cilíndrica de fitas $\beta$ antiparalelas ( $\beta 1$ a $\beta 12$ ) (Adaptado de ORNITZ E ITOH, 2001).	40
<b>Figura 8.</b> Estrutura histológica de folículos pré-antrais caprinos após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina. (A) folículo	44

primordial (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas), (B) transição (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas), (C) primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas) e (D) secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas). O: oócito; N: núcleo; G: células da granulosa. Barras: A, B e C = 12,5 µm e D = 25 µm. Fonte: Silva et al. (2004).

## Capítulo 1.

**Figure 1.** Immunolocalization of FGF-2 protein in ovine ovarian follicles. 75  
Primordial (A), primary (B), secondary (C), early antral (E and F) and large antral follicle (G and H). Note that negative control did not show immunostaining for FGF-2 (D and I). O: oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; TC: theca cell.

**Figure 2.** Histological sections of ovine ovarian fragments after 76  
periodic acid Schiff-hematoxylin or TUNEL staining. Normal primordial follicles (A) and atretic primary follicle (B) after culturing in 10 ng/mL or 200 ng/mL FGF-2, respectively; Apoptotic primary follicles cultured in 10 ng/mL (C) and 200 ng/mL de FGF-2 (D); Negative control (E). Note the apoptosis in the oocyte in Figure C (\*), and in both oocyte (\*) and granulosa cells (arrows) in figure D. O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bar: 25 µm (400x).

**Figure 3.** Percentage of ovine morphologically normal preantral 77  
follicles in fresh tissues (fresh control) and after *in vitro* culture in different concentrations of FGF-2.

**Figure 4.** Percentage of ovine primordial (A) and growing (B) follicles in 78  
fresh tissues (fresh control) and after *in vitro* culture in different concentrations of FGF-2.

**Figure 5.** Percentage of TUNEL positive cells in fresh tissues (fresh control) and after *in vitro* culture in different concentrations of FGF-2. 79

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a:	Antrum (Antro)
ANOVA:	Analysis of variance (Análise de variância)
ATP:	Adenosina tri-fosfato
Bax:	gene pró-apoptótico
Bcl:	gene anti-apoptótico
Bcl-2:	gene anti-apoptótico
Bid:	gene pró-apoptótico
Bik:	gene pró-apoptótico
bFGF:	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de crescimento fibroblástico básico)
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
BMP-15:	Bone morphogenetic-15 (Proteína morfogenética óssea-15)
Ca <sup>++</sup> :	Íons cálcio
CC:	Células do cúmulus
COCs/CCOs:	Cumulus oocyte complexes (Complexo cumulus-oócito)
CG:	Células da granulosa
CGP:	Células germinativas primordiais
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
DAB:	Diaminobenzidina
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de crescimento epidermal)
et al.:	<i>et alii</i> (e colaboradores)
FGF:	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fator de crescimento fibroblástico)
FGF-b:	Fator de crescimento fibroblástico básico
FGFR:	Receptor de FGF
FIV:	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH:	<i>Follicle stimulating hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
GC:	Granulosa cell (Células da granulosa)
GDF-9:	Growth differentiation factor-9 (Fator de crescimento e diferenciação-9)
Grb2:	Proteína ligadora do receptor

h:	Hora
HC:	Histologia clássica
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1:	<i>Insulin-1 like Growth Factor</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina-1)
IgG:	Imunoglobulina
ITS:	Insulina, transferrina e selênio
KL:	Kit-ligand
LH:	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio luteinizante)
MEM:	Minimal Essential Medium (Meio essencial mínimo)
min:	minuto
mL:	Mililitro
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> :	bomba de sódio e potássio
ng:	nanigramas
MOIFOPA:	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
O:	Oócito
PBS:	Tampão fosfato salino
PCR:	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
Ras:	Rat Sarcoma vírus
RNA <sub>m</sub> :	Ribonucleic acid messenger (Ácido ribonucléico mensageiro)
SOS:	Fator de troca do nucleotídeo
SHP2:	Fosfatase homóloga a Src2
TG-2:	Transglutaminase-2
VEGF:	Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotélio vascular)
XL:	Gene anti-apoptótico
α-MEM:	Alpha minimal essential médium (Meio essencial mínimo alfa)
α-MEM <sup>+</sup> :	Supplemented alpha minimal essential médium (Meio essencial mínimo alfa suplementado)

%:	Porcentagem
°C:	Graus Celsius
µg:	Micrograma
µL:	Microlitro
µm:	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1. O ovário mamífero .....	20
2.2. Classificação dos folículos ovarianos e foliculogênese .....	21
2.2.1. Formação de folículos primordiais .....	23
2.2.2. Passagem de folículos primordiais para transição ou primários. ....	24
2.2.3. Crescimento de folículos primários para secundários. ....	25
2.2.4. Progressão de folículo secundário para antral. ....	26
2.3. População e atresia folicular. ....	27
2.4. Apoptose x necrose. ....	29
2.5. A biotécnica de MOIFOPA. ....	32
2.6. Sistema de cultivo <i>in vitro</i> para o desenvolvimento de folículos pré-antrais. ....	33
2.6. Importância da composição do meio de cultivo para o desenvolvimento folicular <i>in vitro</i> .....	35
2.7. Fatores de Crescimento Fibroblástico (FGFs) .....	36
2.7. Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2).....	39
2.8. Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais .....	42
2.9. Técnicas de avaliação da qualidade do folículo .....	43
2.9.1. Histologia clássica.....	44
2.9.2. Imunohistoquímica .....	45
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	47
<b>4. HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	48
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	49
5.1. Objetivo Geral .....	49
5.2. Objetivos Específicos .....	49



<b>CAPÍTULO 1</b> .....	50
Abstract.....	52
Introduction.....	53
Material and methods.....	54
Results .....	60
Discussion .....	62
References.....	65
Figure captions.....	73
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	80
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	80
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho ovino estimado em aproximadamente 17,3 milhões de animais dos quais, em média, 57% encontram-se na região do Nordeste (IBGE, 2012). Como a ovinocultura exerce um importante papel sócio-econômico por se tratar de importante fonte de alimento e renda, o desenvolvimento de biotécnicas que possibilitem uma rápida multiplicação de animais geneticamente superiores além de contribuírem intrinsecamente para a ampliação do conhecimento básico em fisiologia reprodutiva (CASTILHO et al., 2013), pode melhorar significativamente a qualidade de vida da população rural da região Nordeste, especialmente da região do Vale do São Francisco, onde se encontra o município de Petrolina (PE).

Nesse sentido, estudos sobre a fisiologia reprodutiva de ovinos demonstram que ao nascimento, o ovário das ovelhas contém milhares de oócitos inclusos em sua maioria (cerca de 90%) nos folículos pré-antrais. Entretanto, a grande maioria desses oócitos (aproximadamente 99,9%) não ovula e morre por atresia durante as fases de crescimento e maturação *in vivo* (MATSUDA et al., 2012). Considerando-se esta alta taxa de atresia folicular, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), também conhecida como “ovário artificial”, 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 largamente nos ovários.

Estudos mostram que é possível produzir animais viáveis a partir do crescimento e da maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de animais de laboratório (EPPIG & O'BRIEN 2003), demonstrando assim, a exequibilidade da biotécnica de MOIFOPA. Porém, a obtenção de produtos viáveis a partir de folículos pré-antrais em animais domésticos ainda não foi alcançada. Nesse sentido, uma ferramenta importante para o fornecimento de elevado número de oócitos competentes (ALVES et al., 2012) é o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

Recentemente, diversos peptídeos ovarianos de ação local têm sido descritos por participarem do controle de todas as fases do desenvolvimento folicular. Dentre esses peptídeos, destaca-se a família dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF; CASTILHO et al., 2013), sendo o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) um dos mais estudados nesse contexto. Estudos mostraram que esse fator promove a ativação e o crescimento de folículos primordiais de cabras (MATOS et al., 2007b), aumenta a taxa de crescimento diário de folículos isolados, o RNAm do FGF-2 está presente em pequenos e grandes folículos antrais e a proteína do FGF-2 é expressa em folículos pré-antrais e antrais dessa mesma espécie (ALMEIDA et al., 2012). Entretanto, em ovinos, não existem dados sobre a localização da proteína do FGF-2, além de não ser conhecido o efeito deste fator sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais.

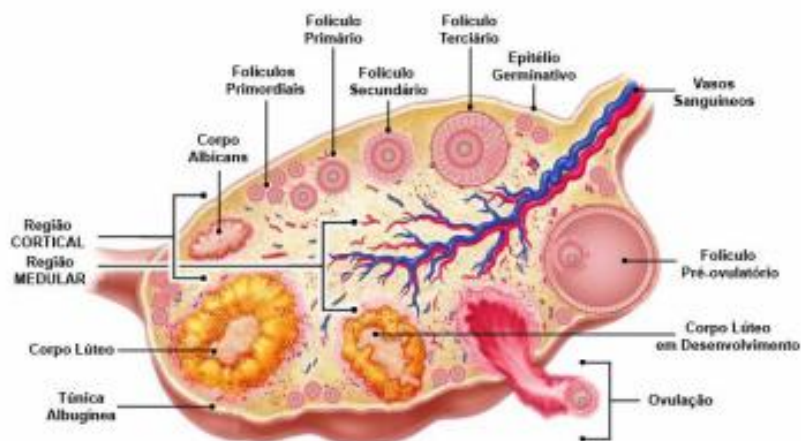
Para uma melhor compreensão dessa dissertação, foi realizada uma breve revisão de literatura, abordando os temas: ovário mamífero, foliculogênese, atresia folicular, apoptose x necrose, biotécnica de MOIFOPA, fator de crescimento fibroblástico-2 e técnicas de avaliação da qualidade dos folículos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O ovário mamífero

O ovário mamífero é o principal órgão do sistema reprodutivo de fêmeas, sendo composto de vários tipos de células diferenciadas que trabalham em conjunto para promover suas funções endócrina e exócrina (BRISTOL-GOULD E WOODRUFF, 2006). Com relação à função endócrina, o ovário é responsável pela síntese e secreção de hormônios que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade estral/menstrual e manutenção do trato reprodutivo e suas funções, enquanto a função exócrina ou gametogênica visa à diferenciação e à liberação de um oócito maduro para fertilização (MCGEE E HSUEH, 2000).

Em todas as espécies mamíferas, o ovário é composto de duas regiões distintas (Figura 1), uma medular e outra cortical (BAILLET et al., 2012), circundada pelo epitélio germinativo. Na maioria das espécies, a medula ovariana está localizada mais internamente e consiste de um arranjo irregular de tecido conjuntivo fibroelástico e um extensivo tecido nervoso e vascular que chega ao ovário através do hilo. O córtex ovariano, localizado mais externamente, consiste na região funcional do órgão, sendo composto de tecido conjuntivo (fibroblastos, colágeno e fibras reticulares), folículos ovarianos em vários estádios de desenvolvimento ou em regressão, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos (SILVA, 2005). A funcionabilidade deste órgão durante a vida reprodutiva das fêmeas depende da perfeita interação entre fatores intraovarianos de ação local: autócrinos, parácrinos e endócrinos (ALVES et al., 2012), que atuam coordenando o processo da foliculogênese ovariana.



**Figura 1.** Representação esquemática do ovário mamífero. Adaptado de <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>.

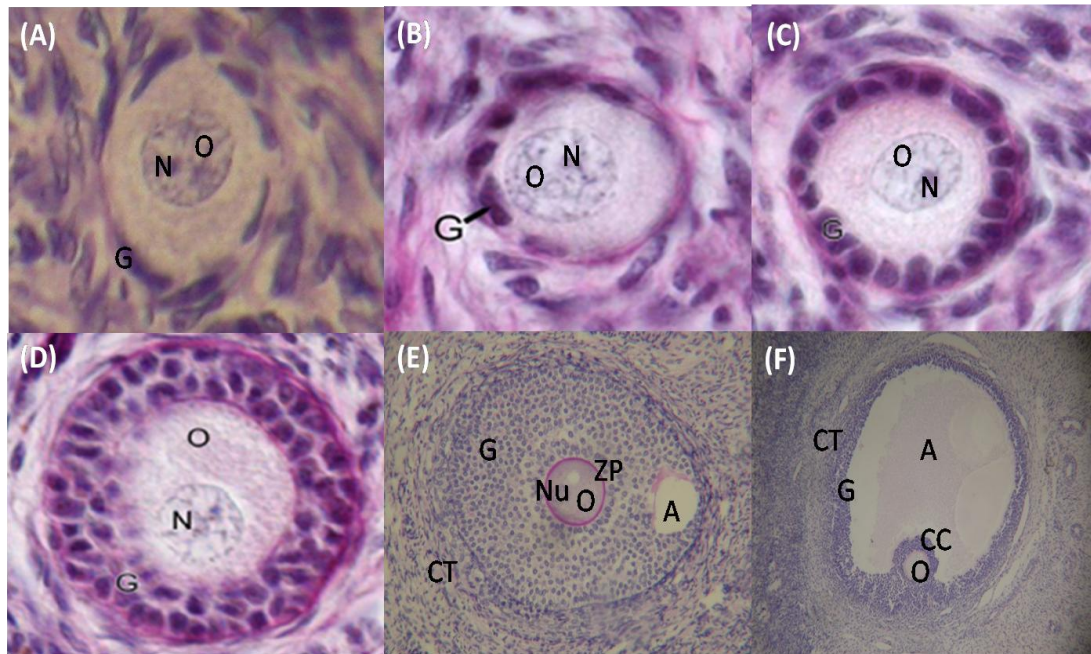
## 2.2. Classificação dos folículos ovarianos e foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de DeGraaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Neste sentido, a foliculogênese é um processo contínuo de crescimento dos folículos ovarianos, que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON E SKINNER, 2001).

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e é formado por um oócito circundado por células da granulosa e/ou tecais (MATSUDA et al., 2012), que proporcionam as condições ideais para a manutenção da viabilidade, crescimento e liberação de um oócito maturo no processo de ovulação (KNIGHT; GLISTER, 2006; NILSSON et al., 2011). Assim, um mau funcionamento de qualquer etapa deste processo complexo pode comprometer a fertilidade (CONTI et al., 2012).

A capacidade reprodutiva de uma fêmea mamífera é iniciada durante a vida fetal, momento em que ocorre a formação folicular (BAILLET et al., 2012). Nesse sentido, de acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser

divididos em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, transição, primários e secundários e 2) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de *DeGraaf* ou pré-ovulatório (Figura 2; Adaptado de SILVA et al., 2004).



**Figura 2.** Classificação dos folículos pré-antrais e antrais. Folículo primordial (A), transição (B), primário (C), secundário (D) terciário (E) e pré-ovulatório (F). N: Núcleo, O: oócito, G: células da granulosa, ZP: zona pelúcida, CT: células da teca, A: antro. (Adaptado de Silva et al., 2004).

Ao longo do desenvolvimento folicular, a morfologia dos folículos é alterada, sendo verificado o crescimento do oócito, a multiplicação e a diferenciação das células da granulosa, bem como o aparecimento das células tecais (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Quando o oócito completa a maturação e as principais alterações fenotípicas ocorrem nas células da granulosa murais e nas células do cúmulus, ocorre ruptura do folículo e liberação do oócito. Assim, uma melhor compreensão dos eventos celulares, neste processo, é de suma importância para fornecer ferramentas fundamentais para maximizar o uso de biotecnologias na reprodução animal

(CASTILHO et al., 2013) e no tocante à reprodução humana melhorar a reprodução assistida, bem como desenvolver novas estratégias para o controle da fertilidade (CONTI et al., 2012).

### **2.2.1. Formação de folículos primordiais**

Os folículos primordiais consistem de um oócito que se encontra na fase de diplóteno da meiose I, que é circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa (ADHIKARI, 2009). Em ruminantes e primatas, a formação de folículos primordiais, os quais representam 95% do total de folículos pré-antrais presentes no ovário, começa durante o desenvolvimento fetal e, mais especificamente em ovinos, ocorre após 100 dias de gestação (FORTUNE et al., 2000; SMITZ; CORTVRINDT, 2002).

Nesse contexto, os principais eventos do desenvolvimento ovariano como a migração de células germinativas primordiais (CGP), a diferenciação sexual gonadal, a mitose das CGP, a atresia e a primeira divisão da meiose são iniciados também durante a vida fetal (BAILLET et al., 2012). Sendo assim, o processo que leva à formação do folículo primordial é caracterizado pela formação e migração das CGP, pela colonização ovariana por células mesonéfricas, pela formação e proliferação das oogônias que iniciam o processo de meiose com interrupção na fase de diplóteno da prófase I (CASTILHO et al., 2013). Tal migração é controlada por sinais quimiotáticos produzidos pela própria crista gonadal em desenvolvimento (OKTEM; OKTAY, 2008). À medida que as CGP atingem as gônadas, estas são incorporadas em cordões sexuais (SMITZ; CORTVRINDT, 2002), e multiplicam-se ativamente por mitose, diferenciando-se em oogônias. As oogônias adquirem então um maior número de organelas intracelulares (ABIR et al., 2006) e dividem-se sucessivamente por mitose, formando ninhos de oogônias interligados por pontes intercelulares (PEPLING, 2006).

Após a parada da mitose, as oogônias entram na primeira divisão meiótica e diferenciam-se em oócitos primários (SUH; SONNTAG; ERICKSON,

2002). Em seguida, os oócitos perdem suas pontes intercelulares e são circundados por uma camada de células somáticas planas, também conhecidas como células da pré-granulosa (MCNATTY et al., 2000; JUENGEL et al., 2002), formando assim, os folículos primordiais e iniciando o processo de foliculogênese. Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

### **2.2.2. Passagem de folículos primordiais para transição ou primários**

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, (AERTS et al., 2010) é um processo que se dá pela passagem dos folículos do *pool* de reserva ou folículos quiescentes para o *pool* de folículos em crescimento (transição, primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório. O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa, seguida do aumento do diâmetro oocitário (CAMPBELL, 2009), o que pode acontecer dias, meses ou anos após a sua formação. Além da mudança na morfologia das células da granulosa, o volume citoplasmático e nuclear do oócito aumenta consideravelmente (HIRSHFIELD, 1991). Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais ainda não são totalmente conhecidos.

Após a ativação, os folículos primordiais gradualmente adquirem células da granulosa com morfologia pavimentosa e cúbica, tornam-se folículos de transição e, em seguida, folículos primários, quando são circundados por uma camada de células da granulosa cúbicas (SILVA et al., 2004). Nesse tipo de folículo, as células da granulosa aumentam em número e tornam-se mais volumosas, passando a manter um estreito contato com o oócito mediado por endocitose (VAN DEN HURK; BEVERS, 1997).

Acredita-se que os folículos primordiais são estimulados a iniciar o crescimento por fatores intraovarianos parácrinos e autócrinos (FORTUNE, 2003; WEBB e CAMPBELL, 2010). A literatura tem relatado alguns estimuladores iniciais, que são sintetizados tanto pelas células foliculares



quanto pelos oócitos (FORTUNE, 2003). Nesse sentido, vários estudos têm demonstrado vários fatores de crescimento envolvidos na ativação folicular. Dentre estes, pode-se citar o FGF-2 (NILSSON *et al.*, 2001), o KL (Kit-ligand) (CELESTINO *et al.*, 2010), o FGF-2 em associação com o KL (NILSSON e SKINNER, 2004), o EGF (ANDRADE *et al.*, 2005) e o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) (MOORE; SHIMASAKI, 2005). Entretanto, na espécie ovina, ainda há poucos estudos demonstrando a ação de diferentes substâncias sobre a ativação folicular *in vitro*.

### **2.2.3. Crescimento de folículos primários para secundários**

A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas de células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Estes folículos são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas localizadas em torno do oócito, bem como pela formação de uma camada de células tecais envolvendo a membrana basal folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nestes, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito (LUCCI, *et al.*, 2001). Nessa fase, inicia-se a formação das camadas de células da teca a partir de células do estroma intersticial (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Sendo assim, a camada de células tecais se estratifica e se diferencia em duas partes distintas: teca externa e teca interna. A parte mais periférica, denominada teca externa, é composta de células não diferenciadas e a parte mais interna, denominada de teca interna, contém algumas células precursoras de fibroblastos, capazes de se diferenciar e secretar esteróides (GOUGEON, 2010). As células da teca interna correspondem à porção vascularizada do folículo e são definidas quando há a formação de quatro ou mais camadas de células da granulosa no folículo secundário (LUCCI *et al.*, 2001).

Nestes folículos, as células da granulosa apresentam uma extensiva rede de junções do tipo gap ou junções intercomunicantes, que correspondem a canais membranários que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundos mensageiros e pequenos metabólitos entre as células

(GOUGEON, 2010). Além do expressivo aumento no número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas, os oócitos em crescimento acumulam grânulos glicogênicos, proteínas e lipídios, e sofrem ainda um incremento na síntese de RNA mensageiro e proteínas, considerados importantes para garantir a futura competência meiótica. Nesse sentido, muitas organelas mudam sua aparência e se movem para a periferia do oócito. Tal fato parece ser controlado, tanto por peptídeos e hormônios esteróides, bem como por fatores de crescimento intraovarianos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), como o GDF-9 (HREISSON et al., 2002; MARTINS et al., 2008), a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15; CELESTINO et al., 2011), fator de crescimento endotélio vascular (VEGF; YANG, 2007).

#### **2.2.4. Progressão de folículo secundário para antral**

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células granulosa, denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. O diâmetro dos folículos aumenta acentuadamente devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento do fluido antral (VAN DEN HURCK; ZHAO, 2005). Tal fluido pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras derivadas do sangue ou secreções das células foliculares, isto é, gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas (WU et al., 2007).

A formação do folículo pré-ovulatório é um pré-requisito para a ovulação e a formação do corpo lúteo, bem como para manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006). A fase antral final é dependente das gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), que induzem o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos antrais em ondas foliculares (FORTUNE et al., 2001). Além das gonadotrofinas, peptídeos sintetizados localmente desempenham papel-chave na regulação da fase

antral, tanto por meio de mecanismos parácrinos como endócrinos (WEBB et al., 2003; FORTUNE, 2004). Merece importante destaque, dentre outros, um membro da família FGF, o FGF-2 (YANG, 2011). Estudos mostraram que esse fator promove o crescimento de folículos secundários bovinos isolados cultivados *in vitro* (WANDJI et al., 1996). Além disso, o FGF-2 atua como um fator mitogênico para as células da granulosa de bovinos. Isso foi confirmado por Van Wezel et al. (1995) que observaram que o FGF-2 promove o crescimento folicular através da estimulação da proliferação de células da granulosa. Além disso, Sharma et al. (2010) mostraram que o FGF-2 aumenta a taxa de formação de antro de folículos de búfalas. Outro estudo mostrou que o FGF-2 é principalmente envolvido na proliferação de células da granulosa e no controle do crescimento final de folículos antrais (BERISHA et al., 2004).

No último estágio do desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são denominadas de células do cúmulus. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao LH e iniciam a etapa final de diferenciação. Desta forma, nessa fase, ocorre uma diminuição dos níveis circulantes de FSH em resposta ao alto nível de estradiol e inibina produzidos pelo folículo. Nesse momento, o LH passa a acelerar o desenvolvimento folicular e determina uma redução nas exigências de FSH pelos folículos (FILICORI et al., 2001). Com o pico pré-ovulatório de LH durante a puberdade, o oócito retoma a meiose e progride da prófase I para a metáfase II, proporcionando a ovulação de um oócito maturo (AERTS, 2010).

### **2.3. População e atresia folicular**

Os folículos pré-antrais representam 90% do total de folículos presentes no ovário e constituem o estoque de gametas femininos (FIGUEIREDO et al., 2008). Nesse sentido, a população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma forte variação individual (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW et al., 2000), 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999), 160.000 na ovelha (DRIANCOURT et al., 1991)

e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). No entanto, alguns autores sugerem que essa população folicular pode ser renovada na fêmea adulta. Nesse sentido, surge a teoria de neo-ogênese através dos estudos realizados por Johnson et al. (2004) que demonstraram a ocorrência de proteínas específicas do início da meiose em ovários de camundongas adultas, às quais deveriam ser expressas apenas durante a vida fetal. Adicionalmente, Johnson et al. (2005) sugerem a hipótese de que a medula óssea e/ou sangue periférico poderiam servir como reservatório de células germinativas para o ovário de ratas adultas. Em trabalho subsequente Bukovsky, (2005) demonstraram que a renovação folicular pós-natal ocorre regularmente em mulheres, mas a origem das células-tronco para tal não seria a medula óssea, e sim células germinativas presentes na superfície do epitélio ovariano. Por outro lado, a relevância destes resultados ainda depende de investigações, pois existem muitas dúvidas inerentes à essa possível renovação folicular na fêmea adulta.

Apesar desta grande população folicular presente no ovário mamífero, a quase totalidade dos folículos, ou seja, 99,9%, não chegam à ovulação, pois morrem por um processo fisiológico denominado atresia, o qual ocorre por via apoptótica (LIN et al., 2012) ou pelo processo degenerativo de necrose (FIGUEIREDO et al., 2008).

Muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa de folículos atrésicos. O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (MORITA & TILLY, 1999). Nestes folículos, alterações nas células da granulosa são raramente observadas (JORIO et al., 1991).

É importante ressaltar que após a formação da cavidade 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. O

aparecimento de células da granulosa com núcleos picnóticos onde se observa condensação da cromatina e retração nuclear, podem ser considerados como os primeiros sinais morfológicos de atresia ou morte folicular, que são observados predominantemente em células da granulosa em proximidade da cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral (HUGHES & GOROSPE, 1991; TILLY, 1996).

Em ratas, folículos pré-antrais atrésicos são raros, sendo a atresia predominante em folículos antrais (HIRSHFIELD, 1988). No entanto, em ovelhas, Driancourt et al. (1985) demonstraram que aproximadamente 50% dos folículos presentes nos ovários desaparecem durante a fase pré-antral da foliculogênese. Outro dado relevante, é que a morte folicular que ocorre pelo processo fisiológico de atresia, pode ocorrer por via degenerativa necrótica (BRAS et al., 2005) e/ou apoptótica (HUSSEIN, 2005). Nos tópicos abaixo, os processos de apoptose e necrose serão detalhados.

#### **2.4. Apoptose x necrose**

O processo de morte celular pode ser iniciado em diferentes compartimentos intracelulares (ORRENIUS et al., 2013). Todavia, a apoptose refere-se a um padrão de morte celular com características morfológicas distintas da necrose (DESAGHER & MARTINO, 2000). Nesse sentido, a apoptose refere-se a um processo fisiológico altamente regulado de morte celular programada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos. Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (BERGANTINI et al., 2005; BRAS et al., 2005). É caracterizada por alterações/modificações no citoesqueleto (ORRENIUS et al., 2013) que induzem contração celular, fragmentação do DNA (ácido desoxirribonucléico), condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos,

formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (LAVIN, 1993; LIAO et. al., 2005; YASUHARA et al., 2003).

De acordo com o estímulo inicial, a apoptose pode ocorrer por intermédio de receptores de superfície celular (receptores de morte), constituindo a via extrínseca, ou ainda por meio da mitocôndria, constituindo esta a via intrínseca (JOZA et al., 2002; ELMORE, 2007). Independente da via, duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: a família das caspases, consideradas as executoras principais da via apoptótica e a família Bcl-2, a qual compreende tanto membros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) quanto membros pró-apoptóticos (Bax, Bid, Bik)(HUSSEIN, 2005; GREENFELD et al., 2007).

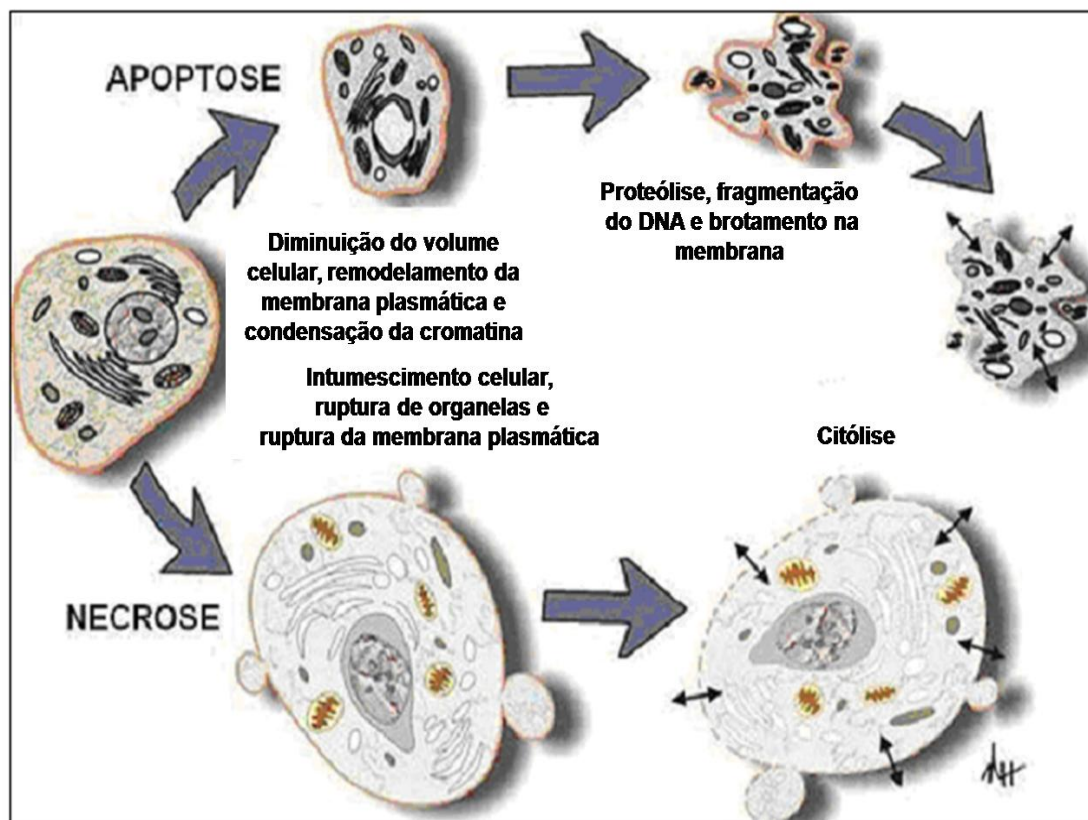
É bem sabido que proteínas da família Bcl-2 são anti-apoptóticas. Além disso, estudos mostraram que a apoptose pode ser regulada por transglutaminase-2 (TG-2). Esta enzima apresenta quatro atividades catalíticas distintas: proteína de ligação cruzada via transamidação, atividade GTPase, atividade de proteína quinase e atividade dissulfetoisomerase (ORRENIUS et al., 2013).

A necrose, por sua vez, é uma forma de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS et al., 2005). Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina e a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se e, dessa forma, são danificadas juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos (UCHIYAMA, 1995; ORRENIUS et al., 2013). Há alteração na permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP, que tem como consequência comprometimento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e de outros fenômenos que são ATP-dependentes. Isso resulta no rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local (BOUJRAD et al., 2007, KERR et al., 1995).

Ademais, durante a necrose, não há evidência de remodelamento da cromatina e a célula entra em citólise imediata, com digestão aleatória do DNA, cariólise e perda da integridade da membrana plasmática. A citólise é o estágio

final da decadência celular, evidente no processo de necrose (SARASTE & PULKKI, 2000; JEFFREY, 2000; HAIL et al., 2006).

De forma geral, tanto na apoptose quanto na necrose (Figura 3) ocorre condensação e subsequente fragmentação do núcleo. Além disso, as mitocôndrias podem ser parcialmente ou totalmente modificadas/danificadas, e a estrutura do citoesqueleto é comprometida (ORRENIUS et al., 2013).



**Figura 3.** Características morfológicas de apoptose e necrose. (Adaptado de HAIL et al., 2006).

O processo de atresia tem como característica marcante, a fragmentação do DNA a cada 180 a 200 pares de base (HUSSEIN, 2005). No que se refere ao processo degenerativo de necrose, após análise histológica e ultra-estrutural de folículos primordiais e primários degenerados, foram observados oócitos retraídos, com núcleos picnóticos e numerosos vacúolos no citoplasma (SILVA et al., 2002).

A atresia folicular e os fatores que influenciam este processo têm sido extensivamente estudados. Sabe-se que muitos hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos na redução dos níveis de atresia, dos quais, dentre outros, cita-se o FGF-2 (PELUSO et al., 2003), o EGF (ANDRADE et al., 2005), o FGF-17 e FGF-18 (MACHADO et al., 2009; PORTELA et al., 2010), a BMP-15 (HUSSEIN et al., 2005; YOSHINO et al., 2006) e o FSH (VAN DEN HURK et al., 2000). A elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial é o pré-requisito básico para o uso de folículos pré-antrais no melhoramento da eficiência reprodutiva em animais domésticos, humanos, e de todas as outras espécies. Dessa forma, com o objetivo de evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos, vários modelos que possibilitam o estudo dos fatores que controlam a atresia e o desenvolvimento de folículos ovarianos.

Sendo assim, visando maximizar a utilização do potencial reprodutivo de fêmeas, vários estudos relacionados à biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) têm contribuído bastante no sentido de desenvolver um meio de cultivo que evite a atresia e assegure o crescimento e a posterior maturação *in vitro* de oócitos oriundos desses folículos (CASTILHO et al., 2013)

## **2.5. A biotécnica de MOIFOPA**

A MOIFOPA ou ovário artificial é uma biotécnica da reprodução que tem como principal objetivo resgatar oócitos oriundos de folículos pré-antrais, a partir do ambiente ovariano e posteriormente cultivá-los *in vitro* até a maturação, prevenindo-os da atresia e possibilitando sua utilização em outras biotécnicas como FIV, transgênese e clonagem (FIGUEIREDO et al., 2008). Para alcançar esse objetivo, é necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal que permita o crescimento folicular, mantendo a viabilidade dos folículos.

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma técnica que vem sendo largamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes



substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes fases do desenvolvimento folicular (FORTUNE, 2003). Além disso, o desenvolvimento pleno de um adequado sistema de cultivo *in vitro* para folículos pré-antrais, alvo maior dessa biotécnica, será bastante útil para compreender o complexo mecanismo que regula a foliculogênese inicial, além de disponibilizar ferramentas essenciais para a multiplicação de animais domésticos e para o tratamento da infertilidade em humanos (FIGUEIREDO et al., 2011).

Com isso, vários sistemas de *cultivo in vitro* foram desenvolvidos nas últimas décadas e os resultados têm se mostrado dependentes do tipo de meio, concentração da substância (hormônio, fator de crescimento, antioxidantes, etc.), protocolo, sistema de cultivo utilizado e da espécie animal investigada (FORTUNE, 2003; PICTON et al., 2008).

## **2.6. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de folículos pré-antrais**

Para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, diferentes métodos têm sido realizados. Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (O'BRIEN; EPPIG, 2003). Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, este modelo torna-se inviável. Nestes animais, o cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento folicular em diferentes espécies, incluindo caprinos (LIMA et al., 2013), bovinos (ANDRADE et al., 2012), babuínos (WANDJI et al., 1997) e humanos (GAROR et al., 2009). Ambos os métodos de cultivo *in vitro* supracitados (ovário inteiro e fragmentos ovarianos) são caracterizados pelo cultivo de folículos inclusos no próprio tecido ovariano, sendo, desta forma, classificados como sistemas de cultivo *in situ*. Além da praticidade, o cultivo *in situ* tem a vantagem de manter o contato celular (ABIR et al., 2006) e a integridade tridimensional dos folículos, fornecendo um complexo sistema de suporte que se assemelha ao ovário *in vivo* (PICTON et al., 2008). No entanto,

neste tipo de sistema, embora haja uma significativa ativação folicular, poucos folículos primários cultivados progridem até o estágio de folículo secundário (FORTUNE, 2003).

Para contornar esse problema outro sistema de cultivo foi elaborado, o cultivo de folículos isolados. Para a realização desse sistema, procedimentos enzimáticos e/ou mecânicos são utilizados a fim de isolar folículos pré-antrais a partir do córtex ovariano antes de submetê-los ao cultivo *in vitro*. O isolamento enzimático envolve a exposição do tecido ovariano à ação de enzimas, como a colagenase, a pronase e a DNase, e permite a recuperação de um grande número de folículos pré-antrais, porém pode danificar a membrana basal ou células da teca, principalmente quando o tempo de incubação não é rigorosamente controlado (DEMEESTERE et al., 2005). Paralelamente aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos vêm sendo utilizados como, por exemplo, as técnicas de microdissecção (TAMILMANI et al., 2005) e dissociação mecânica com o tissue chopper (MARTINEZ-MADRID et al., 2004). A grande vantagem do isolamento mecânico é que, ao contrário do enzimático, este mantém a integridade da estrutura folicular, a membrana basal intacta, e ainda as interações entre oócito, células da granulosa e células da teca (DEMEESTERE et al., 2005). Contudo, os métodos mecânicos são considerados mais lentos e laboriosos, permitindo, em geral, a recuperação de um número inferior de folículos (TELFER et al., 2000). Vale salientar que a associação de métodos mecânicos e enzimáticos também pode ser realizada, sendo considerada uma alternativa interessante para o isolamento de folículos pré-antrais (GUPTA et al., 2008). O cultivo de folículos isolados apresenta como vantagens permitir o acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de favorecer a maior perfusão do meio para o folículo (ABIR et al., 2001).

Além dos sistemas anteriormente descritos (*in situ* e isolado), pode ser realizado ainda um modelo de cultivo “em dois passos”, associando esses dois sistemas. Nesse modelo, é efetuado inicialmente o cultivo *in situ* no intuito de maximizar a ativação folicular e o crescimento dos folículos pré-antrais iniciais, e em seguida, realiza-se o isolamento e cultivo dos folículos secundários crescidos *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; TELFER et al., 2008). A

grande vantagem desse sistema é que este mantém a interação celular entre o estroma e os folículos nos estágios mais iniciais, sendo capaz de garantir uma boa ativação e fornecer um maior número de folículos secundários para a utilização no cultivo (JIN et al., 2010; SMITZ et al., 2010).

## **2.7. Importância da composição do meio para desenvolvimento folicular *in vitro***

A composição do meio é um fator fundamental para o sucesso do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e pode ser influenciada pela adição de diferentes substâncias, incluindo antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, monossacarídeos, etc.), diferentes fontes protéicas, antioxidantes, hormônios e diversos fatores de crescimento (FIGUEIREDO et al., 2008; PICTON et al., 2008). Além disso, diferentes meios comerciais podem influenciar o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, estimulando a sobrevivência e o crescimento folicular. Dentre os meios de cultivo de base comumente utilizados para folículos pré-antrais, destacam-se o Meio Essencial Mínimo (MEM) (MATOS et al., 2007b) ou o MEM alfa-modificado ( $\alpha$ -MEM) (SILVA et al., 2011). Estudos têm demonstrado que a adição de diferentes suplementos ao meio de cultivo, como piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), aumenta o percentual de folículos morfológicamente normais e estimula o crescimento folicular (SILVA et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2005). Além disso, tem-se observado que o ácido ascórbico, importante antioxidante, também atua benéficamente sobre a foliculogênese, promovendo uma redução da atresia em folículos pré-antrais de camundongos (MURRAY et al., 2001) e estimulando a manutenção da viabilidade folicular, em caprinos, após cultivo de longa duração (ROSSETTO et al., 2009; SILVA et al., 2011).

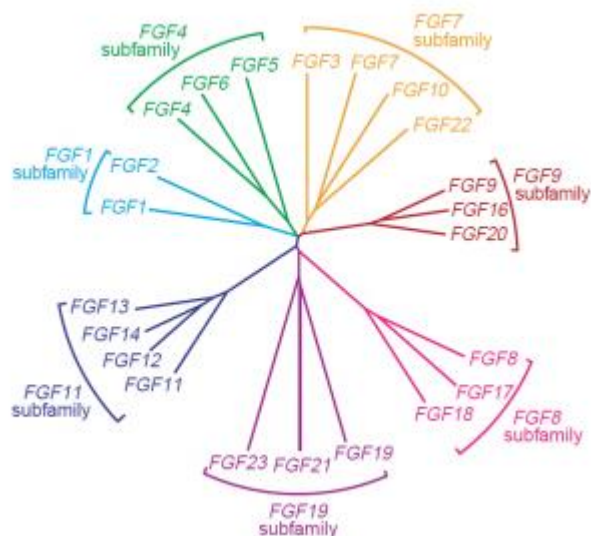
Recentemente, têm sido verificados os efeitos benéficos da Albumina sérica bovina (BSA) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos após cultivo de longa duração (RODRIGUES et al., 2010). Além de todos os suplementos supracitados, estudos *in vitro* têm

destacado a importância da utilização de hormônios (ROCHA et al., 2013) e fatores de crescimento (ALMEIDA et al., 2012) no meio de cultivo folicular para a promoção do completo e eficiente desenvolvimento dos folículos pré-antrais *in vitro*. Tais substâncias podem ser adicionadas ao cultivo isoladamente ou associadas, originando, nesse último caso, meios de cultivo não-dinâmicos - quando as substâncias são adicionadas simultaneamente ou dinâmicos - quando cada substância ou combinação de substâncias é adicionada em momentos diferentes do cultivo para suprir as necessidades específicas dos diferentes estágios foliculares (FIGUEIREDO et al., 2011).

Nesse contexto, diversos autores têm investigado os efeitos de fatores de crescimento no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, tanto de animais de laboratório como de animais domésticos. Dentre estes fatores, o presente estudo abordará o Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2), o qual será descrito com detalhes no tópico 2.8.1.

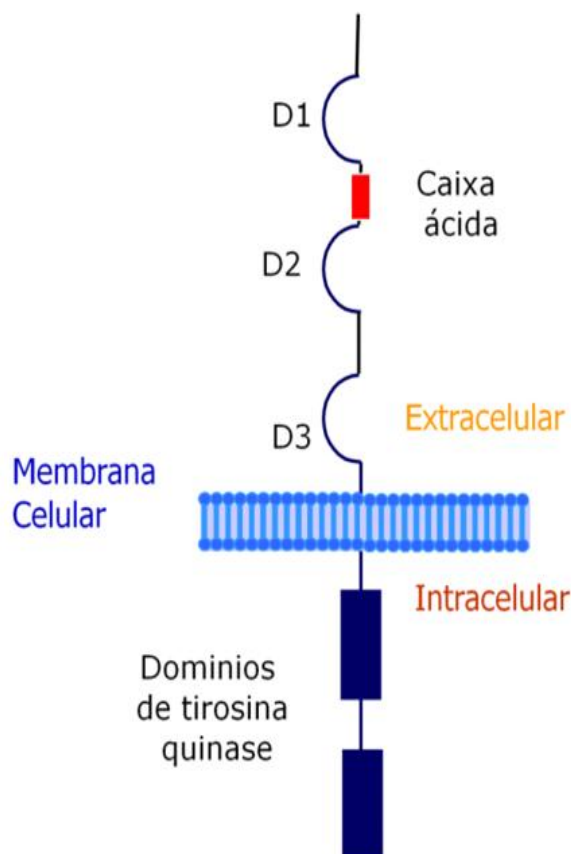
## **2.8. Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)**

Os FGFs compõem uma família de 23 membros descritos em mamíferos (ITOH & ORNITZ, 2004). Estudos sobre os papéis da família FGF na fisiologia reprodutiva têm proporcionado uma nova visão sobre a compreensão da regulação fisiológica dos processos reprodutivos (CHAVES et al., 2012). Análises filogenéticas subdividem os FGFs de humanos e camundongos em 7 subfamílias (Figura 4).



**Figura 4.** Análise filogenética dos 22 genes membros da família FGF em humanos. Estas análises sugerem que esses membros podem se agrupar em 7 subfamílias ( Adaptado de ITOH & ORNITZ, 2004).

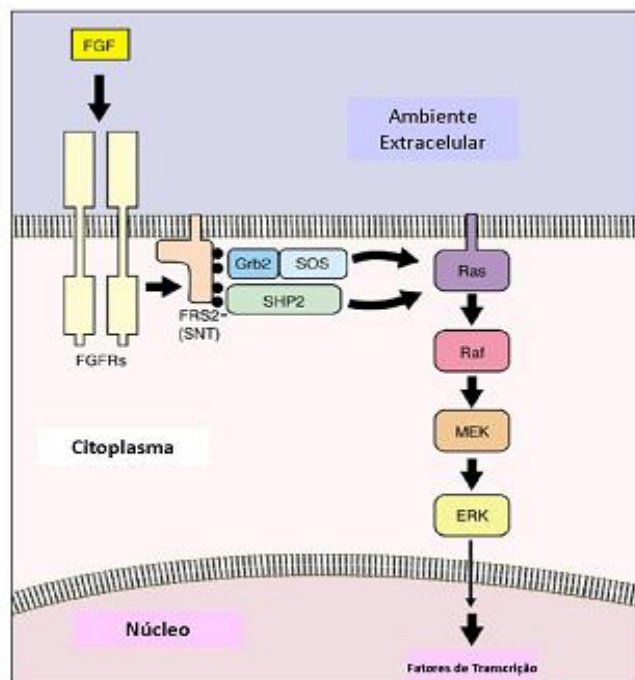
A foliculogênese está incluída entre os processos fisiológicos nos quais participam os FGFs e seus receptores (CASTILHO et al., 2013). Os eventos celulares mediados pelos FGFs acontecem via ativação dos principais receptores, FGFR1 a FGFR4, que se localizam na membrana plasmática e têm atividade intracelular tirosina quinase. Os FGFRs são receptores transmembranários do tipo tirosina-quinase (Figura 5) compostos por: 1) região extracelular caracterizada por três domínios do tipo Imunoglobulina (IgG), que formam o sítio específico de ligação de FGF-2) um espaço transmembrana e 3) um domínio citosólico de tirosina quinase ativado através do FGF ligante extracelular (POWERS et al., 2000).



**Figura 5.** Representação esquemática do receptor de FGF. O FGFR contendo 3 domínios extracelulares do tipo IgG, domínio transmembrana e 2 domínios intracelulares do tipo tirosina quinase (MURATA et al., 2010).

Os FGFs ligam-se a ectodomínios dos receptores promovendo dimerização e ativação do receptor tirosina quinase que por sua vez induz a ativação preferencial da via de sinalização SHP2/Ras/ERK. Os mecanismos de ação incluem internalização dos complexos ligante-receptor levando ao acúmulo de receptor ou ligante no compartimento intracelular. Como consequência, ocorre a liberação de FGFs em sítios internos onde podem interagir com moléculas alvo para desencadear respostas biológicas que incluem crescimento celular, diferenciação e morfogênese. A cascata intracelular de ativação dos receptores de FGF induz a fosforilação de tirosina do receptor estimulando a proteína ligadora do receptor (Grb2) que, por sua vez, induz o recrutamento de outros fatores, como o fator de troca de

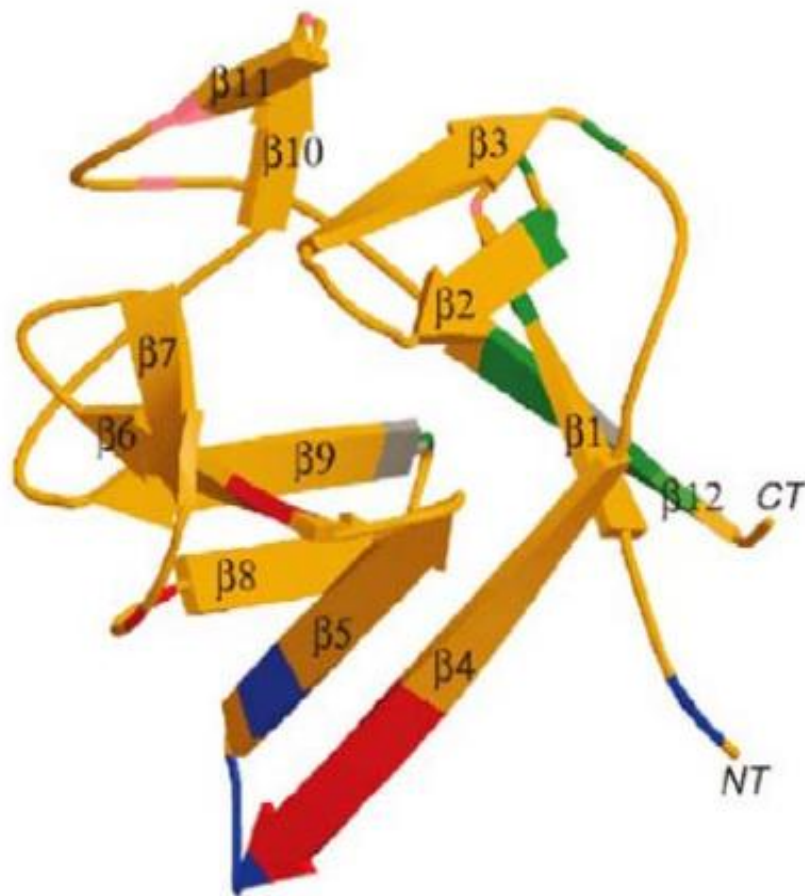
nucleotídeo (SOS) e a fosfatase homóloga a Src2 (SHP2). Esses eventos iniciais promovem a ativação da cascata Ras e ERK que levam a mudanças na transcrição gênica (Figura 6) (GOLDFARB, 2001).



**Figura 6.** Via de sinalização dos receptores de FGF (GOLDFARB, 2001).

### 2.8.1. Fator de crescimento fibroblástico-2

O FGF-2, também chamado de fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-b), está entre os inúmeros fatores envolvidos na foliculogênese, sendo o membro da família FGF melhor estudado nesse contexto (CASTILHO et al., 2013). O FGF-2 (Figura 7) é um peptídeo intra-ovariano pertencente à família FGF, que inclui 22 membros (ORNITZ E ITOH, 2001).



**Figura 7.** Estrutura tridimensional do FGF-2. Protótipo da família dos FGFs, formando uma estrutura cilíndrica de fitas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta 1$  a  $\beta 12$ ) (Adaptado de ORNITZ E ITOH, 2001).

O FGF-2 é um potente mitógeno que estimula as funções celulares e controla vários aspectos da morfogênese, proliferação, migração e diferenciação de uma variedade de células. É conhecido por influenciar a proliferação e diferenciação de células endócrinas. Através de estudos *in vitro*, já foi demonstrada a participação do FGF-2 na sobrevivência e no crescimento de folículos pré-antrais. (NILSSON et al., 2001; MATOS et al., 2011).

Este fator de crescimento já foi localizado em folículos ovarianos (ratas: NILSSON et al., 2001; humanos: QUENNELL et al., 2004, BEN-HAROUSH et al., 2005) e corpos lúteos (ratas: ASAKAI et al., 1995; bovinos: SALLI et al., 1998) de várias espécies. Além disso, a análise molecular por PCR confirmou a



expressão do FGF-2 no córtex ovariano e folículos primordiais, primários e secundários (GAROR et al., 2009), e antrais (YAMAMOTO et al., 1997) em humanos. Mais recentemente, Almeida et al. (2012) demonstraram através da técnica de PCR que, células da granulosa e da teca e CCOs de pequenos folículos antrais caprinos, produziram níveis equivalentes de RNAm de FGF-2, enquanto que em grandes folículos antrais, células da granulosa e da teca produziram mais RNAm do que os CCOs. Adicionalmente, através da técnica de imunohistoquímica, estes mesmos autores mostraram uma imunocoloração moderada de níveis da proteína do FGF-2 em oócitos de folículos primordial, primários e secundários caprinos e células da granulosa de folículos primários e secundários. Além disso, oócitos, células da granulosa e da teca de folículos antrais pequenos e grandes mostraram uma imunomarcação forte, moderada e fraca, respectivamente. Os receptores de FGF-2 (FGFR) têm sido demonstrados em folículos em crescimento de vacas (WANDJI et al., 1996) e ratas (ASAKAI et al., 1995). Ainda nesse contexto, Ben-Haroush et al. (2005) demonstraram a expressão do FGF-2, bem como de outros receptores (FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4), em oócitos de todas as classes foliculares de mulheres e, além disso, mostraram a expressão de FGFR-2 e FGFR-3 em células da granulosa de folículos primordiais e de FGFR-4 em células da granulosa de folículos primários. Este estudo também suporta a hipótese de que FGF-2 é um regulador fisiológico da viabilidade das células da granulosa (BEN-HAROUSH et al., 2005). Foi demonstrado ainda que as ações do FGF-2 podem ser mediadas através de ambos os receptores: tirosina-quinase e glicosaminoglicanos, presentes na superfície destas células (ROBERTS et al., 1999).

Alguns estudos *in vitro* mostraram que o FGF-2 promove a proliferação das células da granulosa e da teca de folículos secundários de vacas (WANDJI et al., 1996), folículos primários de gatas selvagens (JEWGENOW & STOLTE, 1996) e inibe a apoptose das células da granulosa de ratas (TROLICE et al., 1997). Peluso et al. (2003) demonstraram que o FGF-2 impede a apoptose através de ações genômica e aguda. Ações agudas e genômicas do FGF-2 parecem envolver a manutenção de níveis normais de cálcio intracelular livre ( $\text{Ca}^{2+}$ ), nas células da granulosa, através da proteína quinase C delta (PKC $\delta$ ).

Além disso, o FGF-2 promoveu a ativação e o crescimento de folículos primordiais de ratas (NILSSON et al., 2001) e mulheres (GAROR et al., 2009). Ainda nesse contexto, após realização de cultivo *in vitro* de tecido ovariano caprino, Matos et al. (2007 b) demonstraram que 50 ng/mL de FGF-2 mantém a integridade morfológica dos folículos pré-antrais caprinos cultivados por 5 dias além de estimular a ativação de folículos primordiais e o crescimento dos folículos ativados. Adicionalmente, estes autores também observaram que meios contendo FSH sozinho ou em combinação com FGF-2, mantiveram a integridade e promoveram o crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* (MATOS et al., 2011).

Outro estudo mostrou que o FGF-2 estimulou a sobrevivência de oócitos caprinos *in vitro*, apesar de não ter tido efeito sobre o crescimento oocitário (ZHOU & ZHANG, 2005). Berisha et al. (2006) observaram que o FGF-2 pode ser importante para a sobrevivência de células da granulosa até a ovulação em folículos bovinos. Sharma et al. (2010) verificaram que a sobrevivência, o crescimento, a formação de antro e esteroidogênese de folículos pré-antrais de búfalas são estimulados pelo fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) ou FGF-2, associado com FSH. Recentemente, Almeida et al. (2012) após realizar cultivo *in vitro*, durante 12 dias, de folículos isolados de cabra observaram que o FGF-2 manteve a sobrevivência folicular do dia 0 ao dia 6, bem como aumentou significativamente a taxa de crescimento diário, quando comparada ao controle. Esses trabalhos demonstram a importância do FGF-2 no desenvolvimento folicular nas referidas espécies. Entretanto, em ovinos, ainda não existem dados sobre o efeito do FGF-2 sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais ovinos, cultivados *in vitro*.

## **2.9. Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais**

O objetivo principal do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é permitir o desenvolvimento folicular, assegurando o crescimento e maturação dos oócitos, bem como a multiplicação e posterior diferenciação das células da granulosa inclusas nesses folículos (FIGUEIREDO et al., 2008). O cultivo

ovariano tem sido utilizado para avaliar a importância da vascularização (FORTUNE et al., 2000), da apoptose (FLAWS et al., 2001) e de fatores de crescimento (ERICKSON, 2001) para o desenvolvimento de folículos pré-antrais, especialmente os primordiais (O`BRIEN et al., 2003).

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Nas espécies bovina (GUTIERREZ et al., 2000) e humana (ROY & TREACY, 1993), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Em suínos, bubalinos, ovinos e caprinos, alcançou-se 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., 2010; MAGALHÃES et al., 2011). No entanto, nestas espécies citadas, a quantidade de embriões produzidos a partir de oócitos provenientes de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* ainda é limitada. Eppig & O'Brien (2003) obtiveram o nascimento de 59 ratos saudáveis a partir de folículos primordiais crescidos e maturados *in vitro*. Após cultivo *in vitro* de oócitos derivados de folículos pré-antrais secundários obtidos após vitrificação de tecido ovariano de camundongos fêmeas Wang et al. (2011) obtiveram a produção de embriões e o nascimento de crias viáveis. Apesar desse notório avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies, busca-se otimizar as pesquisas para que sejam obtidos resultados satisfatórios em outras espécies.

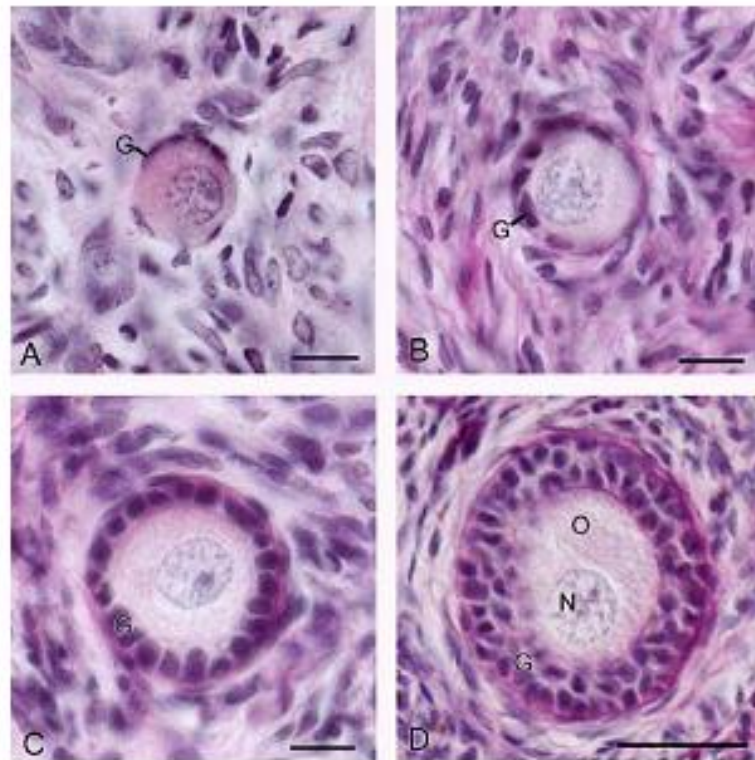
## **2.10. Técnicas de avaliação da qualidade do folículo**

As técnicas de avaliação da qualidade de folículos pré-antrais antes e após o cultivo permitem o monitoramento das alterações morfológicas ocorridas *in vitro*, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais (MATOS et al., 2007a). Nesse contexto, diferentes técnicas podem ser utilizadas isoladamente ou em associação para a precisa avaliação da qualidade, bem como da funcionalidade folicular. Dentre estas técnicas, podem ser destacadas: a histologia clássica e a imunohistoquímica. Além destas ferramentas, pode-se

fazer uso de técnicas de biologia molecular, essenciais para a avaliação da expressão e quantificação de genes transcritos e proteínas envolvidas na foliculogênese, contribuindo expressivamente para uma melhor elucidação desse processo.

### **2.10.1. Histologia clássica**

A histologia clássica (HC) é uma importante técnica de análise folicular (Figura 8) após o cultivo *in vitro*, pois além de permitir uma análise quantitativa, ou seja, de um grande número de folículos cultivados, permite ainda verificar a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, por ocasião da ativação folicular, além de analisar a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa. Tal técnica permite, portanto, a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário, secundário ou antral), e ainda quanto às suas características morfológicas (normais ou atresicos). Entretanto, a HC possui como desvantagens não permitir a avaliação da integridade das membranas plasmática e nuclear, bem como das organelas citoplasmáticas. Vale salientar que tal técnica pode ser realizada tanto em folículos isolados, como naqueles inclusos em fragmentos de córtex ovariano (MATOS et al., 2007b). Inúmeros estudos têm utilizado a HC como ferramenta para avaliação da qualidade e do crescimento folicular (ROSSETTO et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; CELESTINO et al., 2011). Segundo observado em alguns trabalhos, a HC pode fornecer resultados similares aos de viabilidade folicular utilizando marcadores fluorescentes e ainda mostrar resultados de morfologia folicular equivalentes aos obtidos nas análises sob microscópio eletrônico, porém sem a mesma precisão e o mesmo detalhamento de imagens e estruturas (AMORIM et al., 2003; ROSSETTO et al., 2009; CELESTINO et al., 2011; CHAVES et al., 2011).



**Figura 8.** Estrutura histológica de folículos pré-antrais caprinos após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina. (A) folículo primordial (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas), (B) transição (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas), (C) primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas) e (D) secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas). O: oócito; N: núcleo; G: células da granulosa. Barras; A, B e C = 12,5  $\mu\text{m}$  e D = 25  $\mu\text{m}$ . Fonte: Silva et al. (2004).

### 2.10.2. Imunohistoquímica

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 (ALMEIDA et al., 2012) e hormônios (BARROS et al., 2013; Dados não publicados), bem como seus receptores (BEN-HAROUSH, 2005) presentes nos ovários, além de ser utilizada também para verificar a proliferação das células da granulosa (ABIR et al., 2006).

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. O maior desafio para se realizar adequadamente a técnica de imunohistoquímica é determinar se um antígeno tem atividade contra um anticorpo específico (HOFFMAN et al., 2008).

### 3. JUSTIFICATIVA

A região Semiárida do Vale do São Francisco, com destaque para o Estado de Pernambuco, apresenta-se como uma região atrativa para se desenvolver a cadeia produtiva da ovinocaprinocultura. Uma das formas de promover a sustentabilidade e o desenvolvimento da ovinocaprinocultura é viabilizando pesquisas para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas, que poderiam aumentar a produtividade dos rebanhos ovinos e, conseqüentemente, proporcionar mais lucro aos produtores. Nesse sentido, a otimização da biotécnica reprodutiva de MOIFOPA (ovário artificial) contribuirá para uma melhor compreensão da fisiologia ovariana em ovinos e, em longo prazo, para a produção *in vitro* de uma grande quantidade de embriões nesta espécie. Esses embriões possibilitariam uma rápida multiplicação de animais de interesse zootécnico ou geneticamente superiores.

Uma das substâncias que parece exercer influência sobre o controle da fisiologia reprodutiva, especialmente da foliculogênese inicial em ovinos é o FGF-2, que já foi localizado em folículos ovarianos e promoveu o crescimento folicular em diferentes espécies. Entretanto, em ovinos, a expressão do FGF-2 nas diferentes categorias e compartimentos foliculares, bem como o papel do FGF-2 sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais ainda não foi elucidado.

#### 4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Após cultivo *in situ* (inclusos em tecido ovariano) de folículos, o FGF-2 mantém a viabilidade, influencia positivamente a ativação, o crescimento e reduz a apoptose de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in vitro*.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo Geral:**

Verificar a expressão do FGF-2 em ovários ovinos e seu efeito sobre a morfologia e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

### **5.2. Objetivos Específicos**

Verificar a expressão do FGF-2 nas diferentes categorias (folículo primordial, primário, secundário e antral) e compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa e da teca) em ovários ovinos;

Observar o efeito do FGF-2 sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos, tendo como parâmetros: sobrevivência, ativação, crescimento folicular e apoptose.

## CAPÍTULO 1

**Immunohistochemical localization of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)  
in the sheep ovary and its effects on preantral follicle apoptosis and  
growth *in vitro***

**(LOCALIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE  
CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2) NO OVÁRIO OVINO E SEU  
EFEITO SOBRE A APOPTOSE E O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE  
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS)**

J. M. S. Santos<sup>A</sup>, V. G. Menezes<sup>A</sup>, R. S. Barberino<sup>A</sup>, T. J. S. Macedo<sup>A</sup>,  
T. L. B. Lins<sup>A</sup>, B. B. Gouveia<sup>A</sup>, V. R. P. Barros<sup>A</sup>, L. P. Santos<sup>A</sup>,  
R. J. S. Gonçalves<sup>A</sup>, M. H. T. Matos<sup>A</sup>

<sup>A</sup> Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), 56300-990, Petrolina-PE, Brasil.

(Submetido para publicação no periódico *Reproduction in Domestic Animals*)

**Immunohistochemical localization of Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)  
in the sheep ovary and its effects on preantral follicle apoptosis and  
growth *in vitro***

J. M. S. Santos<sup>A</sup>, V. G. Menezes<sup>A</sup>, R. S. Barberino<sup>A</sup>, T. J. S. Macedo<sup>A</sup>, T. L.  
B. Lins<sup>A</sup>, B. B. Gouveia<sup>A</sup>, V. R. P. Barros<sup>A</sup>, L. P. Santos<sup>A</sup>, R. J. S. Gonçalves<sup>A</sup>,  
M. H. T. Matos<sup>A,B</sup>

<sup>A</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal  
University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil

<sup>B</sup>Corresponding author. Email: [helena.matos@univasf.edu.br](mailto:helena.matos@univasf.edu.br)

Running head: Role of FGF-2 on *in vitro* 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 aims of this study were to characterize FGF-2 expression in ovine ovaries using immunohistochemistry and to verify the effect of FGF-2 on the morphology, apoptosis and growth of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. After collection, one fragment of ovarian tissue was fixed for histological and TUNEL analysis (fresh control). The remaining fragments were cultured for 7 days, at 39 °C. For the experimental conditions, the control medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) was supplemented with FGF-2 at different concentrations (1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL). After culturing, ovarian tissue was destined to histology and TUNEL analysis. Oocyte and follicle diameters were measured using Image-Pro Plus® software. The immunostaining for FGF-2 was observed in oocytes from primordial, primary and secondary follicles, as well as in granulosa cells of secondary and antral follicles. The percentage of normal follicles was similar among control medium, 1 and 10 ng/mL of FGF-2, and significantly higher than other FGF-2 treatments. Moreover, a significant increase in follicle diameter was observed when tissues were cultured in 10, 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2 compared with the fresh control and the other treatments. Similar results were observed for oocyte diameter in tissues cultured with 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2 ( $P < 0.05$ ). The percentage of apoptotic cells reduced ( $P < 0.05$ ) in ovarian tissues cultured in 1 or 10 ng/mL of FGF-2 compared with control medium and other FGF-2 treatments. In conclusion, this study demonstrated the presence of FGF-2 in ovine ovaries. Furthermore, 10 ng/mL FGF-2 inhibits apoptosis and promotes ovine follicle growth.

**Additional keywords:** Ovary, ovine, paracrine factor, immunohistochemistry, culture, viability

## **Introduction**

The mammalian ovary is a dynamic organ in which a large majority of follicles are effectively eliminated during their growth and maturation phase through a process called atresia (MATSUDA et al., 2012). It is well known that endocrine, autocrine, and paracrine factors coordinate the processes of follicular growth and atresia (THOMAS et al., 2008). Fibroblast growth factors (FGFs) constitute a group of well known paracrine regulators within the follicle (VAN DEN HURK and ZHAO, 2005). The most studied member of this family is FGF-2, also called basic FGF.

Immunohistochemical studies have localised FGF-2 to the oocytes of primordial and primary follicles (cow: VAN WEZEL et al., 1995; rat: NILSSON et al., 2001), as well as in the corpus luteum in cattle (SALLI et al., 1998). Furthermore, FGF-2 receptors (FGFR) or their mRNA have been demonstrated in granulosa cells from the primordial and primary stage in women (BEN-HAROUSH et al., 2005). Recently, Almeida et al. (2012) have demonstrated that granulosa cells from preantral and antral follicles produce FGF-2 during all phases of caprine follicular development.

Some authors have reported that FGF-2 can maintain caprine oocyte survival in culture (ZHOU and ZHANG, 2005) and may be important for bovine granulosa cell survival until ovulation (BERISHA et al., 2006). Furthermore, supplementation with FGF2 reduced the proportion of bovine apoptotic cumulus cells after *in vitro* maturation (ZHANG & EALY, 2012). Other *in vitro* studies

have shown that FGF-2 promotes the transition from primordial to growing follicles, a process called follicular activation (rat: NILSSON et al., 2001; goat: MATOS et al., 2007; woman: GAROR et al., 2009), and stimulates follicular growth in different species (cow: WANDJI et al., 1996; domestic cat: JEWGENOW & STOLTE, 1996; goat: ALMEIDA et al., 2012). Moreover, addition of FGF-2 to the medium improves *in vitro* maturation (IVM) (ZHANG & EALY, 2012) and increases the percentage of bovine blastocysts production (FIELDS et al., 2011).

Although there is abundant evidence that FGF-2 plays a paracrine role in the regulation of follicle growth and survival, little is known about its effect upon *in vitro* ovine preantral follicle development. Therefore, the aims of this study were 1) to characterize protein expression for FGF-2 in ovine ovaries by immunohistochemistry and 2) to verify whether different concentrations of FGF-2 have beneficial effects on the morphology, apoptosis, activation and growth of ovine preantral follicles cultured *in vitro*.

## **Material and methods**

### *Source of ovarian tissue*

This study was carried out in Petrolina (-09° 23'55 " South and 38° -40°30' 03 " West, Pernambuco, Brazil), during the dry season. The animals used in this study were in good body condition and were non-pregnant and presumed to be undergoing normal oestrous cycles as judged by the presence of normal corpora lutea at slaughter. Ovarian cortical tissues (n=12 ovaries) were collected at a local abattoir from six adult (1 - 3 years old) mixed-breed sheep. 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 FGF-2*

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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 rabbit polyclonal anti-FGF-2 (1:40; Santa Cruz Biotechnology, USA). 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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.

#### *In vitro culture of preantral follicles*

For *in vitro* culture, additional pair of caprine ovaries (n=12) 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, ovarian cortex samples from each ovarian pair were cut into eight slices approximately 3 mm x 3 mm (1 mm thick) in size using a needle and scalpel under sterile conditions. For each animal, 1 slice of tissue was randomly selected and immediately fixed for histological and TUNEL analysis (fresh control). The remaining slices of ovarian cortex were cultured individually in 1 mL of culture medium in 24-well culture dishes for 7 days; the culture conditions were 39 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The basic culture medium (control) consisted of α-MEM (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany; pH 7.2–7.4) supplemented with ITS (insulin 10 µg/mL, transferrin 5.5 µg/mL and sodium selenite 5.0 ng/mL), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, and 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 50 µg/mL ascorbic acid and then referred as α-MEM<sup>+</sup>. For the experimental conditions, the control medium was supplemented with FGF-2 at different concentrations (1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL). Each treatment was repeated six times, thus using the ovaries of six different animals. The culture medium was replenished every second day.

#### *Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth*

Tissues from all treatments (fresh control, control medium and FGF-2 treatments) were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Dinâmica, São Paulo, Brazil) for 18 h and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Dinâmica, São Paulo, Brazil), the caprine tissue pieces were cut into 5 µm sections, and every section was mounted on glass slides and stained by Periodic Acid Schiff hematoxylin. Follicle stage and

survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined by microscopy (Nikon, Japan) at 400X magnification.

The developmental stages of preantral follicles have been defined previously as follows (SILVA et al., 2004): primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened to cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte and no sign of antrum formation). These follicles are classified individually as histologically normal when an intact oocyte is present and surrounded by granulosa cells that are well organized in one or more layers and have no pyknotic nuclei. Atretic follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall, 180 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment-replicate x 6 replicates = 180 follicles), totaling 1,080 preantral follicles.

To evaluate follicular activation (transition from primordial to growing follicles, when surrounding squamous pregranulosa cells become cuboidal and begin to proliferate) and growth, only morphologically normal follicles with a visible oocyte nucleus were recorded, and the proportion of primordial and growing follicles was calculated at day 0 (fresh control) and after 7 days of culture. In addition, from the basement membrane, major and minor axes of each oocyte and follicle were measured using Image-Pro Plus® software. The average of these 2 measurements was used to determine the diameters of both the oocyte and the follicle.

### *Detection of apoptotic cells by TUNEL Assay*

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used for a more in-depth evaluation of ovine preantral follicle quality before and after *in vitro* culture. TUNEL was performed using a commercial kit (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, USA) following the manufacturer's protocol, with some modifications. Briefly, 5 µm-sections mounted on glass slides were deparaffinized and rehydrated through graded alcohols, then rinsed in PBS (pH 7.2). Antigen retrieval by microwave treatment was performed in sodium citrate buffer (pH 6.0; Dinâmica, São Paulo, Brazil) for 6 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dinâmica, São Paulo, Brazil) in methanol (Dinâmica, São Paulo, Brazil) at room temperature for 10 min. After rinsing in Tris buffer (Dinâmica, São Paulo, Brazil), the sections were incubated with TUNEL reaction mixture at 37°C for 1 h. Then, the specimens were incubated with Converter-POD in a humidified chamber at 37°C for 30 min. The DNA fragmentation was revealed by incubation of the tissues with diaminobenzidine (DAB; 0.05% DAB in Tris buffer, pH 7.6, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) during 1 min. Finally, sections were counterstained with Harry's haematoxylin in a dark chamber at room temperature for 1 min, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and mounted with balsam (Dinâmica, São Paulo, Brazil). For negative controls, slides were incubated with label solution (without terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme) instead of TUNEL reaction mixture.

Only follicles that contained an oocyte nucleus were analyzed for apoptotic assay. The number of brown TUNEL positive cells (oocyte and granulosa cells) was counted in ten randomly fields per treatment using Image-Pro Plus®

software. The percentage of TUNEL positive or apoptotic cells was calculated as the number of apoptotic cells out of the total number of cells.

### *Statistical analysis*

Percentages of morphologically normal, primordial and developing follicles were submitted to ANOVA and the Tukey's test was applied for comparison among treatments. Values of apoptotic cells were submitted to Qui-square and differences were considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ . The results of follicular survival and growth were expressed as the mean  $\pm$  SD and the results of follicular activation were expressed as the mean  $\pm$  SEM.

## **Results**

### *Immunohistochemical localization of FGF-2 in ovine ovarian follicles*

Figure 1 and Table 1 show the expression pattern of immunohistochemical staining for FGF-2 in ovine ovaries. Oocytes from primordial (Fig. 1A), primary (Fig. 1B) and secondary (Fig. 1C) stages showed a moderate reaction for FGF-2. A weak immunostaining for FGF-2 was observed in granulosa cells of secondary follicles, as well as in cumulus and mural granulosa cells from early (Fig. 1E and 1F) and large (Fig. 1G and 1H) antral follicles. No staining was observed in theca or stromal cells neither in negative controls (Fig. 1D e 1I). A Tabela 1 resume os principais achados da imunolocalização para o FGF-2 em folículos ovarianos ovinos.

### *Follicular morphology and development after in vitro culture*

The preantral follicles cultured in 10 ng/mL FGF-2 showed centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membranes (Fig. 2A). After culturing with higher concentrations of FGF-2 such as 200 ng/mL, atretic follicles with a retracted oocyte and pyknotic nucleus could be observed (Fig. 2B).

The Figure 3 shows the percentage of normal preantral follicles before (fresh control) and after *in vitro* culture. The percentage of morphologically normal follicles decreased significantly after 7 days of culture in all the treatments, compared with the fresh control. In addition, the percentage of follicular survival was similar among control medium ( $\alpha$ -MEM), 1 and 10 ng/mL FGF-2, and significantly higher than other FGF-2 treatments.

In all culture conditions, a significant reduction in the percentage of primordial follicles was observed concomitant with an increase in the percentage of growing follicles compared to the fresh control (Fig. 4). However, no significant influence of FGF-2 on the percentage of growing follicles was observed. Moreover, a significant increase in follicle diameter was observed when tissues were cultured in 10, 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2 compared with the fresh control and the other treatments (control medium and 1 ng/mL) (Table 2). Similar results were observed for oocyte diameter in tissues cultured with 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2 ( $P < 0.05$ ).

#### *Apoptotic cell detection*

The percentage of TUNEL positive cells in ovine preantral follicles after culture is shown in Figure 5. After 7 days of culture, TUNEL positive cells increased ( $P < 0.05$ ) in ovarian tissues preserved in control medium and in

higher concentrations of FGF-2 (50, 100 and 200 ng/mL) compared with the fresh control. In addition, the percentage of apoptotic cells reduced ( $P < 0.05$ ) in ovarian tissues cultured in 1 or 10 ng/mL FGF-2 compared with control medium (MEM) and other FGF-2 treatments. In all treatments, apoptosis occurred more frequently in the oocyte (Fig. 2C), except in preantral follicles cultured in 200 ng/ml FGF-2, in which both oocyte and granulosa cells were noticed as TUNEL positive (Fig. 2D). Negative control did not show staining for TUNEL analysis (Fig. 2E).

## Discussion

This study demonstrated a variable pattern of intensity and distribution of the FGF-2 expression in ovine ovarian follicles using immunohistochemical analysis and verified the effect of FGF-2 on *in vitro* apoptosis and development of ovine follicles. In the present study, immunostaining for FGF-2 was observed in oocytes from primordial, primary and secondary follicles, and this pattern has also been reported by others (cow: VAN WEZEL et al., 1995; rat: NILSSON et al., 2001; human: BEN-HAROUSH et al., 2005; goats: ALMEIDA et al., 2012). In addition, FGF-2 protein was localized in granulosa cells from ovine secondary and antral follicles, which closely resembled that found in caprine follicles (ALMEIDA et al., 2012). These data support the hypothesis that the FGF-2 may be important in the regulation of mammal folliculogenesis.

In our study, culture of ovarian tissues in the control medium ( $\alpha$ -MEM) or at the lowest concentrations of FGF-2 (1 or 10 ng/mL) resulted in a greater percentage of histologically normal follicles than did culture of the tissues at other concentrations of FGF-2. However, the results of TUNEL analysis

demonstrated that tissues cultured at 1 or 10 ng/ml FGF-2 reduced the percentage of apoptotic cells compared with the control medium (MEM) and higher FGF-2 concentrations. Although histological analysis of atresia in follicles remains the most classic and reliable method, the 3' end labelling technique (TUNEL) happens to be a very sensitive method for the in situ visualization of apoptosis at the cellular level (SREEJALEKSHMI et al., 2011). Moreover, detection of DNA fragmentation in early stage of follicular atresia using TUNEL has been more specific than the morphological features (YANG and RAJAMAHENDRAN, 2000). Previous *in vitro* studies demonstrated that FGF-2 prevents rat granulosa cell apoptosis (TILLY et al., 1992). The mechanism by which FGF-2 mediates granulosa cell survival is unknown, but there is evidence that FGF-2 prevents apoptosis through the maintenance of normal levels of intracellular free calcium ( $Ca^{2+}$ ) (CHAVES et al., 2012). In granulosa cells, FGF-2 controls  $Ca^{2+}$  levels through a protein kinase C delta (PKCd)-dependent mechanism. Furthermore, FGF-2-activated PKCd regulated  $Ca^{2+}$  levels by stimulating calcium efflux, accounting in part for the ability of FGF-2 to maintain calcium homeostasis and ultimately granulosa cell viability (PELUSO et al., 2001). Nevertheless, in the present study, high concentrations of FGF-2 (50, 100 and 200 ng/mL) reduced follicular survival and increased apoptosis after 7 days of culture. At these high concentrations, FGF-2 may be toxic during the earlier stages of ovine follicular development. Interestingly, at 200 ng/mL FGF-2, the higher percentage of granulosa cells positive for TUNEL may indicate that most of these follicles are in the advanced stages of atresia. Adversely to our results, Matos et al. (2007) have demonstrated that 50 ng/mL FGF-2 increased the percentage of caprine morphologically normal follicles compared with the

other treatments. The divergence between our results in sheep and those in goats (MATOS et al., 2007) may likely be explained by the differences between the species and differences in the basic culture medium used.

The initiation of follicle growth, also known as follicular activation, is defined as the transition of primordial follicles from the quiescent to the growth phase (CHAVES et al., 2012). Although some previous studies have demonstrated that FGF-2 induced an increase in follicular activation (NILSSON et al., 2001; goat: MATOS et al., 2007; woman: GAROR et al., 2008), we did not observe a significant effect of this factor on follicular activation when compared to tissues cultured in control medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>). This can be due to the fact that  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> is an enriched medium, containing non-essential amino acids, carbohydrates, sodium pyruvate, lipoic acid, biotin, vitamins (GULART et al., 2009) and DNA precursors, all of which promote cell division (HARTSHORNE, 1997).

In the present study, the addition of 10, 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2 to the culture medium increased follicular diameters after 7 days of culture. Similar results were observed for oocyte diameters from tissues cultured at 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2. However, it is important to note that our TUNEL analysis showed that these highest FGF-2 concentrations also increased apoptosis in cultured follicles. Therefore, we suggest that the increase in follicle and oocyte diameters observed with 50, 100 or 200 ng/mL FGF-2 are due to follicular necrosis, which is characterized by swelling of the cell as a result of increased cellular vacuolization (BARROS et al., 2001). Nevertheless, the FGF-2 produced by follicular cells in addition to the FGF-2 added to the culture medium at low concentration (10 ng/mL) may have promoted accelerated



follicular growth, maintaining follicular survival. Some studies have also shown that FGF-2 promotes an increase in follicular diameter (WANDJI et al., 1996; MATOS et al. 2007, 2011).

In conclusion, this study demonstrated the presence of FGF-2 protein in ovine ovaries, indicating the involvement of this paracrine factor in the early stages of folliculogenesis. Furthermore, 10 ng/mL FGF-2 can be successfully used to inhibit apoptosis and promote ovine follicle growth. These culture system established in this work contribute to future investigations of the appropriated culture conditions required to support complete preantral follicle growth and subsequent oocyte maturation *in vitro*.

### **Acknowledgements**

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Process 482306/2010-6). J. M. S. Santos is a recipient of a grant from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

### **References**

Almeida, A.P., Saraiva, M.V.A., Filho, J.G.A., Silva, G.M., Gonçalves, R.F.B., Brito, I.R., Silva, A.W.B., Lima, A.K. F., Cunha, R.M.S., Silva, J.R.V., and Figueiredo, Jr. (2012). Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the *In vitro* Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. *Reprod. Dom. Anim.* **47**, 20-25.

Barros, L.F., Hermosilla, T., and Castro, J. (2001). Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol.* **130**, 401-409.

Ben-Haroush A., Abir R., Ao A., Jin S., Kessler-Icekson G., Feldberg D., and Fisch B. (2005). Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fert. Steril.* **84**, 257-268.

Berisha, B., Steffl, M., Amselgruber, W., and Schams, D. (2006) Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction.* **13**, 319-329.

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.* **20**, 640 -647.

Chaves, R.N., Matos, M.H.T. Buratini Jr, J and Figueiredo, J.R. (2012). The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* **24**, 905-915.

Fields, S.D., Hansen, P.J., and Ealy, A.D. (2011). Fibroblast growth factor requirements for *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology.* **75**, 1466-1475.

Garor, R., Abir, R., Erman, A., Felz, C., Nitke, S., and Fisch, B. (2009). Effects of basic fibroblast growth factor on *in vitro* development of human ovarian primordial follicles. *Fertility and Sterility*. **91**, 1967-1975.

Gulart, L.V.M. (2009). Efeito do FSH adicionado aos meios definidos de maturação oocitária sobre o desenvolvimento precoce de embriões bovinos. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. 1-107.

Hartshorne, G.M. (1997). *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev. Reprod.* **2**, 94-104.

Hoffman, G.E., Wei, L.E., and Luciane, V. S. (2008). The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2**,12.

Jewgenow, K. & Stolte, M. (1996). Isolation of preantral follicles from non domestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reprod. Dom. Anim.* **44**, 183-190.

Matos, M.H.T., Van Den Hurk, R., Lima-Verde, I.B., Luque, M.C.A., Santos, K.D.B., Martins, F.S., Bão, S.N., Lucci, C.M., and Figueiredo, J.R. (2007). Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cells. Tissues. Organs.* **186**, 112-120.

Matos, M. H. T., Bruno, J. B., Rocha, R. M., Lima-Verde, I. B., Santos, K. D., Saraiva, M. V., Silva, J. R. V., Martins, F. S., Chaves, R.N., Bão, S. N., and

FIGUEIREDO, J. R. (2011). *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res. Vet. Science*. **90**, 404-411.

Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., and Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*. **58**, 44-50.

Nilsson, E., Parrot, J.A., and Skinner, M.K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol*. **175**, 123-130.

Peluso, J.J., Pappalardo, A., Fernandez, B. (2001). Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC $\delta$ -dependent pathway. *Endocrinology*. **10**, 203-211.

Salli, U., Bartol, F.F., Wiley, A.A., Tarleton, B.J. and Braden, T.D. (1998). Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol. Reprod*. **59**, 77-83.

Silva, J.R.V., Van Den Hurk, R., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., Lôbo, R.N.B., and Figueiredo, J.R. (2004). Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim. Reprod. Science*. **81**, 273-286.

Sreejalekshmi, P., Raghavendra, B.S., Subramani, T.S., Murthy, V.C., Jamuna, K.V., Prasad, R.V., Ravindra, J.P., and Selvaraju, S. (2011). Detection of Follicular Apoptosis in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Ovary by Histology and Nick End Labelling Technique. *Reprod Dom Anim* **46**, 59–65.

Thomas, F.H., Wilson, H., Silvestri, A. and Fraser, H.H. (2008). Thrombospondin-1 Expression Is Increased during Follicular Atresia in the Primate Ovary. *Endocrinology* **149**, 185–192.

Tilly, J.L., Billig, H., Kowalski, K.I. and Hsueh, A.J. (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1942-1950.

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

Van Wezel, I.L., Umapathysivam, K.; Tilley, W.D.; Rodgers, R.J. (1995) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol.* **115**, 133-140.

Wandji, S.A., Eppig, J.J., and Fortune, J.E. (1996). FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. *Theriogenology*. **45**, 817-832.

Yang, M.Y., Rajamahendran, R. (2000). Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* **62**, 1209-1217.

Zhang, k., Ealy, A.D. (2012). Supplementing fibroblast growth factor 2 during bovine oocyte *in vitro* maturation promotes subsequent embryonic development. *Open Journal of Animal Sciences.* **2**, 119-126.

Zhou, H., Y. Zhang (2005). Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest. Anim. Endoc.* **28**, 235-242.

**Table 1.** Relative intensity of immunohistochemical staining for FGF-2 in the ovaries of sheep.

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

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

**Table 2.** Mean oocyte and follicular diameter (mean  $\pm$  SD) in the fresh control and after *in vitro* culture of ovine preantral follicle in different concentrations of FGF-2.

Treatments	Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ )	Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )
Fresh	48.46 $\pm$ 9.76	38.36 $\pm$ 10.78
Control	59.92 $\pm$ 10.38 <sup>B</sup>	43.32 $\pm$ 8.94 <sup>B</sup>
1 ng/mL	58.47 $\pm$ 7.35 <sup>B</sup>	44.90 $\pm$ 8.83 <sup>B</sup>
10 ng/mL	60.49 $\pm$ 12.45 <sup>A*</sup>	45.76 $\pm$ 9.38 <sup>B</sup>
50 ng/mL	63.31 $\pm$ 9.41 <sup>A*</sup>	50.58 $\pm$ 6.29 <sup>A*</sup>
100 ng/mL	64.47 $\pm$ 7.84 <sup>A*</sup>	53.18 $\pm$ 8.63 <sup>A*</sup>
200 ng/mL	63.35 $\pm$ 5.84 <sup>A*</sup>	51.75 $\pm$ 6.90 <sup>A*</sup>

\* Differs significantly from fresh control ( $P < 0.05$ ).

(<sup>A,B</sup>) Different letters denote significant differences within the column ( $P < 0.05$ ).



## Figure captions

Figure 1. Immunolocalization of FGF-2 protein in ovine ovarian follicles. Primordial (A), primary (B), secondary (C), early antral (E and F) and large antral follicle (G and H). Note that negative control did not show immunostaining for FGF-2 (D and I). O: oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; TC: theca cell.

Figure 2. Histological sections of ovine ovarian fragments after periodic acid Schiff-hematoxylin or TUNEL staining. Normal primordial follicles (A) and atretic primary follicle (B) after culturing in 10 ng/mL or 200 ng/mL FGF-2, respectively; Apoptotic primary follicles cultured in 10 ng/mL (C) and 200 ng/mL de FGF-2 (D); Negative control (E). Note the apoptosis in the oocyte in Figure C (\*), and in both oocyte (\*) and granulosa cells (arrows) in figure D. O: oocyte; GC: granulosa cells. Scale bar: 25  $\mu$ m (400x).

Figure 3. Percentage of ovine morphologically normal preantral follicles in fresh tissues (fresh control) and after *in vitro* culture in different concentrations of FGF-2.

\* Differs significantly from fresh control; <sup>A,B</sup> Comparison among treatments (P<0.05).

Figure 4. Percentage of ovine primordial (A) and growing (B) follicles in fresh tissues (fresh control) and after *in vitro* culture in different concentrations of

FGF-2. \* Differs significantly from fresh control; <sup>A,B</sup> Comparison among treatments (P<0.05).

Figure 5. Percentage of TUNEL positive cells in fresh tissues (fresh control) and after *in vitro* culture in different concentrations of FGF-2. \* Differs significantly from fresh control; <sup>A,B</sup> Comparison among treatments (P<0.05).

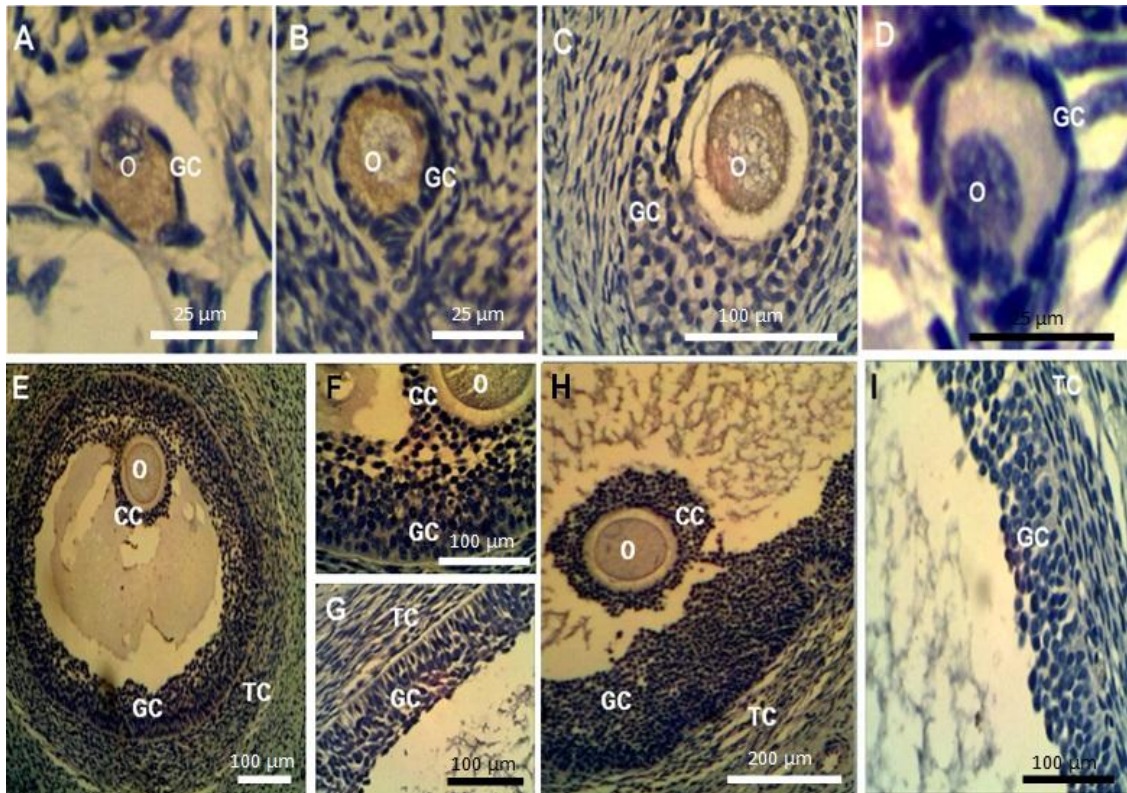
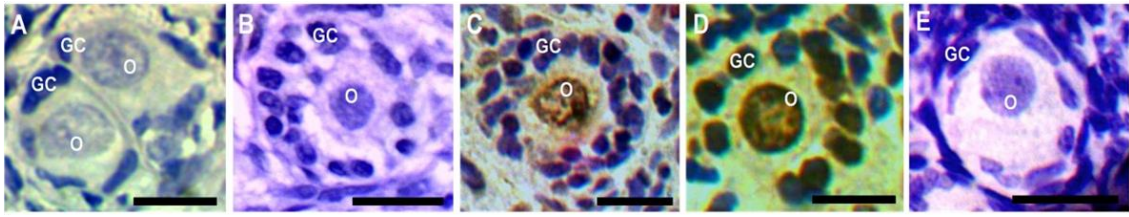


Figure 1.



**Figure 2.**

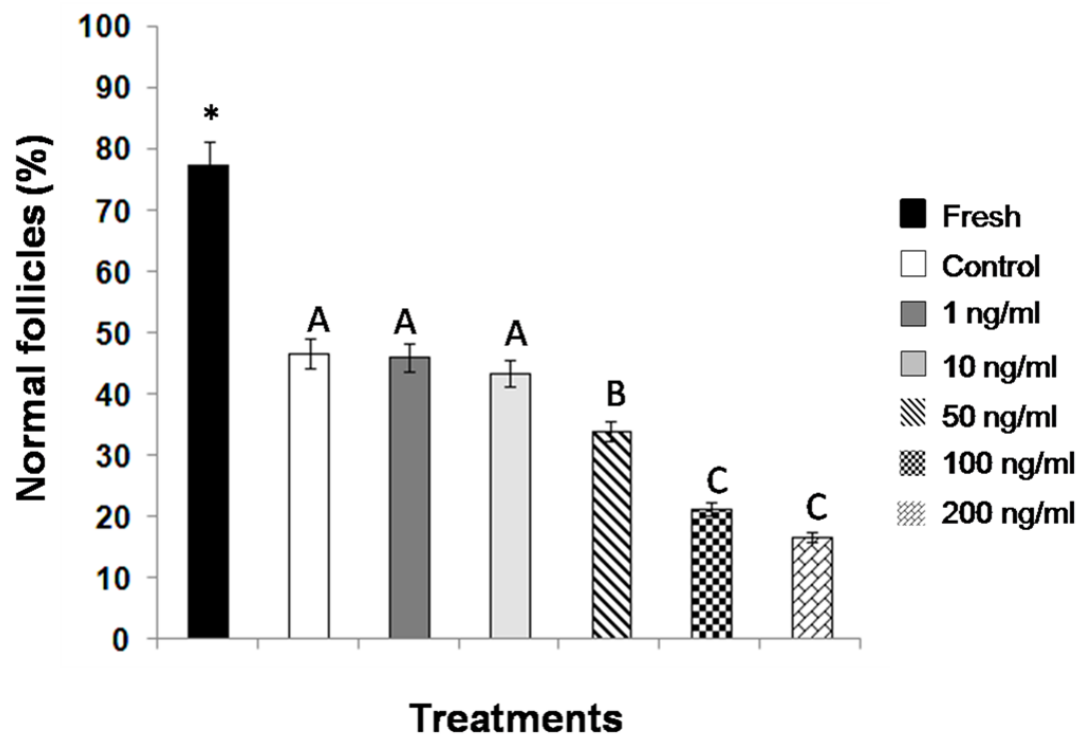


Figure 3.

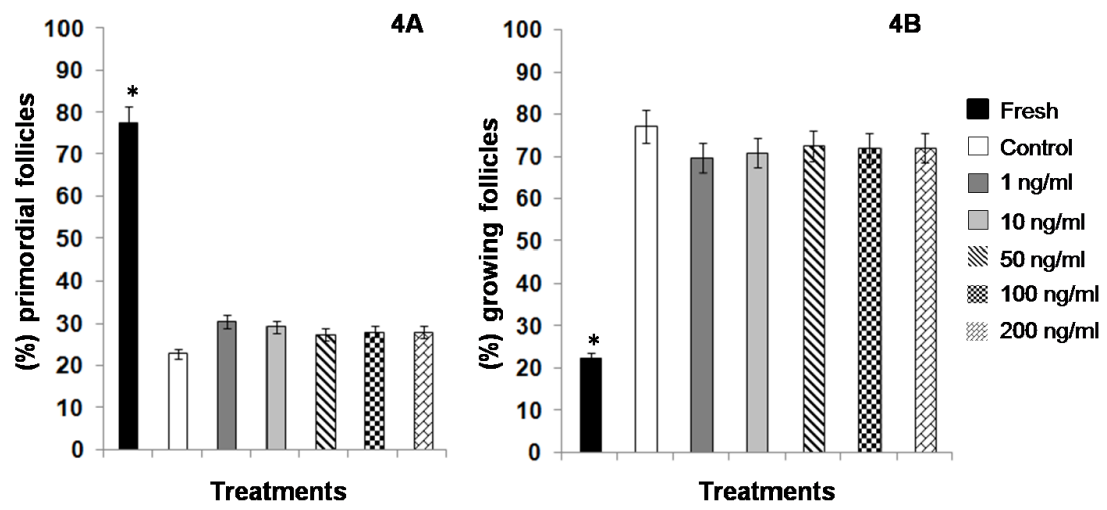


Figure 4.

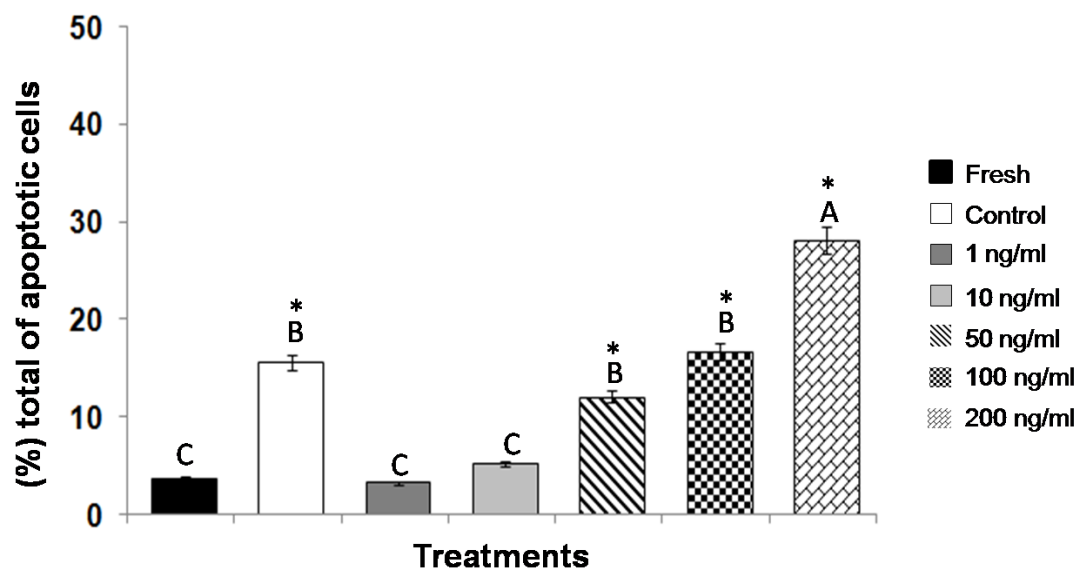


Figure 5.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho detectou a expressão para a proteína do FGF-2 em folículos ovinos bem como a influência desse fator no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos.

## 7. PERSPECTIVAS

Torna-se necessário o desenvolvimento de novos protocolos, utilizando o FGF-2, que aprimorem o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos, o que irá auxiliar diretamente a produção *in vitro* (PIV) de embriões ovinos, visto que para o sucesso dessa técnica, há a necessidade de um suporte adequado aos folículos durante as fases de crescimento *in vitro*, o que garantirá oócitos de qualidade a serem maturados *in vitro* para a posterior fecundação.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. *Histol. Histopathol.*, v. 21, p. 887-898, 2006.
- ADHIKARI, B.N.; WALL, D.H.; ADAMS, B.J. Desiccation survival in an Antarctic nematode: Molecular analysis using expressed sequenced tags. *BMC. Genomics.*, v. 10, n. 5, p. 69, 2009.
- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 45, p. 180-187, 2010.
- ALMEIDA, A.P.; SARAIVA, M.V.A.; FILHO, J.G.A.; SILVA, G.M.; GONÇALVES, R.F.B.; BRITO, I.R.; SILVA, A.W.B.; LIMA, A.K. F.; CUNHA, R.M.S.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, JR. Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the In vitro Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 47, p. 20-25, 2012.
- ALVES, E.A.; PADILHA, L.; SAVI, P.A.; APPARICIO M.F.; MOSTACHIO, G.Q. MOTHEO, T.F.; PIRES-BUTTLER, E.A.; VICENTE, W.R.R.; LUVONI, G.C. In vitro Survival of Follicles Collected from Domestic Cats' Ovaries at Different Stages of Oestrous Cycle and Cultured with IGF-1. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 47 p. 109–112, 2012.
- AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; RONDINA, D.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertility and Sterility*, v. 79, p. 682-682, 2003.
- ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; BRACARENSE AP., F.R.L.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 64, p. 1104-1113, 2005.
- ANDRADE, E.R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L.A.; HERTEL, M.F.; MELO-STERZA, F.A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. *Zygote*, v.4, p. 379-388, 2012.

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

ASAKAI, R.; SONG, S.Y.; ITOH, N.; YAMAKUNI, T.; TAMURA, K.; OKAMOTO, R. Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.104, p. 75-80, 1995.

BAILLET, A.; MANDON-PEPIN, B. Mammalian ovary differentiation - A focus on female meiosis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 356, p.13-23, 2012.

BARROS, V.R.P.; CAVALCANTE A.Y.P.; MACEDO, T.J.S.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.; GOUVEIA B.B.; MENEZES V.G.; QUEIROZ, M.A.A.; ARAÚJO, V. R.; PALHETA-JÚNIOR, R.C.; LEITE, M.C.P.; MATOS, M. H. T. Immunolocalization of Melatonin and Follicle Stimulating Hormone receptors in caprine ovaries and their effects during in vitro development of isolated preantral follicles (dados não publicados).

BEN-HAROUSH, A.; ABIR, R.; AO, A.; JIN, S.; KESSLER-ICEKSON G.; FELDBERG, D.; FISCH, B. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fertility and Sterility*, v. 84, p.1257-1268, 2005.

BERGANTINI, A.P.F.; CASTRO, F.A.; SOUZA, A.M.; FETT-CONTE, A.C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 27, n. 2, p.120-125, 2005.

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. 162–171, 2004.

BERISHA, B; STEFF, M.; AMSELGRUBER, W.; SCHAMS, D. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction*, p.319-329, 2006.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DER HURK, R. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v. 47, p. 13-22, 1997.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. *Cell. Cycle.*, v. 6, n. 21, p. 2612-2619, 2007.

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

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

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

BURATINI, J. JR; PINTO M.G.; CASTILHO, A.C.; AMORIM, R.L.; GIOMETTI, I. C.; PORTELA, V.M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol. Reprod.*, 743-750, 2007.

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

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

CAO, M.; NICOLA, E.; PORTELA, V.M.; PRICE, C.A. Regulation of serine protease inhibitor E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non luteinizing bovine granulosa cells *in vitro*. *Matrix. Biol.*, v. 25, p. 342-354, 2006.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.; CASTRO, S.V.; LUZ, H.K.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, A.P. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 76, p. 933-941, 2011.

CASTILHO, A. C. S.; MACHADO, M.F.; DALANEZI, F.; BURATINI JR, J. Envolvimento da subfamília do fator de crescimento fibroblástico 7 (FGF7) no controle da foliculogênese antral em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 37, p. 37-44, 2013.

CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LOPES C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 16, n. 338, p.1-9, 2011.

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

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

CHAVES, R.N.; MATOS, M.H.T.; BURATINI JR, J.; FIGUEIREDO, J.R. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.24, p.905–915, 2012.

CELESTINO, J.J.H.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; ALMEIDA, A.P.; CUNHA, R.M.S.; LIMA, L.F.; NAME, K.O.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-State Level of Kit Ligand mRNA in goat ovaries and the role of Kit ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. **Mol. Reprod. Devel.**, v. 77, p. 231-240, 2010.

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

CONTI, M.; H. M.; HSIEH, M.; ZAMAH, M.A., OH, S.J. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molec. Cell. Endocrinol.**, v. 356, p. 65-73, 2012.

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

DESAGHER, S.; MARTINOU, J-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis, **Trends. Cell. Biol.**, v. 10, p. 369-377, 2000.

DRIANCOURT, M.A.; GIBSON, W.R.; CAHILL, L.P. Follicular dynamics throughout the o estrus cycle in sheep. A review. **Reprod. Nutr. Develop.**, v. 25, p.1-15, 1985.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe. **J. Reprod. Fert.**, v. 93, p.63-70, 1991.

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

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, p. 495-516, 2007.

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

EPPIG, J.J. & O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Biol. Reprod.**, v. 54, p.197-207, 2003.

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

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

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, p. 303–327, 2008.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, A.P.R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. **Small. Ruminant. Research.**, v. 98, p. 192-195, 2011.

FILICORI, M.; COGNIGNI, G.E.; TARABORRELLI, S.; SPETTOLI, D.; CIAMPAGLIA, W.; TABARELLI DE FATIS, C.; POCOGLI, P.; CANTELLI, B.; BOSCHI, S. Luteinizing hormone activity in menotropins optimizes folliculogenesis and treatment in controlled ovarian stimulation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, v. 86, p. 337–343, 2001.

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. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1153-1159, 2001

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

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

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.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

GAROR, R.; ABIR, R.; ERMAN, A.; FELZ, C.; NITKE, S.; FISCH, B. Effects of basic fibroblast growth factor on *in vitro* development of human ovarian primordial follicles. **Fertil. Steril.**, v. 91, p. 1967-1975, 2009.

GOLDFARB, M. Signaling By Fibroblast Growth Factors: The Inside Story. **Sci. Stke.**, v. 106, 2001.

GOSPODAROWICZ, D. & MORAN, J. Effect of a fibroblast growth factor insulin, dexamethasone, and serum on the morphology of BALB/c 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.12, 4648-4652, 1974.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales d'Endocrinologie**, v. 7, p. 132–143, 2010.

GREENFELD, C.R.; PEPLING, M.E.; BABUS, J.K.; FURTH, P.A.; FLAWS, J.A. BAX regulates follicular endowment in mice. **Reproduction**, v.133, p.865-876, 2007.

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, p. 1322-1328, 2000.

HAIL, J. R. N.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*, v. 11 p. 889–904, 2006.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Rev. Cytol.**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HIRSHFIELD, A. N. Size–frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 1181-1188, 1988.

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

HREISSON, J.G; SCOTT, J.E; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M.L.; HSUEH, A.L.W.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.316-321, 2002.

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default.shtm>, acesso em 15.06.13.

<http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>, acesso em 02.01.13.

HUGHES, F. M.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, v. 129, p. 2415-2422, 1991.

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

ITOH, N. & ORNITZ, D. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. ***Trends in Genetics.***, v.20, p. 563-569, 2004.

JEFFREY, B. K. A célula. In: JEFFREY, B. K. ***Atlas de histologia funcional.*** São Paulo: Artes Médicas, p. 1-25, 2000.

JEWGENOW, K. & STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. ***Reprod. Dom. Anim.***, v. 44, p.183-19, 1996.

JIN, S.Y.; LEI, L.; SHINAKOV, A.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K. A novel two-step strategy for *in vitro* culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. ***Fertil. Steril.***, v. 93, p. 2633-2639, 2010.

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. Sci.***, v. 26, n. 3-4, p. 239-250, 1991.

JOHNSON, J.; CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K., AND TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. ***Nature***, v. 428, p. 145–150, 2004.

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

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

JUENGEL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; HEATH, D.A.; LUN, S.; WAKEFIELD, S.J.; MCNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. ***Mol. Cell. Endocrinol.***, v. 191, p. 1-10, 2002.

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

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. ***Methods. Cell. Biol.***, v. 46, p. 1-27, 1995.

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

LAVIN, M. R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. *J. Psychiatry.*, v. 150, p. 1752-1753, 1993.

LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.*, v. 4, n. 4, p. 505-515, 2005.

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. 41-48, 2013.

LIN, F.; RAN, L.; PAN Z. X.; ZHOU, B.; YU, D. B.; WANG, X. G.; MA X. S.; HAN, J.; SHEN, M.; LIU, H. L. miR-26b Promotes Granulosa Cell Apoptosis by Targeting ATM during Follicular Atresia in Porcine Ovary. *Breed.Reprod.*, v.7, p. 386-396, 2012.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections 22 of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprinepreantralfollicles. *Anim Reprod.Sci.*, v. 56, p. 39-49, 1999.

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

MACHADO, M.F. Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 17 e 18 (FGF17 e FGF18) em folículos antrais bovinos. **Dissertação de mestrado.** UNESP – Botucatu, 2008.

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

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

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J.J.; SARAIVA, M.V.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; ROCHA-JUNIOR, C.M.; LIMA-VERDE, I.B.; LUCCI, C.M.; BÁO, 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. Fertil. Devel.*, p. 20, n. 8, p. 916-24, 2008.



- MATOS, M. H. T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, p. 433-442, 2007a.
- MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; SANTOS, K. D. B.; MARTINS, F. S.; BÃO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v. 186, p.112-120, 2007b.
- MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA, R. M.; LIMA-VERDE, I. B.; SANTOS, K. D.; SARAIVA, M. V.; SILVA, J. R. V.; MARTINS, F. S.; CHAVES, R.N.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Res.Vet. Sci.**, v. 90, n. 3, p. 404-411, 2011.
- 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.A. & HSUEH. A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200-214, 2000.
- MCNATTY, K.P.; FIDLER, A.E.; JUENGEL, J.L.; QUIRKE, L.D.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 163, p.11-20, 2000.
- MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. **Dev. Biol.**, v. 213, n. 1, p. 1-17, 1999.
- MOORE, R.K.; SHIMASAKI, S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 234, p. 67-73, 2005.
- MURATA, G.M. FGF-2 species of 18 and 22.5 KDa: paracrine molecular signaling and biological functions. **Thesis-Graduate Program in Biochemistry**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo., 104 p., 2010.
- MURRAY, A.A.; MOLINEK, M.D.; BAKER, S.J.; KOJIMA, F.N.; SMITH, M.F.; HILLIER, S.G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction**, v. 121, p. 89-96, 2001.
- NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 175, p. 123-130, 2001.
- NILSSON, E.; SKINNER, M.K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v.8, p.17-20, 2001.

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. Endocrinol.**, v. 214, p. 19-25, 2004.

NILSSON, E.E.; SCHINDLER, R.; SAVENKOVA, M.I.; SKINNER, M.K. Inhibitory actions of anti-mullerian hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. **PLOS ONE**, v. 6, 2011.

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

OKTEM, O.; OKTAY, K. The Ovary: Anatomy and Function throughout Human Life. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 112, p. 1-9, 2008.

ORNITZ, D.A; ITOH, N. Protein family review - fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, v. 2, p.1-12, 2001.

ORRENIUS, S.; KAMINSKY, V.O.; ZHIVOTOVSKY, B. Autophagy in Toxicology: Cause or Consequence? **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 53, p. 275-297, 2013.

PARROTT, J.A. & SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 140, p. 4262-4271, 1999.

PELUSO, J.J; PAPPALARDO, A; FERNANDEZ, B. Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC $\delta$ -dependent pathway. **Endocrinology**, v.10, p. 203-211, 2001.

PELUSO, J. J. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1363-1369, 2003.

PEPLING, M. E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis**, v. 44, p. 622-632, 2006.

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.

PORTELA, V.M.; MACHADO, M.; BURATINI, J.JR.; ZAMBERLAM, G.; AMORIM, R.L.; GONCALVES, P.; PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, 83, 339-46. 2010.

POWERS, C.J.; MCLESKEY, S.W.; WELLSTEIN, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine-Related Cancer**, 2000, v.7, p.165-197.

QUENNEL, J.H.; STANTON, J.A.; HURST, P.R. Basic fibroblast growth factor expression in isolated small human ovarian follicles. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 10, p.623-628, 2004.

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

ROBERTS, R.D.; ELLIS, R.C.L. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 1387-1392, 1999.

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.; MAGALHÃES, D.M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Anim. Reprod.**, v. 7, p. 382-388, 2010.

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

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

SALLI, U.; BARTOL, F.F.; WILEY, A.A.; TARLETON, B.J; BRADEN, T.D. Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.59, p. 77-83, 1998.

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

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

SHARMA, G. T.; DUBEY P. K.; KUMAR S.G.; Effects of IGF-1, TGF- $\alpha$  plus TGF- $\beta$ 1 and bFGF on *in vitro* survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalus*) preantral follicles. **Growth Hormone & IGF Research**, p.319-325, 2010.

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

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

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

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

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

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, n. 2, p.185-202, 2002.

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. Update**, v. 16, p. 395-414, 2010.

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

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

TELFER, E.E.; BINNIE, J.P.; MCCAFFERY, F.H.; CAMPBELL, B.K. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. ***Mol. Cell. Endocrinol.***, v. 163, p. 117-123, 2000.

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.

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. ***Rev. Reprod.***, v.1, p.162-172, 1996.

TROLICE, M.P.; PAPPALARDO, A; PELUSO, J.J. Basic fibroblast growth factor and N-Cadherin maintain rat granulosa cell and ovarian surface epithelial cell viability by stimulating the tyrosine phosphorylation of the fibroblast growth factor receptors. ***Endocrinology***, v.138, p.107-13,1997.

UCHIYAMA, Y. Apoptosis: The history and trends of its studies. ***Arch Histol Cytol.***, v. 58, p. 127-137, 1995.

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

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

VAN WEZEL, I.L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W.D.; RODGERS, R.J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. ***Mol Cell Endocrinol***, v. 115, p. 133-140, 1995.

WANDJI, S.A.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. ***Theriogenology***, v. 45, p. 817-832, 1996.

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

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.

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

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K. Mecanismo de seleção do folículo dominante e manutenção da qualidade do ovócito. In: **Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos**, v.12, p. 1-25, 2010.

WORDINGER, R.J.; BRUN-ZINKERNAGEL, A.M.; CHANG, I-FC. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) within growing and atretic mouse ovarian follicles. **Growth Factors**, v. 9, p. 279–289, 1993.

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.

YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; NANBU, K.; KOMATSU, T.; MANDAI, M.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; MORI, T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. **Gynecol. Endocrinol.**, v.11, p.223-230, 1997.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, n. 9, p.1095-1104, 2007.

YANG, Q.E.; FIELDS, S.D.; ZHANG, K.; OZAWA, M.; JOHNSON, S.E. ALAN, D; EALY, A.D. Fibroblast Growth Factor 2 Promotes Primitive Endoderm Development in Bovine Blastocyst. **Biol. Reprod.**, v.20, p.93-113, 2011.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, p. 873-885, 2003.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H.E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, p. 10678-683, 2006.

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