



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

Luciana da Paz dos Santos

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)
EM OVÁRIOS OVINOS E SEU EFEITO SOBRE A MORFOLOGIA E O
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ISOLADOS OU
INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO**

Petrolina - PE
2014

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

Luciana da Paz dos Santos

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)
EM OVÁRIOS OVINOS E SEU EFEITO SOBRE A MORFOLOGIA E O
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ISOLADOS OU
INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO**

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.

Área de concentração: Produção animal

Linha de pesquisa: Reprodução e melhoramento genético animal.

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

Petrolina - PE

2014

*A minha mãe Maria da Paz;
Aos meus irmãos, Fabiana, Tatiana e
Tiago;*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde, força e fé.

Agradeço à Universidade Federal do vale do São Francisco - Univasf, pelos anos de ensino e aprendizagem.

Agradeço a minha orientadora, professora Dr^a Maria Helena Tavares de Matos, pelos ensinamentos desde a iniciação científica, pela paciência, disponibilidade e por mais uma vez acreditar em mim. À senhora, todo meu respeito.

Agradeço ao Grupo de pesquisa, Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos Pré-antrais - BIOFOV, (Bruna Bortoloni, Ricássio Barberino, Vanúzia Gonçalves, Thae Lanne Lins, Vanessa Barros, Jamile Maiara, Agnes Yasmin, Taís e Élide) pelo apoio e colaboração em todas as atividades de pesquisa, desde a iniciação científica até o presente momento.

Agradeço à minha mãe, Maria da Paz pelo apoio e exemplo de perseverança. Não me canso de dizer que é a senhora mãe, a grande responsável por muito do que sou hoje. E é a senhora o meu maior exemplo de força. Para a senhora, dedico todo meu amor e carinho. Muito obrigada por tudo!

Agradeço aos meus irmãos, Fabiana, Tatiana e Tiago, pelo carinho e apoio a mim dedicados. Por confiarem em mim e por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos, pelos momentos de descontração, embora raros ultimamente devido à minha rotina. Mas o meu muito obrigada, por vocês sempre se fazerem presentes de alguma forma. Em especial o meu agradecimento a Tácito Emanuel, Tayron Juliano, Paulinha Soares, Manuela Gomes, Talita Estenia, Fabiana Bidegain, Tâmara Carvalho, James Araújo, Khesia Matos, Crislane Miranda, Raliny Oliveira.

Aos meus amigos e colegas de mestrado Mayara Miranda, Livia Magalhães, Larissa Lopes, Wasley Gonçalves, Felipe Sento-Sé, Francisco Allan e Percivaldo. Muito obrigada pelos bons momentos em sala de aula e também fora dela.

Um agradecimento especial àqueles que se disponibilizaram a me ajudar sempre que precisei. Ao querido amigo Peixoto, obrigada pela disposição,

pelas palavras certas nos momentos certos. À dona Eva e seu Eliseu, do Abatedouro Abatal, pela boa vontade, sempre dispostos a me ajudar nas coletas dos ovários, em especial seu Paulo, que já fazia questão de deixar tudo certinho e ainda dizia que era para eu não ter trabalho de ficar esperando muito! Guardarei vocês em um lugar cativo aqui no meu peito.

Não posso esquecer-me de agradecer a uma pessoa tão querida e tão disponível, que me ajudou muito durante esses dois anos de mestrado. Rosângela (“Rosinha”, “Flor”), o meu muito obrigada, por tudo! Sentirei muito a falta do seu sorriso, do seu carinho, do seu chá de maçã com canela (risos), dos seus conselhos, enfim, deveriam existir mais pessoas como você!

Agradeço à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco-FACEPE, pelo financiamento do projeto e pelo apoio financeiro, inclusive concedido na forma de bolsa de estudo.

“Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus braços do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

RESUMO

Objetivou-se verificar a expressão da proteína e o efeito de diferentes concentrações do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) em ovários ovinos sobre a morfologia e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados ou inclusos em tecido ovariano. Após a coleta, os ovários ovinos foram fixados e destinados à técnica de Imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína para o EGF. Para o experimento 1, pares adicionais de ovários ovinos (n=50) foram coletados e folículos secundários foram isolados e cultivados por 18 dias a 39°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo de base foi o α -Meio Essencial Mínimo adicionado de suplementos (α -MEM⁺). Os folículos foram cultivados em α -MEM⁺ (controle) ou α -MEM⁺ adicionado de 1, 10 ou 50 ng/mL de EGF. A cada 6 dias, foram avaliados os parâmetros de sobrevivência, extrusão, formação de antro e diâmetro folicular. Para o experimento 2, outros 12 ovários ovinos foram coletados e fragmentados, sendo um fragmento destinado à histologia (controle fresco), e os demais foram cultivados *in vitro* por 7 dias a 39°C e 5% CO₂, em α -MEM⁺ (controle) sozinho ou adicionado de 1, 10, 50, 100 ou 200 ng/mL de EGF. Após o cultivo, foi realizada a análise morfológica dos folículos pré-antrais, que foram classificados como normais ou atrésicos e de acordo com o estágio de desenvolvimento. No experimento 1, os dados de sobrevivência, extrusão folicular e formação de antro foram comparados com o teste do Qui-quadrado. O diâmetro folicular e as taxas de crescimento foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e teste de Kruskal Wallis. No experimento 2, os dados de sobrevivência e ativação folicular foram submetidos à ANOVA e teste Tukey e os diâmetros folicular e oocitário, ao teste do Qui-quadrado (P<0,05). A expressão para o EGF foi observada em oócitos de folículos pré-antrais e antrais, em células da granulosa de folículos primários e secundários, bem como em células do cúmulus e murais de folículos antrais. Após 18 dias de cultivo no experimento 1, os resultados mostraram que 50 ng/mL aumentou (p<0,05) a porcentagem de folículos normais, comparado ao controle (α -MEM⁺), diminuiu a extrusão precoce de oócitos e aumentou (p<0,05) a porcentagem de folículos antrais, comparadas ao controle e 1 ng/mL de EGF. Todos os tratamentos aumentaram progressivamente o diâmetro folicular, porém não houve diferença entre eles. Os resultados do experimento 2 mostraram que após 7 dias, todos os tratamentos reduziram (p<0,05) a taxa de sobrevivência e aumentaram (p<0,05) a ativação folicular quando comparado ao controle fresco. Além disso, os tratamentos α -MEM⁺ e 1 ng/mL de EGF promoveram um aumento (p<0,05) na ativação folicular, comparado aos demais tratamentos. Não houve nenhuma influência do α -MEM⁺ e do EGF no aumento do diâmetro folicular e oocitário. Esse estudo demonstra que há expressão do EGF em folículos ovarianos ovinos. Além disso, o tratamento 50 ng/mL de EGF manteve a sobrevivência folicular e aumentou a formação de antro em folículos ovinos isolados, após 18 dias de cultivo *in vitro*. No cultivo de tecido ovariano ovino, o meio de cultivo α -MEM⁺, sozinho ou adicionado de 1 ng/mL de EGF, promove a ativação de folículos primordiais *in vitro*.

Palavras-chave: Pré-antral. Cultivo *in vitro*. Ovinos. EGF. Foliculogênese

ABSTRACT

The aims of this study were to verify the expression of epidermal growth factor (EGF) protein in ovine ovaries and to verify the effect of different concentrations of EGF on the morphology and *in vitro* development of isolated preantral follicles or follicles enclosed in ovarian tissue. After collection, ovine ovaries were fixed for immunohistochemical analysis to evaluate the expression of EGF protein. For experiment 1, additional pairs of ovine ovaries (n=50) were collected and secondary follicles were isolated and cultured for 18 days at 39°C and 5% CO₂. The basic culture medium was α -Minimal Essential Medium added by supplements (α -MEM⁺). Follicles were cultured in α -MEM⁺ (control) or α -MEM⁺ added by 1, 10 or 50 ng/mL EGF. At each 6 days, parameters as survival, extrusion, antrum formation and follicular diameter were analysed. For experiment 2, other 12 ovine ovaries were collected and fragmented. One fragment was destined to histology (fresh control) and the remaining fragments were *in vitro* cultured for 7 days at 39°C and 5% CO₂, in α -MEM⁺ alone (control) or associated with 1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL EGF. After culturing, morphological analysis of preantral follicles was performed, in which the follicles were classified as normal or atretic, and according to the stage of development. In the experiment 1, data of survival, follicular extrusion and antrum formation were compared by Qui-square test. Diameter and growth rates were submitted to Shapiro-Wilk and Kruskal Wallis test. In the experiment 2, data of follicular survival and activation were submitted to ANOVA and Tukey test and follicular and oocyte diameters to Qui-square test (P<0.05). The immunostaining for EGF was observed in oocytes from preantral and antral follicles, in granulosa cells of primary and secondary follicles, as well as in cumulus and mural cells of antral follicles. After 18 days, the results showed that treatment with 50 ng/mL EGF increased (p<0,05) the percentage of morphologically normal follicles compared with the control group (α -MEM⁺) and reduced (p<0,05) the precocious extrusion of oocytes and increased (p<0,05) the percentage of antral follicles compared with the control and 1 ng/mL EGF. All the treatments induced a progressive increase of the follicular diameter, however, there were no significant differences among treatments. Results of experiment 2 showed that after 7 days, all the treatments reduced (p<0,05) the percentage of survival and increase (p<0,05) follicular activation compared with the fresh control. In addition, α -MEM⁺ and 1 ng/mL EGF increased follicular activation, compared with the other treatments. There was no influence of α -MEM⁺ and EGF in follicle and oocyte diameters. This study demonstrated the presence of EGF in ovine ovaries. Moreover, 50 ng/mL EGF maintained follicular survival and increased antrum formation in isolated ovine follicles after 18 days of *in vitro* culture. In the culture of ovine ovarian tissue, the culture medium α -MEM⁺, alone or added by 1 ng/mL EGF, promotes primordial follicle activation *in vitro*.

Keywords: Preantral. *In vitro* culture. Ovine. EGF. Folliculogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Páginas
Figura 1	Esquema ilustrativo do ovário mamífero com presença de folículos ovarianos e corpo lúteo em diferentes estágios de desenvolvimento.	17
Figura 2	Classificação dos folículos ovarianos. Pré-antrais: (A) folículo primordial (seta aberta), de transição (seta fechada) e primário; (B) folículo secundário; Folículos antrais: (C) folículo terciário e (D) pré-ovulatório. O: oócito; N: núcleo; ZP: zona pelúcida; CG: células da granulosa; CT: células da teca; A: antro; CGM: células da granulosa murais.	20
Figura 3	Ativação do ciclo celular por diferentes vias de sinalização, decorrente da fosforilação dos resíduos de tirosina quinase induzida pela ligação do ligante (EGF) ao receptor EGFR.	27

CAPÍTULO 1

Figure 1	Immunolocalization of EGF protein in ovine ovarian follicles. Primordial (A), primary (B), secondary (C), early antral (D e E), large antral follicle (F) and negative control (G). O: Oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; Arrow: theca cell; Open arrow: mural granulosa cell.	51
Figure 2	Secondary follicles at day 0 (A), 6 (B), 12 (C) and 18 (D) of culture with 50 ng/mL EGF; atretic (E) and extruded (F) follicle cultured in α MEM ⁺ . O: oocyte; GC: granulosa cell; Arrow: antral cavity.	52
Figure 3	Percentage of normal (A) and extruded follicles (B) in the control and different treatments using EGF during 18 days	53

of culture.

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

- Figure 4 Percentage of antrum formation (A) and follicular diameter (B) in the control and different treatments using EGF during 18 days of culture. 54
- ^{A,B} Comparison among treatments within the same day of culture; ^{a,b,c,d} Comparison among days of the same treatment ($P<0.05$).

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Folículos morfologicamente normais no controle (A), Folículo atrésico após 7 dias de cultivo em EGF 200 ng/mL (B) e nos tratamentos α -MEM⁺ (C) e 1 ng/mL de EGF (D). Seta: oócito; GC: Células da granulosa; Nu: núcleo do oócito. Barra de escala: 25 μ m 73
- Figura 2. Percentual de folículos pré-antrais ovinos morfologicamente normais no controle fresco ou após cultivo *in vitro* em MEM⁺ e diferentes concentrações de EGF por 7 dias. 74
- (*) difere significativamente do controle fresco. (A-C) difere entre tratamentos no mesmo período de cultivo ($P<0,05$).

Figura 3. Percentual de folículos pré-antrais ovinos primordiais (A) e 75
em desenvolvimento (B) no controle fresco ou após cultivo
in vitro em MEM⁺ e diferentes concentrações de EGF por 7
dias.
(*) difere significativamente do controle fresco. (A-C) difere
entre tratamentos no mesmo período de cultivo (P<0,05).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabelas		Páginas
Table 1.	Relative intensity of immunohistochemical staining for FGF-2 in the ovaries of sheep	50

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Diâmetro médio oocitário e folicular (mean \pm SD) no controle fresco e depois do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais ovinos no meio controle ou em diferentes concentrações de EGF.	72
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
EGF	<i>Epidermal Factor Growth</i>
EGF-R	<i>Receptor of epidermal growth factor</i> (Receptor do fator de crescimento epidermal)
ErbB 1/2/3/4	<i>EGF receptor tyrosine kinase family 1/2/3/4</i> (Família de receptor EGF do tipo tirosina kinase 1/2/3/4)
et al.	et alli(e colaboradores)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
G	Gramas
H	Hora
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF</i> (Fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina)
HER1 1/2/3/4	<i>EGF receptor tyrosine kinase family 1/2/3/4</i> (Família de receptor EGF do tipo tirosina kinase 1/2/3/4)
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina -1)
L	Litro
LH	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio Luteinizante)
MAPK	<i>mitotic activator protein kinase</i>
MEM	Meio Essencial Mínimo
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
N	Número de amostras
ng	Nanograma
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (Fosfatidilinositol 3-kinase)
rhEGF	<i>Recombinant human epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento

epidermal recombinante humano)

RNAm *Ribonucleic acid messenger* (Ácido ribonucléico mensageiro)

STAT *Signal transducer and activator of transcription* (Transdutor de sinal e ativador de transcrição)

TGF- β , - α *Transforming growth factor beta, alpha* (Fator de crescimento transformante beta, alfa)

SUMÁRIO

2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. ASPECTOS GERAIS DO OVÁRIO MAMÍFERO.....	17
2.2. CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAS DOS FOLÍCULOS OVARIANOS	18
2.3. POPULAÇÃO E ATRESIA FOLICULAR	20
2.4. MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA O ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE....	22
2.4.1. MOIFOPA E O CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	22
2.5. ESTADO ATUAL DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	25
2.7. UTILIZAÇÃO DO EGF	28
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. OBJETIVO GERAL	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5. CAPÍTULO 1.....	32
6. CAPÍTULO 2.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
8. REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

Os animais da espécie ovina são vistos como animais altamente atrativos, do ponto de vista comercial, sendo considerados, importante fonte de carne e pele. Para aumentar o potencial reprodutivo desta espécie, atualmente, vêm sendo desenvolvidas inúmeras pesquisas na área de reprodução animal.

Uma biotécnicas relativamente nova e direcionada para as fêmeas, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), vem auxiliando na compreensão dos eventos que estão envolvidos na fase inicial de formação e crescimento dos gametas femininos.

Sabe-se que ao nascimento, o ovário ovino contém milhares de oócitos imaturos inclusos predominantemente nos folículos pré-antrais. Esses folículos são considerados fonte potencial de gametas fertilizáveis, e com isso, é de grande interesse assegurar o crescimento *in vitro* e permitir a aquisição da competência dos oócitos provenientes destes folículos (MCLAUGHLIN et al., 2010). No entanto, durante a vida reprodutiva da fêmea, poucos folículos primordiais, após iniciarem seu crescimento *in vivo*, desenvolvem-se até o estágio de folículo pré ovulatório, pois cerca de 99,9% não ovulam, morrendo por atresia (FIGUEIREDO et al., 2008; ALMEIDA-CAMPOS et al., 2012). Neste contexto a MOIFOPA, também conhecida como ovário artificial, surge como uma importante ferramenta para o resgate folicular, dando suporte necessário para a elucidação dos mecanismos envolvidos no início da foliculogênese.

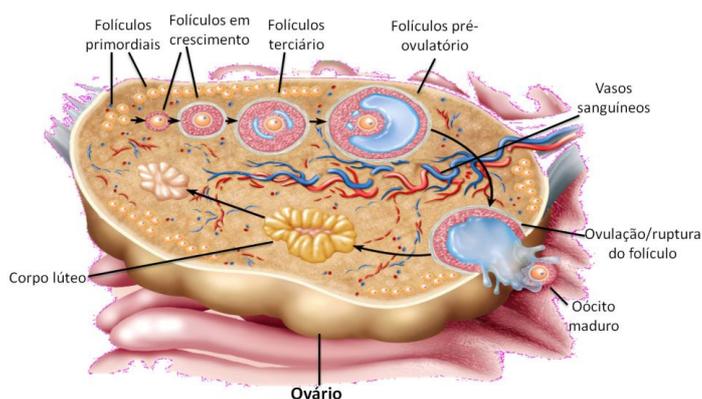
O desenvolvimento folicular é o resultado de um complexo de interações entre gonadotrofinas hipofisárias e numerosos fatores intra-ovarianos que atuam como promotores de sobrevivência e estimulam o crescimento e a diferenciação das células foliculares (FORTUNE, 2003 ; MIYOSHI et al., 2010). Dentre tais fatores, destaca-se o fator de crescimento epidermal (EGF). O EGF exerce importantes funções na foliculogênese, tais como proliferação de células da granulosa (MORBECK et al., 1993) e redução dos níveis de atresia folicular (MAO et al., 2004). O EGF tem se mostrado como uma importante substância capaz de induzir o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos *in vitro* (CELESTINO et al., 2009; SILVA et al., 2013). Entretanto, poucas pesquisas foram realizadas com os ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais do ovário mamífero

Em todas as espécies mamíferas, o ovário (Figura 1) é composto de duas regiões distintas, uma medular e outra cortical, circundada pelo epitélio germinativo (BAILLET & MANDON-PEPIN, 2012). 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 e corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento ou em regressão (SILVA et al., 2005). O ovário desempenha duas funções prioritárias para o sistema reprodutivo de fêmeas mamíferas, sendo responsável pela: 1) diferenciação e liberação de um oócito maduro para fertilização (MCGEE, HSUEH, 2000); 2) síntese e secreção de hormônios que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade estral/menstrual e manutenção do trato reprodutivo e suas funções (HIRSHFIELD, 1991). A funcionabilidade deste órgão durante a vida reprodutiva das fêmeas depende da perfeita interação entre fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, que atuam coordenando o processo da foliculogênese ovariana (ALVES et al., 2012).

Figura 1. Esquema ilustrativo do ovário mamífero com presença de folículos ovarianos e corpo lúteo em diferentes estágios de desenvolvimento.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2004

2.2. Classificação e características estruturais dos folículos ovarianos

A foliculogênese nos mamíferos é um processo complexo, iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação que envolve mudanças na morfologia, como crescimento e maturação folicular e oocitária, bem como diferenciação das células da granulosa (ROCHA et al., 2013). No momento da formação, numerosos eventos ocorrem ao mesmo tempo. Há uma intensa colonização de células mesonéfricas, que são consideradas, também, percussoras das células foliculares e migração das células germinativas primordiais (CGP's) para a crista gonadal, diferenciação do sexo gonadal, mitoses e apoptoses das células germinativas (PALMA et al., 2011). As CGP, dentro do ovário, multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias e em seguida, as oogônias sofrem meiose e se transformam em oócitos primários, apresentando um núcleo em prófase I e estágio de vesícula germinativa (SUH et al., 2002). Dessa forma, a foliculogênese tem início com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005; GOUGEON, 2010).

O folículo ovariano, contendo um oócito, é a unidade morfofuncional do ovário e está circundado por células da granulosa e/ou tecais (CHOI et al., 2013). 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 De Graaf ou pré-ovulatório (SILVA et al., 2004) (Figura 3).

Os gametas femininos são estocados no ovário, principalmente, na forma de folículos primordiais. Os folículos primordiais constituem a fonte de folículos que são gradualmente recrutados para crescerem durante toda vida reprodutiva da fêmea (CHAVES et al., 2012). Esses folículos possuem um oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa. 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).

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo dinâmico e altamente controlado e, apesar do enorme progresso nas

pesquisas, muitos dos mecanismos moleculares envolvidos ainda não são conhecidos (SANCHEZ e SMITZ, 2012). O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa, seguida do aumento do diâmetro oocitário, o que pode acontecer dias, meses ou anos após a sua formação. Além da mudança na morfologia das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente (BRISTOL-GOULD, WOODRUFF 2006). Alguns autores sugeriram que a ativação dos folículos primordiais pode ser controlada tanto por gonadotrofinas hipofisárias, como por fatores intraovarianos (fatores de crescimento) (HIRSHFIELD, 1991) e que o desenvolvimento folicular é dependente de uma refinada sincronia entre fatores inibitórios e estimulatórios (MAGALHÃES et al., 2010). Fatores peptídicos, incluindo o Kit ligand (KL) e o fator inibidor de leucemia (LIF), são secretados pelas células da pré-granulosa que circundam os oócitos. Esses fatores têm estimulado *in vitro* a transição de folículos primordiais para primários e o crescimento do oócito e o recrutamento e proliferação das células da teca do estroma circundante (NILSSON; KEZELE; SKINNER, 2002; NILSSON; SKINNER, 2003, 2004). Estudos mais recentes têm sugerido um importante papel do Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) sobre o início do crescimento de folículos primordiais (CHAVES et al., 2012). Porém, existem ainda, outros fatores que estão envolvidos nesse evento.

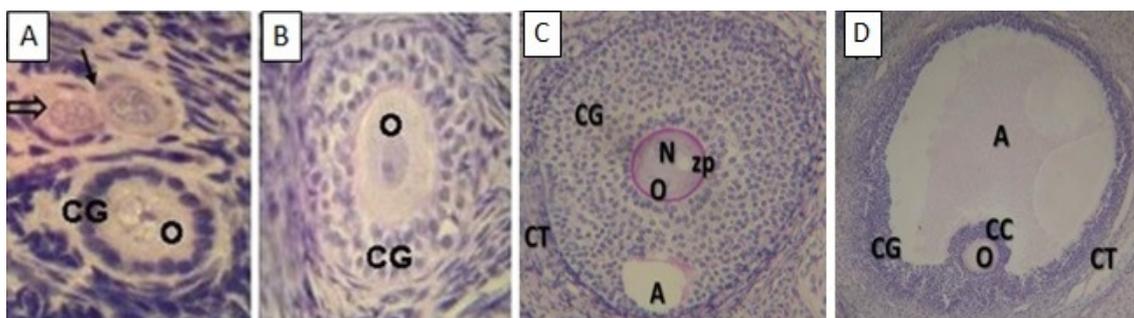
Após a ativação, os folículos primordiais gradualmente adquirem células da granulosa com morfologia cúbica, tornam-se folículos de transição e, em seguida, folículos primários (Figura 2A), quando são circundados por uma camada simples de células da granulosa cúbicas (SILVA et al., 2004; SANCHEZ, SMITZ 2012). A multiplicação das células da granulosa destes folículos leva à formação de várias camadas de células ao redor do oócito, formando os folículos secundários (Figura 2B). Nestes, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito (PARROT & SKINNER, 1999). Nessa fase, inicia-se a formação das camadas de células da teca a partir de células do estroma intersticial (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Com o crescimento dos folículos secundários e 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 (Figura

2C). O diâmetro dos folículos aumenta acentuadamente devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa e da teca (SANCHEZ, SMITZ 2012), aumento da cavidade antral e aumento da vascularização da camada da teca (SANCHEZ et al., 2010). O fluido antral 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).

No último estágio do desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório (Figura 2D) é caracterizado por um oócito circundado por células especializadas, inicialmente células da granulosa, que agora são denominadas de células do cúmulus. Mais externamente há formação das células murais em resposta ao hormônio luteinizante (LH) (SANCHEZ, SMITZ 2012). A ovulação do oócito juntamente com as células do cúmulus ocorre em resposta ao pico de LH (DRIANCOURT et al., 1991).

Figura 2. Classificação dos folículos ovarianos. Folículos pré-antrais: (A) folículo primordial (seta aberta), de transição (seta fechada) e primário; (B) folículo secundário; Folículos antrais: (C) folículo terciário e (D) pré-ovulatório. O: oócito; N: núcleo; ZP: zona pelúcida; CG: células da granulosa; CT: células da teca; A: antro; CGM: células da granulosa murais.



Folículos pré-antrais

Folículos antrais

Fonte: Arquivo pessoal

2.3. População e atresia folicular

A população folicular é estabelecida ainda na vida fetal (em primatas e ruminantes – BETTERIDGE et al., 1989), entre a 3^a e a 6^a semana após a concepção, ou em um curto período de tempo após o nascimento em roedores (HIRSHFIELD, 1991).

A população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma forte variação individual (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), sendo que os folículos pré-antrais representam 90% do total de folículos presentes no ovário e constituem o estoque de gametas femininos podendo estes, crescer naturalmente *in vivo* ou estarem aptos ao crescimento e maturação quando cultivados *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2008; LIMA et al., 2011). A população folicular é de aproximadamente 160.000 na ovelha (DRIANCOURT et al., 1991), 1.500 na camundonga (SHAW et al., 2000), 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999), e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). Entretanto, na última década, estudos tem sugerido que é possível a renovação da população folicular durante a vida adulta, na fêmea. Estes estudos deram origem à teoria de neo-oogênese.

O estudo realizado por Johnson et al. (2004) demonstrou a presença de proteínas específicas pra o início da meiose que deveriam ser expressas apenas durante a vida fetal, em ovários de camundongos fêmeas adultas. Resultados de trabalhos seguintes realizados pela mesma equipe sugerem a existência de uma reserva de células germinativas para o ovário de ratas adultas na medula óssea, bem como no sangue periférico (JOHNSON et al., 2005). Bukovisk et al. (2004), tendo como base resultados de estudos histológicos e de imunohistoquímica, sugerem a existência de um processo de formação sequencial de novos folículos primordiais, a partir de células mesenquimais progenitoras, encontradas na túnica albugínea ovariana. Além disso, um estudo recente mostrou que células oogoniais humanas purificadas foram introduzidas em tecido cortical de humanos adultos, gerando oócitos no estágio de diplóteno da meiose e recrutando células da granulosa para formar novos folículos primordiais (WHITE et al., 2012). No entanto, apesar de haver evidências sobre a formação de novos folículos nos ovários de fêmeas adultas, não se sabe se nesses folículos teriam potencial para crescimento adequado, resultando na formação de um oócito meioticamente competente. Além disso, não se sabe se esse processo de neogênese ocorre em todas as fêmeas mamíferas adultas. Dessa forma, ainda há um longo caminho a percorrer até se chegar a alguma resposta realmente conclusiva sobre esse assunto.

Em contrapartida, apesar da numerosa população folicular presente no ovário mamífero, a quase totalidade dos folículos, ou seja, 99,9%, não chegam à ovulação, morrendo por um processo fisiológico denominado atresia

(FIGUEIREDO et al., 2008; ALMEIDA-CAMPOS et al., 2012). O processo de atresia folicular nos animais domésticos e primatas tem início ainda na vida fetal (PALMA et al., 2011) e usualmente ocorre de forma diferenciada entre folículos pré-antrais e antrais. Em folículos pré-antrais, os primeiros sinais de morte folicular surgem no oócito, onde se pode observar a retração da cromatina nuclear e a fragmentação oocitária (SILVA et al., 2002). Após a formação do folículo antral, ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa (JORIO et al., 1991). A atresia pode ocorrer por via apoptótica (LIN et al. 2012) ou pelo processo degenerativo de necrose (FIGUEIREDO et al., 2008).

A atresia folicular e os fatores que influenciam este processo são extensivamente estudados e tem sido demonstrado, que muitos hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos. A elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial, incluindo o processo de atresia, 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.

2.4. Modelos *in vitro* para o estudo da foliculogênese

2.4.1. MOIFOPA e o Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), também conhecida como ovário artificial, é uma biotécnica da reprodução que vem sendo aprimorada nos últimos tempos e consiste numa das principais ferramentas utilizadas atualmente para a elucidação da foliculogênese inicial. Tal biotécnica 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 fecundação *in vitro*, transgênese e clonagem (FIGUEIREDO et al., 2008). Para alcançar esse objetivo, é necessário o aprimoramento do sistema de cultivo *in vitro* para que o

desenvolvimento folicular seja adequado e consiga alcançar boas taxas de recuperação de oócitos e, conseqüentemente, a maturação (FIGUEIREDO et al., 2011).

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, vem sendo largamente empregado com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes estádios do desenvolvimento folicular, a fim de tentar compreender, através de estudos *in vitro*, os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário durante a foliculogênese. Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados são dependentes do tipo de meio, concentração da substância (hormônio, fator de crescimento, antioxidantes, etc.), sistema de cultivo utilizado, bem como da espécie animal, estudada (EPPIG E SCHOEDER, 1989, BOLAND et al., 1994, FORTUNE, 2003).

Os folículos podem ser cultivados "*in situ*", ou seja, inseridos em fragmentos do córtex ovariano ou isolados. Em pequenos animais (roedores), realiza-se o cultivo do ovário inteiro (O'BRIEN, PENDOLLA, EPPIG, 2003). Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, alguns autores têm realizado o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, com o objetivo de estudar a ativação destes folículos e o posterior crescimento de folículos primários (bovinos: BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997; babuínos: WANDJI et al., 1997; caprinos: MATOS et al., 2007). Além da praticidade, o cultivo *in situ* proporciona a manutenção da integridade tridimensional dos folículos e a interação destes com células do estroma.

Os folículos pré-antrais, também podem ser isolados e cultivados individualmente. Para o isolamento dos folículos, podem ser utilizados métodos mecânicos e/ou enzimáticos (ABIR et al., 2001). Desta forma, métodos mecânicos têm sido mais utilizados para isolar um grande número de folículos primários e/ou secundários intactos de ovários de diferentes espécies (vacas: FIGUEIREDO et al., 1993; cabras: LUCCHI et al., 1999; ovelhas: CECCONI et al., 1999). 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).

Este sistema pode ser realizado de forma bidimensional (camundongo: LORET de MOLA et al., 2004), na qual o folículo pode ser cultivado

diretamente sobre o suporte de plástico, sobre uma matriz ou pode ser realizado em microgotas de meio de cultivo sob óleo mineral, utilizando placas de Petri ou em placas de multipoços, que requerem maior volume de meio, porém dispensam o uso de óleo. Já o cultivo tridimensional, na qual o folículo é incluso em uma matriz, como por exemplo, o colágeno ou hidrogel de alginato (HORNICK et al., 2012), tem que assegurar a manutenção da arquitetura tridimensional do folículo durante seu desenvolvimento *in vitro*, permitir a passagem do meio e dessa forma, o acesso dos hormônios e fatores de crescimento às células foliculares e ainda, permitir o crescimento folicular sem prejudicar sua forma (SMITZ et al., 2010).

Além disso, alguns autores têm optado por realizar um cultivo de dois passos, associando dois sistemas de cultivo, em que primeiro é realizado o cultivo *in situ*, e em seguida, o cultivo dos folículos isolados crescidos *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPIG, 2003; TELFER et al., 2008)

2.4.2. Técnicas para análise folicular durante o cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* por si só, já é uma técnica eficaz para avaliar viabilidade folicular, visto que a progressão de um folículo para qualquer que seja o estágio mais avançado que o seu estágio inicial, só é possível, *in vitro*, se o mesmo estiver primeiramente íntegro e também tendo suporte (utilização de meios de cultivo, umidade, temperatura etc...) adequado para o seu desenvolvimento. No entanto, diferentes técnicas podem auxiliar a análise folicular antes, durante e após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

Dentre as técnicas disponíveis e que vêm sendo utilizadas, destacam-se a histologia clássica (HC) e a imunohistoquímica.

A HC é uma técnica muito utilizada, que permite avaliar um grande número de folículos, tornando-se importante para uma análise quantitativa (MATOS et al., 2004). As colorações mais comumente empregadas são: hematoxilina-eosina (HE) (NILSSON e SKINNER, 2002) e Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina) (CHAVES et al., 2008). Porém, através da HC não é possível, por exemplo, avaliar a integridade das organelas citoplasmáticas.

A imunohistoquímica consiste em detectar, através de um produto visível ou fluorescente, uma molécula, ou seja, um antígeno presente em um tecido.

Desta forma, esta técnica vem sendo utilizada para avaliar a expressão de proteínas ligantes e receptores de fatores de crescimento e hormônios presentes nos ovários (BRUNO et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012).

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

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Nas espécies bovina (GUTIERREZ et al., 2000; MCCAFFERY et al., 2000), canina (SERAFIM et al., 2010) e humana (ROY & TREACY, 1993), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Em caprinos e ovinos, folículos secundários crescidos *in vitro* tiveram seus oócitos maturados e fecundados *in vitro*, obtendo-se embriões em estágio de mórula (MAGALHÃES et al., 2010; ARUNAKUMARI et al., 2010). Já em suínos e bubalinos, esse desenvolvimento embrionário alcançou o estágio de blastocisto (GUPTA et al., 2008). Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. EPPIG & O'BRIEN (2003) obtiveram o nascimento de 59 ratos saudáveis a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*.

2.6. Expressão e sinalização do EGF e seus receptores

É sabido que eventos biológicos que acontecem no ovário mamífero como proliferação de células da granulosa, maturação de oócitos e esteroidogênese, sofrem influência de gonadotrofinas e de fatores intra-ovarianos (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Dentre os fatores intra-ovarianos, podemos citar o Fator de Crescimento Epidermal – EGF (SILVA et al., 2006).

Sabe-se que precursores (pró-EGF) são glicoproteínas que pesam entre 140 e 170 kDa. Quando expressos, os pró-EGF são normalmente liberados dentro de poucas horas no espaço extracelular por clivagem proteolítica no domínio C-terminal do EGF, gerando um fragmento solúvel similar ao tamanho do seu precursor (MASSAGUE&PANDIELLA, 1993).

A família EGF é composta por vários membros, a saber: o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), a anfiregulina (AR), a epiregulina (EPR), a betacelulina (BTC) e as neuregulinas (NRG1-4) (PARK et al., 2004; CONTI et al., 2006). Esses ligantes possuem em comum um domínio de 45-55 aminoácidos incluindo seis resíduos de cisteína, que interagem covalentemente formando três alças, responsáveis pela especificidade de ligação aos respectivos receptores (CASALINI et al., 2004).

Esses fatores de crescimento pertencentes à família EGF, podem ligar-se a diferentes tipos de receptores transmembranários (SILVA et al, 2010). Dessa forma, a atividade biológica dos membros desta família é mediada por receptores do tipo tirosina quinase, localizados na superfície da membrana plasmática, responsáveis por iniciar e manter uma complexa rede de eventos que controlam o crescimento e a diferenciação celular (LAFKY et al., 2008). O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), também participa na especificação do destino celular e coordena a proliferação celular. O EGFR é uma glicoproteína de membrana com 170 KDa, formada por 1.186 aminoácidos, membro da família de quatro receptores (EGFr/ErbB-1, HER-2/HerbB-2, HER-3/ErbB-3 e HER-4/ErbB-4). O receptor do fator de crescimento epidermal é codificado pelo gene EGFR localizado no cromossomo 7 (SRIVASTAVA et al, 2001). Já expressão da proteína e o RNA mensageiro (RNAm) para o EGFR é regulada positivamente pelas gonadotrofinas e pelos esteróides (GARNETT et al., 2002).

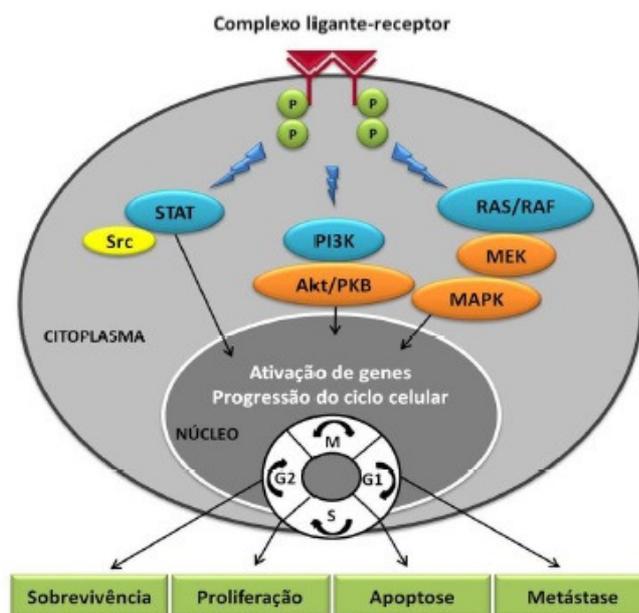
A ligação de EGFR com o seu ligante, o EGF, desencadeia dimerização do receptor que leva a autofosforilação de múltiplos resíduos de tirosina e ao recrutamento de uma infinidade de enzimas e proteínas essenciais para a sobrevivência e proliferação celular (UHM et al., 2010). Resíduos fosforilados de tirosina servem como sítios para moléculas adaptadoras e sinalizadoras responsáveis por iniciar uma série de cascatas de eventos dentro das células (SILVA et al., 2010). A heterodimerização aumenta a diversidade de ligantes reconhecidos pelos receptores individuais, além de permitir o recrutamento de diferentes moléculas adaptadoras e sinalizadoras, que ativam diferentes vias de sinalização (YARDEN, 2001; ROSKOSKI, 2004). A cascata de transdução do sinal é bastante complexa e envolve inúmeras vias de sinalização celular. Algumas vias que auxiliam na transmissão de sinais dos receptores tirosina

quinases ao núcleo já foram identificadas, sendo as principais: EGFR/ERBB, a ativação das proteínas RAS/RAF pelos receptores tirosina quinase, a via das proteínas STAT e a via PI3-quinase (PI3K) (SILVA et al., 2010) (Figura 3).

O efeito do EGF na proliferação celular é mediado por ativadores mitogênicos proteínas quinases que são capazes de ativar as proteínas a partir da adição de grupamentos fosfatos, desencadeando cascatas sinalizadoras que amplificam os sinais e estimulam células quiescentes a entrar no ciclo celular (RAFFERTY et al, 2001), sendo também portanto, considerado um fator mitogênico de células da granulosa (SAHA et al. 2000 ; WANG et al. 2007)

Alguns estudos têm buscado a detecção de ligantes específicos aos receptores ERBB/EGFR durante as várias fases da foliculogênese em diferentes espécies (hamster: ROY & GREENWALD, 1990; humano: MARUO et al., 1993; suíno: SINGH et al., 1995; caprino: GALL et al., 2004). No entanto, o padrão de expressão dos ligantes, bem como dos receptores desses fatores tem gerado resultados conflitantes durante o desenvolvimento folicular. Na espécie ovina, ainda não foi realizada a detecção da proteína ligante do EGF, nem foi avaliada a influência desse fator de crescimento, em diferentes concentrações, sobre a viabilidade e o crescimento folicular *in vitro*.

Figura 3. Ativação do ciclo celular por diferentes vias de sinalização, decorrente da fosforilação dos resíduos de tirosina quinase induzida pela ligação do ligante (EGF) ao receptor EGFR.



Fonte: Adaptado de SILVA et al, 2010

A proteína EGF tem sido demonstrada no oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais (humano: BENNETT et al., 1996, hamster: ROY & GREENWALD, 1990; suíno: SINGH et al., 1995), enquanto o RNAm para o EGF já foi descrito em oócito e células da granulosa de folículos antrais suínos (SINGH et al., 1995a). Estudos de biologia molecular têm demonstrado a expressão do EGFR em oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais (camundonga: HILL et al., 1999; rata: FENG et al., 1987; hamster: GARNETT et al., 2002, vaca: LONERGAN et al., 1996; porca: SINGH et al., 1995;mulher: QU et al., 2000), bem como nas células luteais de ratas (TEKPETEY et al.,1995) e porcas (SINGH et al., 1995b). Ergin et al, (2008) observaram forte imunocoloração para o EGFR em oócitos e marcação moderada em células da granulosa de ratas.

A proteína para o EGF e seu receptor foi demonstrada nos folículos ovarianos caprinos em todos os estádios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo e na superfície do epitélio ovariano (SILVA et al., 2006). Um estudo recente utilizando ovários de cabra, mostrou que os níveis de RNAm de EGF em folículos secundários foram significativamente maiores do que em folículos primordiais. Além disso, nos pequenos e grandes folículos antrais, os níveis de RNAm para EGF em complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram significativamente superiores quando comparado as células da granulosa/ teca (CELESTINO et al, 2011).

2.7. Utilização do EGF

O EGF é considerado um fator mitogênico que estimula a proliferação de vários tipos celulares (TOYODA et al., 2007). Este fator de crescimento está envolvido na regulação de diversos processos importantes para a fisiologia ovariana (SILVA et al.,2006), incluindo proliferação celular, diferenciação e esteroidogênese (SAHA et al.,2000). O EGF pode também atuar como um fator de crescimento mitogênico durante a MIV, afetando a sobrevivência, a migração e o desenvolvimento de embriões de suínos *in vitro* e possui importância nos eventos envolvidos na implantação durante a gestação (UHM et al, 2010; JEONG et al., 2013).

Estudos mostraram que o EGF promove a proliferação das células da granulosa (suínos: MORBECK et al., 1993; roedores e humanos: GOSPDAROWICZ e BIALECKI, 1979) e o aumento do diâmetro de folículos pré-antrais (suínos: MAO et al., 2004; bovinos: GUTIERREZ et al., 2000; humanos: ROY & KOLE, 1998), induz a transição de folículos do estágio primordial para primário em caprinos (CELESTINO et al., 2009), e primário para secundário em suínos (MORBECK et al., 1993), além de reduzir os níveis de atresia em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (bovinos: GUTIERREZ et al., 2000; suínos: MAO et al., 2004; caprinos: ZHOU & ZHANG, 2005). Além disso, o EGF (10 ng/mL) aumentou a formação de antro após o cultivo de folículos isolados suínos (MAO et al., 2004). Nesta mesma espécie, o EGF, associado ao FSH, melhorou a qualidade dos oócitos, aumentando a taxa de desenvolvimento embrionário (WU & TIAN, 2007). Em cabras, um estudo recente, mostrou que o EGF aumentou a porcentagem de formação de antro e a taxa de crescimento diário de folículos isolados (SILVA et al., 2013). Além disso, o EGF na presença ou ausência de FSH aumentou a taxa de crescimento folicular de folículos secundários isolados, quando comparado ao meio controle (CELESTINO et al., 2011). Vale ressaltar que, no único trabalho realizado com a espécie ovina, o EGF foi utilizado numa concentração fixa (100 ng/ml), que juntamente com FSH, promoveu a ativação de folículos primordiais ovinos cultivados *in situ* (ANDRADE et al., 2005).

Em folículos antrais, o EGF estimula a maturação do oócito *in vitro* (vaca: LONERGAN et al., 1996; mulher: GOUD et al., 1998; camundonga: DE LA FUENTE et al., 1999; ovelha: GULER et al., 2000; porca: PROCHAZKA et al., 2003), expansão das células do cúmulus (camundonga: O'DONNELL et al., 2004), proliferação das células da granulosa (porca: MAY et al., 1992) e produção de estrógeno (mulher: MISAJON et al., 1999). Recentemente, um estudo mostrou que a adição de gonadotrofina, EGF e IGF-I no meio de maturação *in vitro* de oócitos de folículos pré-antrais e antrais de búfalas melhorou a taxa de maturação e a capacidade de desenvolvimento com elevada taxa de clivagem, produzindo mórula e blastocisto (SHARMA et al., 2011). Além disso, o EGF age localmente no ovário controlando a ação de FSH e LH, pois alguns estudos mostraram que o EGF inibe a produção de receptores de LH (HATTORI et al., 1995) e aumenta a expressão de receptores de FSH (LUCIANO et al., 1994). Entretanto, um estudo recente mostrou que o

EGF reduziu os níveis de RNAm para os receptores de FSH após o cultivo de folículos de cabra, por 6 dias (CELESTINO et al, 2011). Mais recentemente, outro estudo realizado utilizando folículos caprinos isolados, verificou que, após o cultivo *in vitro*, o EGF estimulou a expressão de RNAm para o EGF, mas reduziu a expressão de RNAm para o EGFR e a secreção de estradiol (SILVA et al., 2013).

Embora muitos estudos já tenham sido realizados, os efeitos de diferentes concentrações de EGF ainda não foram confirmados em folículos ovarianos na espécie ovina. Dessa forma, a presença da proteína ligante e de receptores para EGF em ovários mamíferos (células da granulosa, luteais, folículos pré-antrais e antrais), juntamente com os efeitos deste fator de crescimento sobre folículos de animais de laboratório e de produção, aponta para a necessidade da realização de mais estudos para explorar a função do EGF sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais ovinos.

3. JUSTIFICATIVA

A região Nordeste brasileira, com destaque para a região do semiárido do estado de Pernambuco, e mais especificamente a região do Vale do São Francisco, apresenta-se como uma região com potencial para desenvolver a cadeia produtiva da ovinocultura. Uma das formas de promover a sustentabilidade e o desenvolvimento da ovinocultura é viabilizando pesquisas para o aprimoramento de técnicas reprodutivas, que possam vir aumentar a produtividade dos rebanhos ovinos e, conseqüentemente, proporcionar mais lucro aos produtores. Nesse sentido, a otimização da técnica reprodutiva de MOIFOPA (ovário artificial) pode contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia ovariana em ovinos e, a 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.

Sabe-se que cerca de 99,9% dos oócitos morre por atresia durante as fases de crescimento e maturação *in vivo*. Considerando-se esse alto percentual de perda *in vivo*, a técnica de MOIFOPA visa criar artificialmente *in vitro* as condições necessárias para que pequenos oócitos inclusos em folículos pré-antrais, recuperados dos ovários, possam sobreviver, crescer, maturar e

posteriormente serem fecundados *in vitro*, reduzindo-se o processo de atresia que ocorre largamente nos ovários. Fatores intra-ovarianos e hormônios são necessários para a regulação da foliculogênese inicial. Um desses fatores intra-ovarianos que parece exercer influência sobre o controle da foliculogênese inicial é o EGF. Estudos mostraram que o EGF pode diminuir as taxas de atresia folicular e promover o crescimento após cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Entretanto, em ovinos, o efeito de diferentes concentrações de EGF sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ainda não foi elucidado. Além disso, o conhecimento acerca da expressão da proteína ligante do EGF em ovários ovinos contribuirá para elucidação da foliculogênese nessa espécie.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

- Estudar a expressão do EGF em ovários ovinos e verificar seu efeito sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos isolados e *in situ*.

4.2. Objetivos Específicos

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

- Avaliar o efeito do EGF sobre a morfologia, a formação de antro e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos isolados.

- Estabelecer a curva dose-resposta de EGF sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículo pré-antrais ovinos *in situ*, tendo como parâmetros a sobrevivência, a ativação e o crescimento folicular.

5. Capítulo 1

Protein localization of epidermal growth factor in sheep ovaries and improvement of follicle survival and antrum formation *in vitro*

L. P. Santos^a, V. R. P. Barros^a, A. Y. P. Cavalcante^a, V. G. Menezes^a, T. J. S. Macedo^a, J. M. S. Santos^a, V. R. Araújo^b, M. A. A. Queiroz^c, M. H. T. Matos^a

^aNucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil

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

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

Running head: Role of EGF on *in vitro* follicle culture

^dCorresponding author. Email: helena.matos@univasf.edu.br (M. H. T. Matos)

*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

Contents

The aims of this study were to characterize EGF protein expression in ovine ovaries and to verify the effect of EGF on the in vitro development of isolated preantral follicles. After collection, ovarian tissue was fixed for immunohistochemical analysis. Additional pairs of ovaries were collected and secondary follicles were cultured for 18 days in α -MEM⁺ (control) or EGF (1, 10 or 50 ng/mL). The immunostaining for EGF was observed in oocytes from preantral and antral follicles, in granulosa cells of primary and secondary follicles, as well as in cumulus and mural cells of antral follicles. After 18 days, the results showed that treatment with 50 ng/mL EGF significantly increased the percentage of morphologically normal follicles compared with the control group (α -MEM⁺) and significantly reduced the precocious extrusion of oocytes and increased the percentage of antral follicles compared with the control and 1 ng/mL EGF. All the treatments induced a progressive and significant increase of the follicular diameter throughout the period of culture. However, there were no significant differences in follicular diameter or in the daily growth rate among treatments. In conclusion, this study demonstrated the presence of EGF in ovine ovaries. Moreover, 50 ng/mL EGF maintained follicular survival and increased antrum formation in isolated ovine follicles after 18 days of in vitro culture.

Additional keywords: Ovary, EGF, paracrine factor, immunohistochemistry, culture, ovine

Introduction

The events of granulosa cell proliferation, oocyte growth and maturation and steroidogenesis, which occurs in the mammalian ovary, are influenced by locally produced growth factors and gonadotrophins (VAN DEN HURK and ZHAO 2005). Among the intraovarian factors, the epidermal growth factor (EGF) is considered a potent mitogenic factor for granulosa cells (SAHA et al. 2000; WANG et al. 2007). EGF belongs to the EGF family peptides and is synthesized as a transmembrane glycoprotein with molecular weight of 140-150 kDa. After protease action, EGF is cleaved to release the soluble form (RIESE and STERN 1998; XIAN

and ZHOU 2004) and may activate their receptors in an autocrine or paracrine manner (STIRNWEISS et al. 2005). Immunohistochemical studies have localized EGF protein in oocytes and granulosa cells of preantral and antral follicles in different species (human: BENNETT et al. 1996, hamster: ROY and GREENWALD 1990; swine: SINGH et al. 1995). Moreover, the mRNA for EGF has been demonstrated in oocytes and granulosa cells of swine antral follicles (SINGH et al. 1995) and in granulosa and theca cells of caprine secondary and antral follicles (CELESTINO et al. 2011). However, the expression of EGF protein in ovine ovarian follicles is not yet known.

The biological activity of EGF is mediated by EGF-R membrane receptors (ErB1), which belongs to the large superfamily of tyrosine kinase ErbB receptor (CONTI et al. 2006), consisting of three domains: an extracellular, a transmembrane and an intracellular domain (containing the tyrosine-kinase domain) (LAFKY et al. 2008). EGF-R was localized in the oocyte and granulosa cells of follicles in all development stages (hamster: ROY and GREENWALD 1990; human: MARUO et al. 1993; swine: SINGH et al. 1995; caprine: GALL et al. 2004). Binding of EGF-R with its ligand EGF (on the cell surface) triggers receptor dimerization that leads to transphosphorylation of multiple tyrosine residues and recruitment of several enzymes and adaptor proteins essential for cell survival and proliferation (UHM et al. 2010).

In vitro studies have shown that EGF maintains follicular survival (bovine: WANDJI et al. 1996), promotes primordial follicle activation (caprine: CELESTINO et al. 2009), follicular growth (bovine: WANDJI et al. 1996; caprine: KAJARAJAN et al. 2005; SILVA et al. 2013), besides stimulating antrum formation (bovine: GUTIERREZ et al. 2000; caprine: SILVA et al. 2013). In ovine species, the association of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Indole Acetic Acid (IAA) with EGF, in a fixed concentration, was efficient for maintaining the survival of primordial follicles activated in vitro (ANDRADE et al. 2005). However, little is known about the effect of different concentrations of EGF on the in vitro development of ovine isolated preantral follicle. Therefore, the aims of this study were 1) to characterize protein expression for EGF in ovine ovaries and 2) to verify whether different concentrations of EGF have beneficial effects on the morphology and growth of isolated ovine secondary follicles cultured in vitro.

Material and methods

Source of ovaries

For immunohistochemical studies, ovarian cortical tissues (n=10 ovaries) were collected at a local abattoir from five adult (1 – 3 years old) non-pregnant 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 antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). Then, ovaries were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Dinâmica, São Paulo, Brazil). For in vitro culture, additional pair of ovine ovaries (n=60) were collected and transported within one hour to the laboratory in tubes containing a washing medium at 4°C (CHAVES et al. 2008). 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 EGF protein

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 silanized glass slides (ImmunoSlide - EasyPath, São Paulo, Brazil). The slides were incubated in citrate buffer (Dinâmica, São Paulo, Brazil) at 98-100°C in a microwave for 10 minutes to retrieve antigenicity, and endogenous peroxidase activity was prevented by incubation with 3% H₂O₂ (Dinâmica, São Paulo, Brazil) and methyl ethanol (QEEL, São Paulo, Brazil) 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 1 h and 30 minutes at room temperature with rabbit polyclonal anti-EGF (1:50; Santa Cruz Biotechnology, USA). Then, the sections were incubated for 30 minutes with MACH4 Universal HRP Polymer (Biocare, Concord, USA). The protein localization was demonstrated with diaminobenzidine

(DAB; 0.05% DAB in PBS, pH 7.6, 0.03% H₂O₂) and the sections were counterstained with hematoxylin (Vetec, São Paulo, Brazil) for 1 minute. 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 defined previously (SILVA et al, 2004) in primordial (oocyte surrounded by a single layer of squamous or squamous and cuboidal granulosa cells), primary (oocyte surrounded by a complete 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 subjective classified as absent (-), weak (+), moderate (++) or strong (+++). The slides were examined using a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under 400X magnification.

Isolation and selection of preantral follicles

In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in fragmentation medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Secondary follicles, approximately 240 µm in diameter without antral cavities, were visualized under a stereomicroscope (magnification 100X, SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and mechanically isolated by microdissection using 26-gauge (26 G) needles coupled to 1 mL syringes. Only secondary follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: an intact basement membrane, two to three layers of granulosa cells and a visible, healthy oocyte that was round and centrally located within the follicle, without any dark cytoplasm.

In vitro culture of preantral follicles

After selection, the follicles were individually cultured (one follicle per droplet) in 100 μ l droplets of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). Incubation was conducted at 39°C and 5% CO₂ in air for 18 days. The basic control medium consisted of MEM alpha modification (α -MEM; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (10 μ g/mL of insulin, 5.5 μ g/mL transferrin, 5.0 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 ng/mL ascorbic acid and then referred as α -MEM⁺. Secondary follicles were randomly distributed in the following treatments: α -MEM⁺ alone (control) or in α -MEM⁺ supplemented with EGF at 1, 10 or 50 ng/mL. Every six days, 60 μ l of the culture media was replaced with fresh media in each droplet and at least 35- 40 follicles were allocated per treatment.

Morphological evaluation of follicle development

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

The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the increase of the follicular diameter measured from the

basement membrane, which included two perpendicular measures of each follicle, and (iii) the dairy follicular growth rate, calculated as the dairy follicular diameter variation during the culture period.

Statistical analysis

Data of morphologically normal follicles, extruded follicles, antrum formation cavity after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the chi-squared test. Follicular diameter and dairy follicular growth rate were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances using PROC UNIVARIATE of SAS 9.0 procedure. The residues that did not show a normal distribution were logarithmically transformed ($\log_{10}(X + 1)$) for normal distribution adjustment. Since requirements underlying the analysis of variance were present, ANOVA was executed using PROC MIXED of SAS (2003). The model included the effects of treatment (EGF concentrations), time of culture (days 0, 6, 12 and 18) and their interactions.

Data from dairy follicular growth rate were analyzed in the same way, however using PROC GLM procedure. Since the presence of heterogeneity of variances, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used through PROC NPAR1WAY of SAS 9.0. Follicular diameter and dairy follicular growth rate were expressed as mean \pm standard error (SE), and differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Immunohistochemical localization of EGF in ovine ovarian follicles

Figure 1 and Table 1 show the expression pattern of immunohistochemical staining for EGF in ovine ovaries. Oocytes from primordial (Fig. 1A) and primary (Fig. 1B) follicles showed a weak reaction for EGF protein, while oocytes from secondary

follicles (Fig. 1C), early (Fig. 1D-E) and large (Fig. 1F) antral follicles showed a moderate reaction. A strong immunostaining for EGF was observed in granulosa cells of secondary follicles (Fig. 1C). Moreover, a moderate expression for EGF protein was observed in granulosa cells of primary follicles as well as in cumulus and mural granulosa cells from early and large antral follicles. No staining was observed in granulosa cells of primordial follicles, theca or stromal cells neither in negative controls (Fig. 1G).

Follicular morphology and development after in vitro culture

The preantral follicles showed centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membranes (Fig. 2A). After 6 days of culture, antral cavity in ovine ovarian follicles could be observed in all the treatments (Fig. 2B-D), as well as atretic (Fig. 2E) and extruded follicles (Fig. 2F).

The percentage of morphologically normal follicles significantly reduced in all the treatments after 6 days of culture, except in 50 ng/mL EGF group, which maintained the percentage of morphologically normal follicles from day 0 to 6 of culture (Fig. 3A). Considering the same culture period, treatment with 50 ng/mL EGF significantly increased the percentage of morphologically normal follicles at day 18 compared with the control group (α -MEM⁺). Moreover, some follicles in culture ruptured their basal cell membrane and the addition of 50 ng/mL EGF to the culture medium significantly reduced the precocious extrusion of oocytes compared with the control after 12 days of culture (Fig. 3B). In addition, after 18 days, the percentage of extruded oocytes was significantly lower at the concentration of 50 ng/mL EGF than 1 ng/mL EGF.

As shown in Figure 4A, from day 12 of culture onwards, treatment with 50 ng/mL EGF significantly increased the percentage of antral follicles compared with the control medium (α -MEM⁺) and 1 ng/mL EGF. All the treatments induced a progressive and

significant increase of the follicular diameter throughout the period of culture (Fig. 4B). However, there were no significant differences in follicular diameter or in the daily growth rate (13.61% for the control; 14.34% for 1 ng/mL EGF; 14.58% for 10 ng/mL EGF and 15.53% for 50 ng/mL EGF) among treatments.

Discussion

This study demonstrated for the first time a variable pattern of intensity and distribution of the EGF expression in ovine ovarian follicles using immunohistochemical analysis. In the present study, immunostaining for EGF was observed in ovine oocytes of follicles in all stages of development. Previous studies have localized mRNA for EGF in oocytes of primordial and primary follicles (REEKA et al. 1998; QU et al. 2000) and in all follicular types (MARUO et al. 1993) in human. In addition, in our study, EGF protein was localized in granulosa cells of all ovine follicles, except in primordial follicles. It is important to note that immunostaining was considered strong in granulosa cells of secondary follicles. Present results are in agreement with a previous study that showed expression for EGF mRNA in goat granulosa cells (CELESTINO et al. 2011). Due to the presence of EGF protein in all follicular compartments during preantral and antral follicle development, we believe that EGF may be important in the regulation of ovine folliculogenesis.

In our study, culture of follicles with 50 ng/mL EGF resulted in a greater percentage of normal follicles than did culture in the control medium (α -MEM⁺) after 18 days. Moreover, the percentage of extruded follicles was lower in the treatment 50 ng/mL EGF than α -MEM⁺ or 1 ng/mL EGF. Similar results were observed for caprine preantral follicles in which 50 ng/mL EGF maintained oocyte survival (ZHOU and ZHANG 2005) and follicular ultrastructure (SILVA et al. 2013) after 9 and 18 days of in vitro culture, respectively. Although we did not evaluate EGF immunostaining after in vitro

culture, our results demonstrated that there is a reduction in EGF production by the granulosa cells during the transition from secondary to antral follicle stage. Therefore, it is likely that the concentration of 1 ng/mL EGF is not sufficient and a higher concentration of EGF (50 ng/mL) may be necessary for maintaining antral follicle survival and reduce follicular extrusion after 18 days.

Addition of 50 ng/mL EGF to the culture medium was more efficient for antrum formation than control medium or 1 ng/mL EGF from day 12 onwards. Since that the mechanisms by which small cavities of fluid develop inside the follicle to form the antrum are related to the secretion of osmotically active molecules into small spaces between the granulosa cells (RODGERS and IRVING-RODGERS 2010), this ability may be considered as a marker of follicular functionality (ROSSETTO et al. 2012). It is possible that EGF activity may be stimulated by EGF-like growth factors amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG) and betacellulin (BTC), which are present in the follicular fluid (CONTI et al. 2006). With the increase of secondary follicle metabolism and further formation of the antral cavity in vitro, a reduction in the EGF expression in granulosa cells was observed. Thus, our results suggests that higher concentrations of EGF (50 ng/mL) may be necessary to support the development of antral follicles. Similar results were observed recently by Silva et al (2013) after 6 days of culture of isolated caprine secondary follicles.

Although 50 ng/mL has promoted a higher antrum formation, this concentration did not influence isolated follicle growth in sheep. Adversely to our results, recent studies have shown that EGF, alone or associated with FSH, increased the diameter (CELESTINO et al 2011) and the daily growth rate (SILVA et al. 2013) of caprine secondary follicles after 2 or 6 days of culture, respectively. These differences may be due to the differences between caprine and ovine species, as well as due to the supplement added to the media, such as FSH in the culture medium of caprine follicles. After antrum

formation, the follicle begins dependent on FSH (ERICKSON and SHIMASAKI 2001), suggesting that the use of FSH associated with EGF may be necessary to give a large support to antral follicle growth. Moreover, in the current study, the change of the medium and evaluation of the parameters were performed at each 6 days (MAGALHÃES et al. 2011), while in caprine studies, the change and analysis were done at each 2 days. Previous study suggested that EGF can efficiently activate the cascade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in granulosa cells (MAIZELS et al. 1998), constituting a mitogenic factor for these cells. It is likely that the use of increasing concentrations of EGF throughout the period of culture, associated or not with FSH, may contribute to increase follicular diameter during in vitro culture.

In conclusion, this study demonstrates that EGF protein is expressed in ovine ovarian follicles in different stages, suggesting its role in sheep folliculogenesis. Moreover, 50 ng/mL EGF maintains follicular survival and improves antrum formation of isolated ovine follicles cultured in vitro.

Acknowledgements

This work was supported by FACEPE (Process APQ-0705-5.05/10). L. P. Santos is a recipient of a grant from FACEPE (Brazil).

References

ANDRADE, E. R., SENEDA, M. M., ALFIERI, A. A., OLIVEIRA, J. A., BRACARENSE, A. P. F.R. L., FIGUEIREDO, J. R. , TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology** 64 1104–1113, 2005.

BENNETT, R.A., OSATHANONDH, R. & YEH, J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- α , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v, 8, p. 3073–3076, 1996.

CELESTINO J.J., BRUNO J.B., SARAIVA M.V., ROCHA R.M., BRITO I.R., DUARTE A.B., ARAÚJO V.R., SILVA C.M., MATOS M.H.T, CAMPELLO C.C., SILVA J.R., FIGUEIREDO J.R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res.** v.344, p. 539-50, 2011.

CELESTINO, J.J.H., BRUNO, J.B., LIMA-VERDE, I.B., MATOS, M.H.T., SARAIVA, M.V.A., CHAVES, R.N., MARTINS, F.S., LIMA, L.F., NAME, K.P.O., CAMPELLO, C.C., SILVA, J.R.V., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured in vitro. **Reprod. Sci.** 16, 239-246, 2009.

CHAVES, R.N., MARTINS, F.S., SARAIVA, M.V.A., CELESTINO, J.J.H., LOPES, C.A.P., CORREIA, J.C., LIMA-VERDE, I.B., MATOS, M.H.T., BÁO, 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. Dev.** 20, 640-647, 2008.

CONTI, M., HSIEH. M., PARK. J.Y. & SU Y.Q.. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molec Endocrinol.** V. 20: p715-723, 2006.

ERICKSON, G. F. and SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility** v. 76, n. 5, 2001.

GALL, L.; CHENE, N.; DAHIREL, M.; RUFFINI, S.; BOULESTEIX, C. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. **Molec Reprod and Develop** v. 67, p. 439-445, 2004.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 1322-1328, 2000.

KAJARAJAN, K.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D.; NAIK, B.R.; RAO, V.H. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. **Small Rum Res.** 63, (1) 204-212, 2005.

LAFKY, J., M.; WILKEN, J. A.; BARON, A. I.; MAILILE, N. J., 2008: Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor EGF receptor family and its ligands in ovarian cancer. **Bioch et Bioph Act** 1785(2): 232-265.

DM MAGALHÃES, DD FERNANDES, MBS MORORÓ , CMG SILVA, GQ RODRIGUES, JB BRUNO, MHT MATOS, CC CAMPELLO AND JR FIGUEIREDO. Effect of the Medium Replacement Interval on the Viability, Growth and In Vitro. Maturation of Isolated Caprine and Ovine Pre-Antral Follicles. **Reprod Dom Anim** 46, 134–140 (2011).

MAIZELS E.T., COTTOM J., JONES J.C., HUNZICKER-DUNN M. Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. **Endocrinology** 139:3353–3356, 1998.

MARUO, T., LADINES-LLAVE, C.A., SAMOTO, T., MATSUO, H., MANALO, A.S., ITO, H. & MOCHIZUKI, M. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. **Endocrin.** 132:924-931,1993.

QU J, GODIN PA, NISOLLE M, DONNEZ J. Distribution of epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. **Hum Reprod.**;15:302-310, 2000.

REEKA N, BERG FD, BRUCER C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. **Hum Reprod**, v.13, p.2199-2205, 1998.

RIESE, D.J. II & STERN, D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. **Bioessays**, v. 2, p. 41–48, 1998.

RODGERS, R. J., and IRVING-RODGERS, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biol. Reprod.** **82**, 1021–1029.

ROY, S.K. & GREENWALD, G.S. Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. **Endocrinology**, v. 126, p. 1309–1317, 1990.

ROSSETTO R, SARAIVA MV, DOS SANTOS RR, DA SILVA CM, FAUSTINO LR, CHAVES RN, BRITO IR, RODRIGUES GQ, LIMA IM, DONATO MA, PEIXOTO CA, DE FIGUEIREDO JR. Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**. 2013 May;21(2):125-8.

SAHA, S., SHIMIZU, M., GESHI, M., IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 27-39, 2000.

SAS (Statistical Analysis System) Institute, 2003: SAS/STAT: guide for personal computer; version 9.1. Cary. p. 235.

SILVA, C.M.G., CASTRO, S.V. , FAUSTINO, L.R. , RODRIGUE,G.Q. S, BRITO, I.R. , ROSSETTO, R. , SARAIVA, M.V.A. , CAMPELLO, C.C. , LOBO, C.H. , SOUZA, C.E.A. , MOURA, A.A.A. , DONATO, M.A.M. , PEIXOTO, C.A. , FIGUEIREDO, J.R. . The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Res in Vet Sci**; V 94, 3, P 453–461, 2013.

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

SINGH, B., RUTLEDGE, J.M. & ARMSTRONG, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localisation in porcine ovarian follicles. **Mol.Reprod. Dev.**, v. 40, p. 391–399, 1995.

STIRNWEISS, J., VOLKOVA, C., ZIESCHE, E., DRUBE, S. e LIEBMANN, C. Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF receptor through Fyn Kinase e without matrix metalloproteases. **Cellular signaling**. 18, p 1338-1349, 2006.

UHM S.J., GUPTA M.K., YANG J.H., CHUNG.H -J., MIN T.S., LEE H.T. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. **Theriogenology**. v. 73(8):1024-36, 2010.

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.

WANDJI SA, EPPIG JJ, FORTUNE JE. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.817- 832, 1996

WANG, Y., LI, J., WANG, C.Y., KWOK, A.H.Y., LEUNG, F.C. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary. I. Evidence for heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) as a potential oocyte-derived signal to control granulosa cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. **Endocrinol** v.148:p 3426–3440, 2007.

XIAN C. J. and ZHOU, X-F. EGF family of growth factors: essential roles and redundancy in the nerve system. **Frontiers in Bioscience**. 18, p 85-92, 2004.

ZHOU H, ZHANG Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.90, p.265-272, 2005.

Figure captions

Figure 1. Immunolocalization of EGF protein in ovine ovarian follicles. Primordial (A), primary (B), secondary (C), early antral (D and E), large antral follicle (F) and negative control (G). O: Oocyte; GC: granulosa cell; CC: cumulus cell; Arrow: theca cell; Open arrow: mural granulosa cell.

Figure 2. Secondary follicle at day 0 (A), antral follicles after 6 (B), 12 (C) and 18 (D) days of culture with 50 ng/mL EGF; atretic (E) and extruded (F) follicles cultured in α MEM⁺. O: oocyte; GC: granulosa cell; Arrow: antral cavity.

Figure 3. Percentage of normal (A) and extruded follicles (B) in the control and different treatments using EGF during 18 days of culture.

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

Figure 4. Percentage of antrum formation (A) and follicular diameter (B) in the control and different treatments using EGF during 18 days of culture.

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

Table 1. Relative intensity of immunohistochemical staining for EGF in the ovaries of sheep

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

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

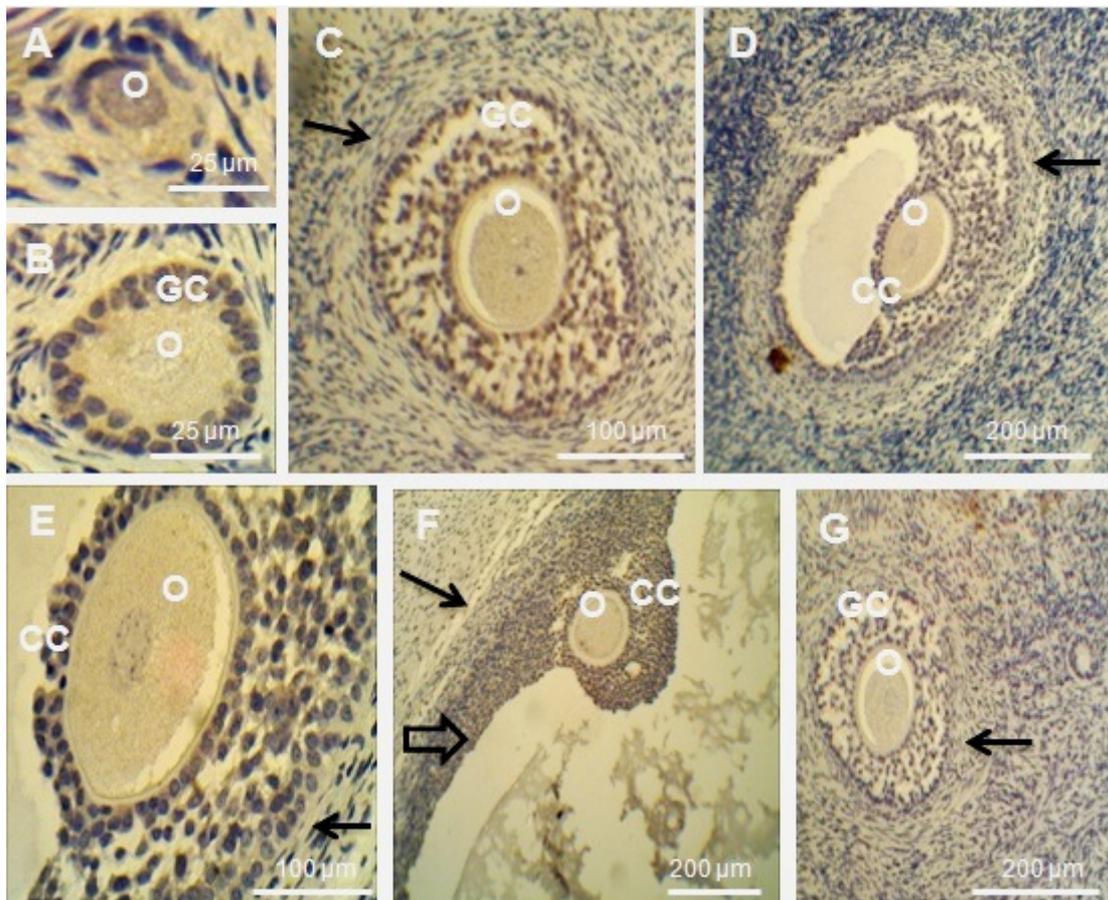


Figura 1.

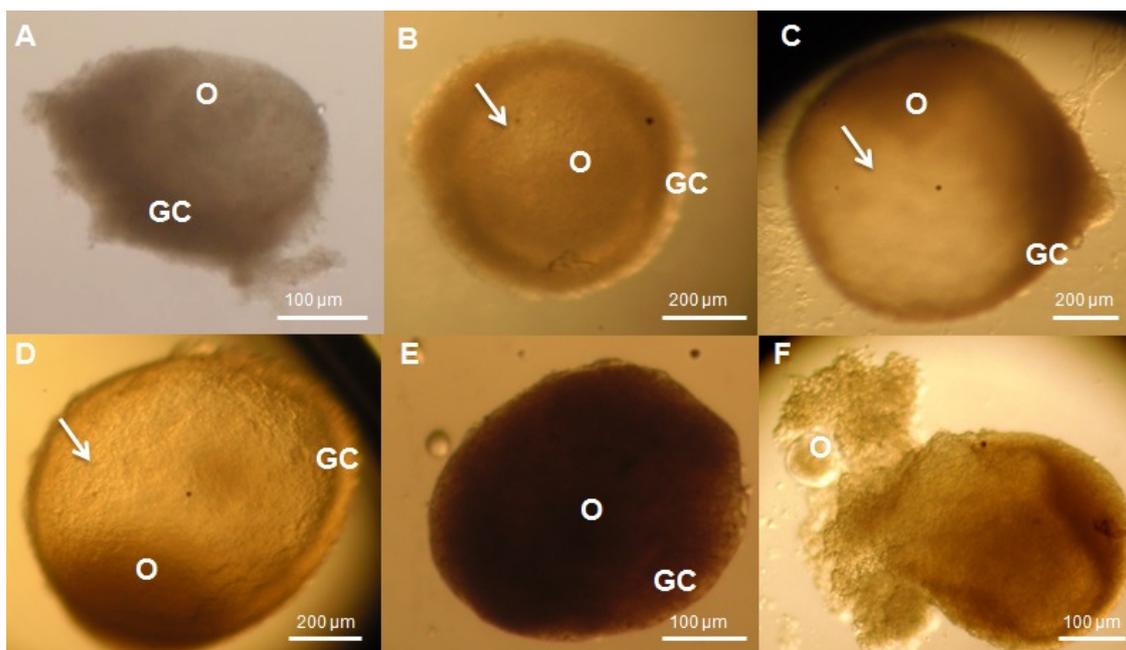


Figura 2.

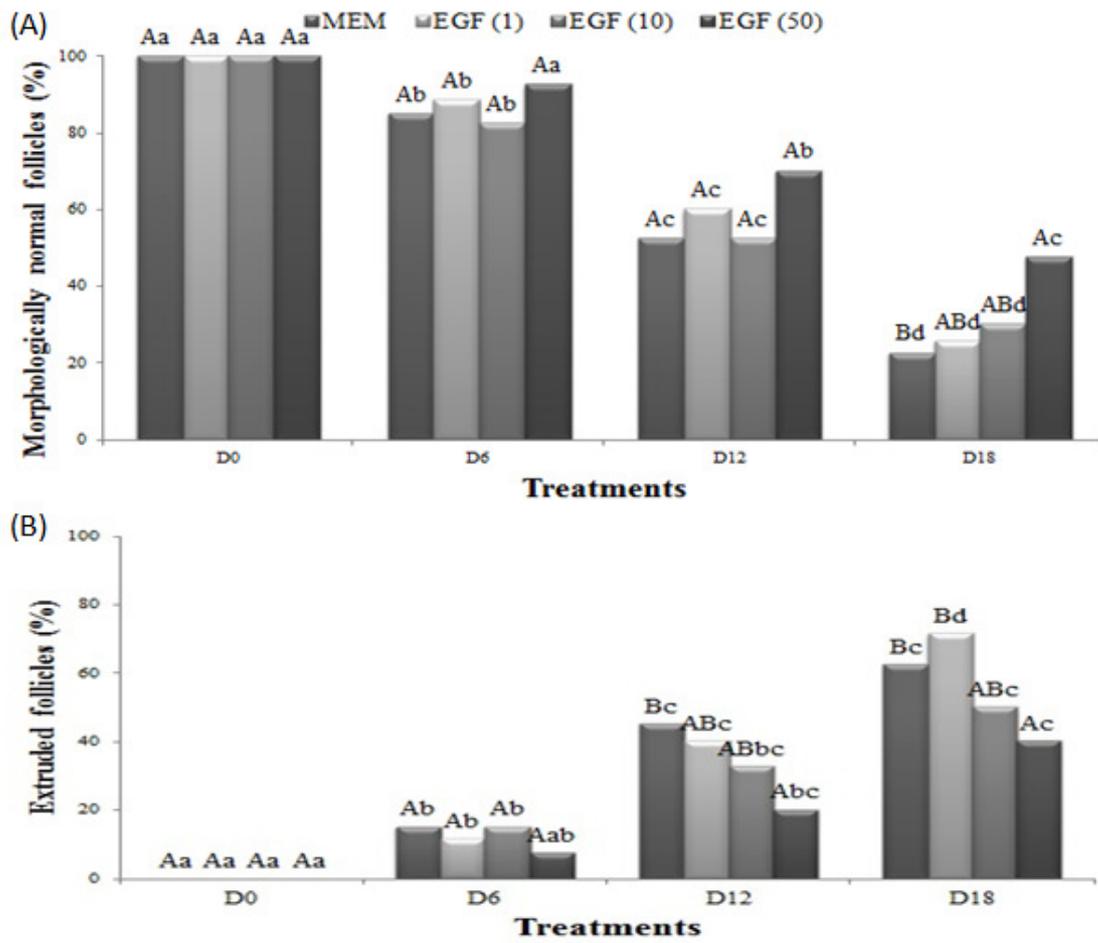


Figure 3.

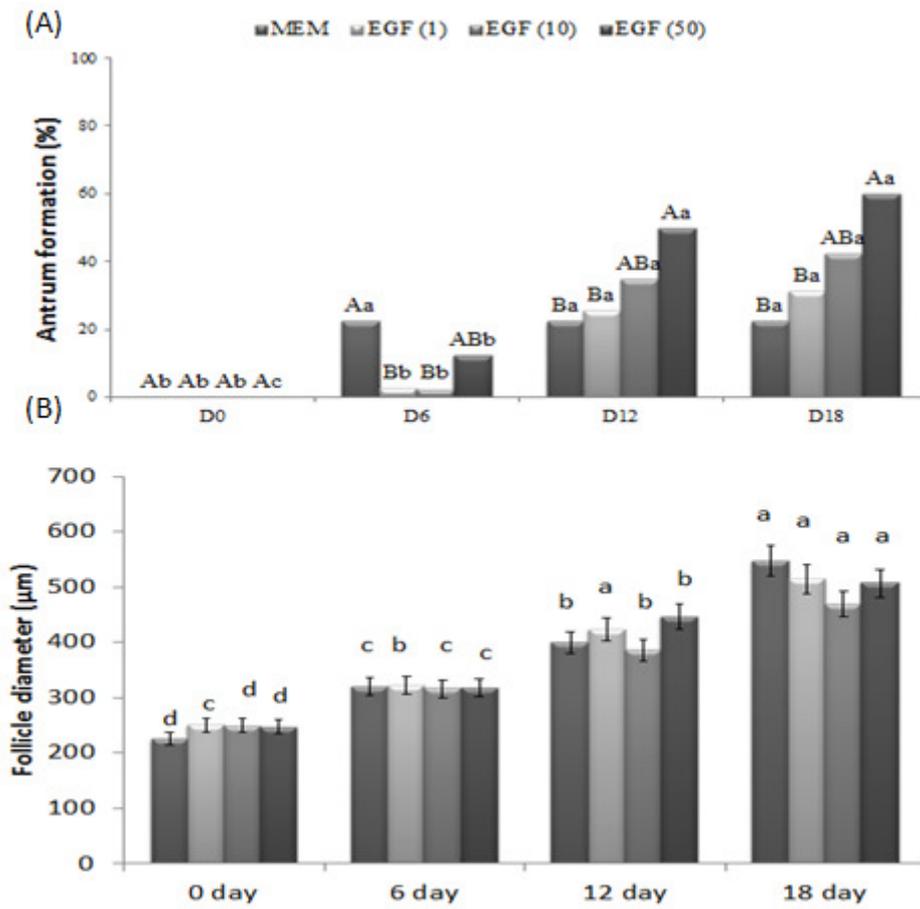


Figura 4.

6. Capítulo 2

Efeito do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) sobre a morfologia e a ativação de folículos pré-antrais ovinos cultivados *in situ*

L. P. Santos^A, J. M. S. Santos^A, V. G. Menezes^A, R. S. Barberino^A, A.Y.P. Cavalcante^A,
T.L. B. Lins^A, B. B. Gouveia^A, R. J. S. Gonçalves^A, M. H. T. Matos^{AB}

^ANúcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos,
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brazil

^BAutor para correspondência: Email: helena.matos@univasf.edu.br

*Endereço para correspondência:

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

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) sobre a morfologia e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos cultivados em fragmentos de córtex ovariano. Após a coleta de ovários (n=12) ovinos em abatedouro, o córtex foi fragmentado, sendo um fragmento destinado à histologia (controle fresco) e os demais foram cultivados *in vitro* por 7 dias, a 39°C e 5% CO₂. O meio de cultivo de base foi o α -Meio Essencial Mínimo suplementado com hipoxantina, glutamina, ácido ascórbico, BSA e ITS (insulina, transferrina e selênio) (α -MEM⁺). Para testar o efeito do fator de crescimento, os folículos foram cultivados na ausência (meio controle) ou presença de EGF (1, 10, 50, 100 ou 200 ng/mL). Após o cultivo, foi realizada a análise morfológica dos folículos pré-antrais, que foram classificados como normais ou atrésicos. As porcentagens de folículos normais, primordiais e em desenvolvimento foram comparadas por ANOVA e teste de Tukey (P<0,05). Os resultados mostraram que após 7 dias, todos os tratamentos reduziram significativamente a taxa de sobrevivência folicular quando comparado ao controle fresco. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação a esse parâmetro. Comparando-se com o controle fresco, após 7 dias de cultivo, observou-se uma redução significativa dos folículos primordiais e um aumento de folículos em desenvolvimento no α -MEM⁺ e em todos os tratamentos com EGF. Além disso, os tratamentos α -MEM⁺ e 1 ng/mL de EGF promoveram um aumento significativo na ativação folicular, comparado aos demais tratamentos. Não houve nenhuma influência do α -MEM⁺ e do EGF no aumento do diâmetro folicular e oocitário. Em conclusão, o meio de cultivo α -MEM⁺, sozinho ou adicionado de 1 ng/mL de EGF, promove a ativação de folículos primordiais ovinos *in vitro*.

Palavras-chave: Ovelha. Ovário. Oócito. Sobrevivência. Crescimento.

Introdução

O ovário mamífero é constituído por um grande número de folículos pré-antrais que representam o pool de reserva de células germinativas e que se encontram, na sua maioria, no estágio de folículo primordial. No entanto, durante a vida reprodutiva da fêmea, poucos folículos primordiais, após iniciarem seu crescimento *in vivo*, desenvolvem-se até o estágio de folículo pré ovulatório, pois cerca de 99,9% não ovulam, morrendo por atresia (FIGUEIREDO et al., 2008). Os mecanismos responsáveis pelo início do crescimento de folículos primordiais, também conhecido como ativação, bem como aqueles responsáveis pela atresia folicular, envolvem fatores de origem endócrina, parácrina e autócrina (THOMAS et al., 2008). No entanto, o conhecimento acerca de como esses mecanismos e fatores atuam nesses eventos ainda é incipiente. Dentre os fatores que parecem exercer importantes funções na foliculogênese, destaca-se o Fator de Crescimento Epidermal (EGF).

A expressão para a proteína do EGF já foi observada no oócito e em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais (humano: BENNETT et al., 1996, hamster: ROY & GREENWALD, 1990; suíno: SINGH et al., 1995). Em caprinos, através de técnicas de imunohistoquímica e PCR-RT, o EGF e seu receptor foram demonstrados em folículos ovarianos em todos os estádios de desenvolvimento, no corpo lúteo e na superfície do epitélio ovariano (SILVA et al., 2006).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o EGF promove a proliferação de células da granulosa de folículos primários e secundários (MORBECK et al., 1993) e reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais suínos isolados (MAO et al., 2004), além de manter a viabilidade e estimular a ativação de folículos primordiais após cultivo de tecido ovariano caprino (CELESTINO et al., 2009). Após a utilização de EGF em uma

concentração fixa (100 ng/mL) e em associação com o FSH no cultivo de tecido ovariano ovino, Andrade et al. (2005) observaram um aumento da ativação de folículos primordiais. Entretanto, ainda não foi testado o efeito de diferentes concentrações de EGF, sem adição de FSH ao meio, sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano ovino. Ressalta-se que estudos com ovinos são importantes, pois são animais altamente atrativos, do ponto de vista comercial, pois representam uma importante fonte de carne e pele, especialmente na região Semiárida do Nordeste brasileiro. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do EGF sobre a morfologia e a ativação dos folículos pré-antrais ovinos cultivados *in vitro* em fragmentos de tecido ovariano.

Material e métodos

Origem do tecido ovariano

Ovários (n=10) de cinco ovelhas adultas (1-3 anos de idade), sem padrão racial definido, foram coletados em abatedouro local. Imediatamente após o abate, os pares ovarianos foram lavados uma vez em álcool 70% e duas vezes em Meio Essencial Mínimo tamponado com HEPES (MEM-HEPES) e suplementado com antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 4^oC (CHAVES et al., 2008). Todos os reagentes e suplementos utilizados nesse estudo, e não citados no decorrer do texto, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Cultivo in vitro de folículos pré-antrais

No laboratório, o córtex ovariano foi fragmentado e, de cada par ovariano, foram retirados oito fragmentos de 3 mm x 3 mm (1 mm de espessura) de diâmetro, utilizando lâminas de bisturi sob condições estéreis. De cada animal, 1 fragmento de tecido ovariano foi selecionado aleatoriamente e imediatamente fixado para histologia

(controle fresco). Os demais fragmentos do córtex ovariano, foram cultivados individualmente em 1 mL de meio de cultivo, em placas de 24 poços, por 7 dias a 39 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar. O meio de cultivo de base (controle) consistia de α -MEM (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha, pH 7,2-7,4) suplementado com ITS (insulina 10 μ g/mL, transferrina 5,5 μ g/mL e selênio 5,0 ng/mL), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 50 μ g/mL de ácido ascórbico, sendo então denominado α -MEM⁺. Para as condições experimentais, o meio controle foi suplementado com EGF em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100 ou 200 ng/mL). Cada tratamento foi repetido seis vezes, usando ovários de seis animais diferentes. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias.

Análise morfológica e taxa de crescimento folicular in vitro

Os tecidos ovarianos de todos os tratamentos (controle fresco, meio controle e tratamentos com EGF) foram fixados em paraformaldeído tamponado 4% (Dinâmica, São Paulo, Brasil) por 18 horas e desidratados em concentrações crescentes de álcool (Dinâmica, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram incluídos em blocos de parafina (Dinâmica, São Paulo, Brasil). Os fragmentos de tecido ovino foram cortados, com o auxílio de um micrótomo, em secções de 5 μ m e todas as secções foram montadas em lâminas de vidro e coradas com Ácido Periódico de Schiff e Hematoxilina (PAS-Hematoxilina). Os estágios foliculares e a sobrevivência foram analisados microscopicamente em secções seriadas. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Nikon, Japan) em um aumento de 400X.

Os estágios de desenvolvimento dos folículos pré-antrais foram definidos como descrito anteriormente (SILVA et al., 2004): primordial (um oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosa) ou em desenvolvimento (transição: um

oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas; primário: um oócito circundado por uma camada de célula da granulosa cúbicas; e secundário: duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas). Estes folículos foram classificados individualmente como morfológicamente normais quando apresentavam oócito intacto, rodeado por uma ou mais camadas de células da granulosa organizadas e ausência de núcleo picnótico. Os folículos foram definidos como atresícos quando havia presença de retração no citoplasma do oócito, núcleo picnótico e/ou células da granulosa desorganizadas e destacadas da membrana basal. Um total de 180 folículos foram avaliados em cada tratamento (30 folículos por tratamento/réplica x 6 repetições = 180 folículos), totalizando 1.080 folículos pré-antrais.

Para avaliar a ativação folicular (transição dos folículos primordiais para folículos em desenvolvimento, evidenciado pela presença de células da granulosa com morfologia cúbica e em proliferação), apenas folículos morfológicamente normais com núcleo do oócito visível foram analisados, e a proporção de folículos primordiais e folículos em desenvolvimento foi calculada no dia 0 (controle fresco) e após 7 dias de cultivo. Adicionalmente, duas mensurações, do eixo maior e menor, foram mensuradas em cada oócito e folículo utilizando o programa Image-Pro Plus®. Os valores dessas duas mensurações foram utilizados para determinar o diâmetro oocitário e folicular.

Análise Estatística

O percentual de folículos normais, primordiais e em desenvolvimento foram submetidos à ANOVA e o teste de Tukey foi aplicado para comparação entre os tratamentos. Os resultados de sobrevivência e desenvolvimento foram expressos como média \pm SD e os resultados de ativação folicular foram expressos como média \pm SEM. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

Morfologia folicular e desenvolvimento após cultivo in vitro

A figura 1 mostra folículos pré-antrais morfologicamente normais no controle fresco (Fig. 1A) e após 7 dias de cultivo em α -MEM⁺ (Fig. 1B) e meio contendo 1 ng/mL de EGF (Fig. 1C), apresentando oócito centralmente localizado e rodeado por células da granulosa organizadas. Após cultivo com o EGF em altas concentrações (100 ou 200 ng/mL), observou-se um predomínio de folículos atrésicos, apresentando oócito com retração citoplasmática e núcleo picnótico e ainda células da granulosa desorganizadas (Fig. 1D e 1E).

A figura 2 mostra que após 7 dias de cultivo, todos os tratamentos reduziram significativamente a taxa de sobrevivência folicular quando comparado ao controle fresco. Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos (MEM e as diferentes concentrações de EGF) com relação a esse parâmetro.

Comparando-se com o controle fresco, após 7 dias de cultivo, observou-se uma redução significativa dos folículos primordiais (Fig. 3A) e um aumento concomitante de folículos em desenvolvimento (Fig. 3B) no α -MEM⁺ e em todos os tratamentos com EGF. Além disso, os tratamentos α -MEM⁺ e 1 ng/mL de EGF promoveram um aumento significativo na ativação folicular, comparado aos demais tratamentos, sendo que a menor porcentagem de ativação ($P < 0,05$) foi observada no tratamento com 200 ng/mL de EGF. De acordo com a tabela 1, observou-se que não houve nenhuma influência do α -MEM⁺ e do EGF no aumento do diâmetro folicular e oocitário após cultivo *in vitro*.

Discussão

O presente estudo avaliou a influência de diferentes concentrações de EGF sobre a morfologia e a ativação de folículos ovarianos ovinos cultivados *in situ*. Observamos uma redução significativa na porcentagem de folículos morfologicamente normais após 7 dias de cultivo em todos os tratamentos, quando comparado ao controle fresco. No entanto, não houve diferença na sobrevivência folicular entre as diferentes concentrações de EGF e o meio controle (α -MEM⁺). Contrariamente, após cultivo *in situ* por 7 dias, Celestino et al. (2009) observaram que o EGF em baixas concentrações (1 ou 10 ng/mL) foi capaz de manter a morfologia e a ultraestrutura de folículos pré-antrais caprinos quando comparado ao meio controle (MEM⁺) e ao meio com altas concentrações de EGF (100 e 200 ng/mL). No nosso estudo, a ausência de diferença entre os tratamentos pode estar relacionada com o meio de cultivo que utilizamos como meio de base. O α -MEM⁺, utilizado em nosso experimento, é um meio mais rico em nutrientes, contendo em sua composição, aminoácidos não essenciais, carboidratos, piruvato de sódio, ácido lipóico, biotina, vitaminas e precursores de DNA capazes de promover a divisão celular (HARTSHORNE, 1997), quando comparado ao meio MEM⁺ que foi utilizado pela equipe de Celestino et al. (2009). Desta forma, conforme mostrado no presente estudo, o α -MEM⁺ teria uma necessidade de suplementação com quantidades inferiores de EGF do que o MEM⁺ utilizado no estudo com caprinos.

No presente estudo, apesar de não ter havido diferença entre eles, o α -MEM⁺ e o EGF, na concentração de 1 ng/mL, resultaram em maiores taxas de ativação de folículos primordiais, quando comparado ao controle fresco e às demais concentrações de EGF. O EGF é conhecido por atuar em eventos biológicos relacionados à fisiologia ovariana em mamíferos, como a proliferação das células da granulosa, a esteroidogênese e a maturação do oócito (VAN DEN HURK et al., 2000; MARKSTROM et al., 2002). Resultados semelhantes ao nosso, foram obtidos por Celestino et al. (2009) que mostraram que baixas concentrações (1 e 10 ng/mL) de EGF promovem a ativação

folicular em caprinos após 7 dias de cultivo *in vitro*, comparado ao cultivo com altas concentrações do EGF (100 e 200 ng/mL). Após cultivo de tecido ovariano ovino, ANDRADE et al. (2005) demonstraram que o EGF, na concentração de 100 ng/mL, é capaz de promover ativação de folículos primordiais, porém somente quando está associado ao FSH ou ao Ácido Indol Acético (IAA). Além disso, resultados recentes obtidos por nossa equipe mostraram que a expressão da proteína para o EGF em ovários ovinos ocorre de forma diferente, dependendo da categoria folicular, observando a marcação forte para o EGF apenas em células da granulosa de folículos secundários (SANTOS et al., resultados não publicados). Estes resultados sugerem que dependendo do estágio folicular, a necessidade de suplementação com o EGF exógeno segue uma curva dose-resposta. Além disso, o presente estudo foi realizado com cultivo de tecido ovariano (*in situ*), em que existem muitas células envolvidas e folículos pré-antrais em diferentes estádios de desenvolvimento. É possível que as células do estroma e as células foliculares estejam agindo indiretamente, produzindo substâncias que auxiliam no início do crescimento folicular, inclusive o próprio EGF e, desta forma, no cultivo *in situ*, os folículos primordiais podem necessitar de menor quantidade de EGF para sua ativação.

Em nosso estudo, não houve influência do EGF nos diâmetros oocitário e folicular após cultivo *in vitro*, o que está de acordo com os resultados observados após cultivo de tecido ovariano caprino com EGF nas mesmas concentrações do nosso estudo (CELESTINO et al, 2009). No entanto, ainda na espécie caprina, SILVA et al (2004) mostraram que o EGF, na concentração de 100 ng/mL associado ao FSH, promoveu aumento no diâmetro de folículos de transição e primários após 5 dias de cultivo. Além disso, recentes estudos mostraram que o EGF sozinho ou combinado com FSH, promoveu um aumento significativo do diâmetro folicular a partir de dois dias de

cultivo (CELESTINO et al, 2011) e aumentou a taxa de crescimento diário de folículos secundários caprinos isolados, cultivados por 18 dias (SILVA et al., 2013).

Conclui-se que o meio de cultivo α -MEM⁺ sozinho, ou adicionado de 1 ng/mL de EGF, promove a ativação de folículos primordiais ovinos *in vitro*. Mais estudos são necessários utilizando o EGF, para uma melhor compreensão acerca dos efeitos desse fator de crescimento e sua importância para a foliculogênese inicial.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela FACEPE (Process APQ-0705-5.05/10). L.P. Santos recebe uma bolsa de Mestrado da FACEPE (Brasil).

Referências bibliográficas

ANDRADE ER, MARCONDES SENEDA M, ALFIERI AA, et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles.

Theriogenology. 2005;64:1104-1113.

BENNETT, R.A., OSATHANONDH, R. & YEH, J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v, 8, p. 3073–3076, 1996.

BOLAMBA D, FLOYD AA, MCGLONE JJ, LEE VH. Epidermal growth factor enhances expression of connexin 43 protein in cultured porcine preantral follicles. **Biol Reprod**. 67:154-160, 2002.

CELESTINO J.J., BRUNO J.B., SARAIVA M.V., ROCHA R.M., BRITO I.R., DUARTE A.B., ARAÚJO V.R., SILVA C.M., MATOS M.H.T, CAMPELLO C.C., SILVA J.R., FIGUEIREDO J.R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res.** v.344, p. 539-50, 2011.

CELESTINO JJH, BRUNO JB, LIMA-VERDE IB, MATOS MHT, SARAIVA MVA, CHAVES RN, MARTINS FS, LIMA LF, NAME KPO, CAMPELLO CC, SILVA JRV, BÁO SN, FIGUEIREDO JR. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured in vitro. **Reprod Sci** 16:239–246, 2009.

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.

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

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

FORTUNE JE. 2003. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci** 78:135–163.

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.

GALL L., CHENE N., DAHIREL, M., RUFFINI, S. & BOULESTEIX C. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. **Mol. Reprod. Dev.** 67:439-445, 2004.

GUGLIELMO, M. C.; RICCI, G.; CATIZONE, A.; BARBERI, M.; GALDIERI, M.; STEFANINI, M.; CANIPARI, R. The effect of hepatocyte growth factor on the initial stages of mouse follicle development. **Jour of Cel Physio**, 2010, [no prelo].

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

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

JAMNONGJIT M., GILL A. & HAMMES S.R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 102:16257-16262, 2005.

KENNEDY KL, FLOYD AA, CLARKSON AM, LEE VH. Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral follicles rabbit follicles. **Mol Reprod Dev.** 2003;64:61-69.

MAO J, SMITH MF, RUCKER EB, et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. **J Anim Sci.** 2004;82:1967-1975.

MARKSTROM E, SVENSSON ECH, SHAO R, SVANBERG B, BILLIG H. Survival factors regulating ovarian apoptosis—dependence on follicle differentiation. **Reproduction.**;123:23, 2002.

MERLO B., IACONO E., ZAMBELLI D., PRATI F. & BELLUZZI S. Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. **Theriogenology.** 63:2032-2039, 2005.

MILENKOVIC, M, WALLIN, A., GHAREMANI, M. AND BRÄNNSTRÖM, M. Whole sheep ovary cryopreservation: evaluation of a slow freezing protocol with dimethylsulphoxide. **J. Assist. Reprod. Genet.** 28 , 7–14, 2011.

MIYOSHI T, OTSUKA F, YAMASHITA M, INAGAKI K, NAKAMURA E, TSUKAMOTO N, TAKEDA M, SUZUKI J, MAKINO H Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol** 325:84–92, 2010.

MORBECK DE, FLOWERS WL, BRITT JH. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and EGF in vitro. **J Reprod Fertil.**;99:577-584,1993.

ROSSI G., MACCHIARELLI G., PALMERINI M.G., CANIPARI R. & CECCONI S. Meiotic spindle configuration is differentially influenced by FSH and epidermal growth factor during in vitro maturation of mouse oocytes. **Hum. Reprod.** 21:1765-1770, 2006.

ROY, S.K. & GREENWALD, G.S. Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. **Endocrinology**, v. 126, p. 1309–1317, 1990.

SILVA, C.M.G., CASTRO, S.V. , FAUSTINO, L.R. , RODRIGUES, G.Q. S, BRITO, I.R. , ROSSETTO, R. , SARAIVA, M.V.A. , CAMPELLO, C.C. , LOBO, C.H. , SOUZA, C.E.A. , MOURA, A.A.A. , DONATO, M.A.M. , PEIXOTO, C.A. , FIGUEIREDO, J.R. . The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Res in Vet Sci**; V 94, 3, P 453–461, 2013.

SILVA JRV, VAN DEN HURK R, MATOS MHT, SANTOS RR, PESSOA C, MORAES MO, FIGUEIREDO JR. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology** 61:1691–1704, 2005.

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. 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, 2004.

SOFI, K.A.; KHAN, M.Z.; ISLAM,R.; LONE, F.A. Effect of cysteamine and epidermal factor growth (EGF) supplementation on the in vitro maturation rate of ovine oocytes. **Small Ruminant Research**, 96. 191-194, 2011.

SINGH, B., RUTLEDGE, J.M. & ARMSTRONG, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localisation in porcine ovarian follicles. **Mol.Reprod. Dev.**, v. 40, p. 391–399, 1995.

SINGH, B., KENNEDY, T.G., TEKPETEY, F.R. & ARMSTRONG, D.T. Gene expression and peptide localisation for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. **Mol. Cell. Endocrinology**, v. 113, p. 137–143, 1995.

THOMAS, F.H., WILSON, H., SILVESTRI, A. AND FRASER, H.H. Thrombospondin-1 Expression Is Increased during Follicular Atresia in the Primate Ovary. **Endocrinology** 149, 185–192, 2008.

TOYODA T, NAKAMURA K, YAMADA K, et al. SNP analyses of growth factor genes EGF, TGF- β 1, and HGF reveal haplotypic association of EGF with autism. **Biochem Bioph Res Commun**;360:715-720, 2007.

VAN DEN HURK R, ABIR R, TELFER EE, BEVERS MM. Preantral and antral follicles as possible source for fertilizable oocytes in human and bovine. **Hum Reprod Update**.;2: 457- 474, 2000.

WANI, A.R.; KHAN, M.Z.; SOFI, K.A.; LONE, F.A.; MALIK, A.A.; BHAT, F.A. Effect of cysteamine and epidermal factor growth (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. **Small Rum Res**, 96. 160-164, 2012.

ZHOU H, ZHANG Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.90, p.265-272, 2005

Legendas de figuras

Figura 1. Folículos morfologicamente normais no controle (A), Folículo atrésico após 7 dias de cultivo em EGF 200 ng/mL (B) e nos tratamentos α -MEM⁺ (C) e 1 ng/mL de EGF (D). Seta: oócito; GC: Células da granulosa; Nu: núcleo do oócito. Barra de escala: 25 μ m

Figura 2: Percentual de folículos pré-antrais ovinos morfologicamente normais no controle fresco ou após cultivo *in vitro* em MEM⁺ e diferentes concentrações de EGF por 7 dias.

(*) difere significativamente do controle fresco. (A-C) difere entre tratamentos no mesmo período de cultivo (P<0,05).

Figura 3: Percentual de folículos pré-antrais ovinos primordiais (A) e em desenvolvimento (B) no controle fresco ou após cultivo *in vitro* em MEM⁺ e diferentes concentrações de EGF por 7 dias.

(*) difere significativamente do controle fresco. (A-C) difere entre tratamentos no mesmo período de cultivo (P<0,05).

Table 1. Mean oocyte and follicular diameter (mean \pm SD) in the fresh control and after in vitro culture of ovine preantral follicle in control medium or different concentrations of EGF.

Treatments	Follicular diameter* (μm)	Oocyte diameter* (μm)
Fresh	55.64 \pm 19.28	39.25 \pm 11.34
α -MEM+	48.71 \pm 10.02	32.81 \pm 8.08
EGF 1	51.15 \pm 11.07	35.15 \pm 7.52
EGF 10	46.45 \pm 5.70	33.43 \pm 4.77
EGF 50	49.24 \pm 14.38	32.72 \pm 7.58
EGF 100	51.55 \pm 8.89	38.24 \pm 7.1
EGF 200	55.64 \pm 19.28	39.25 \pm 11.34

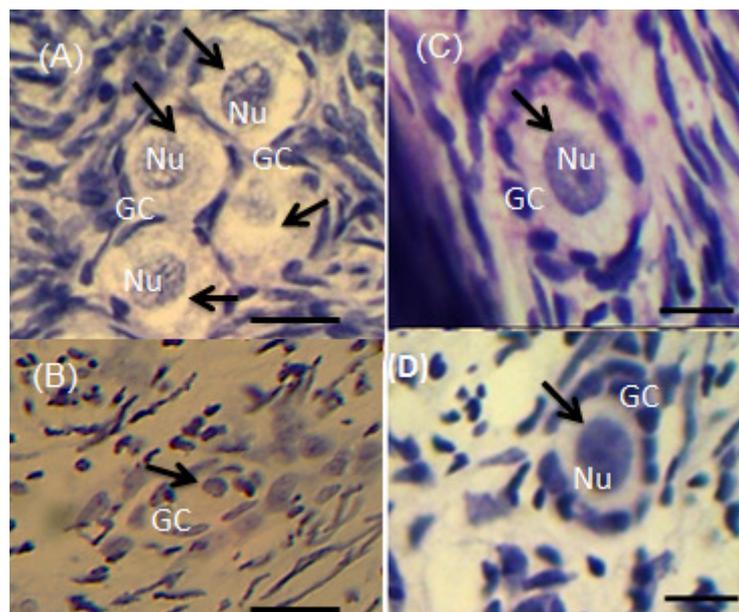


Figura 1.

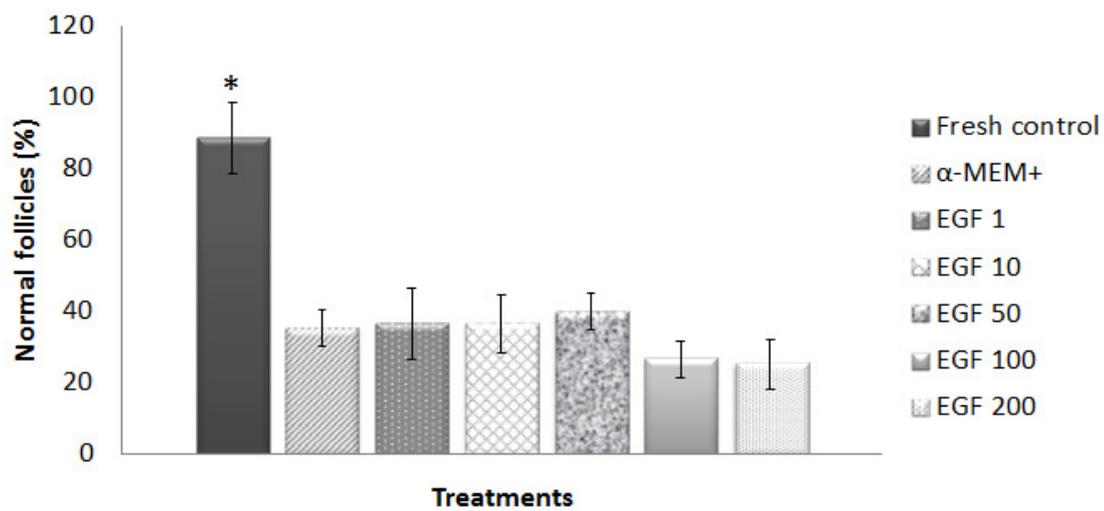


Figura 2.

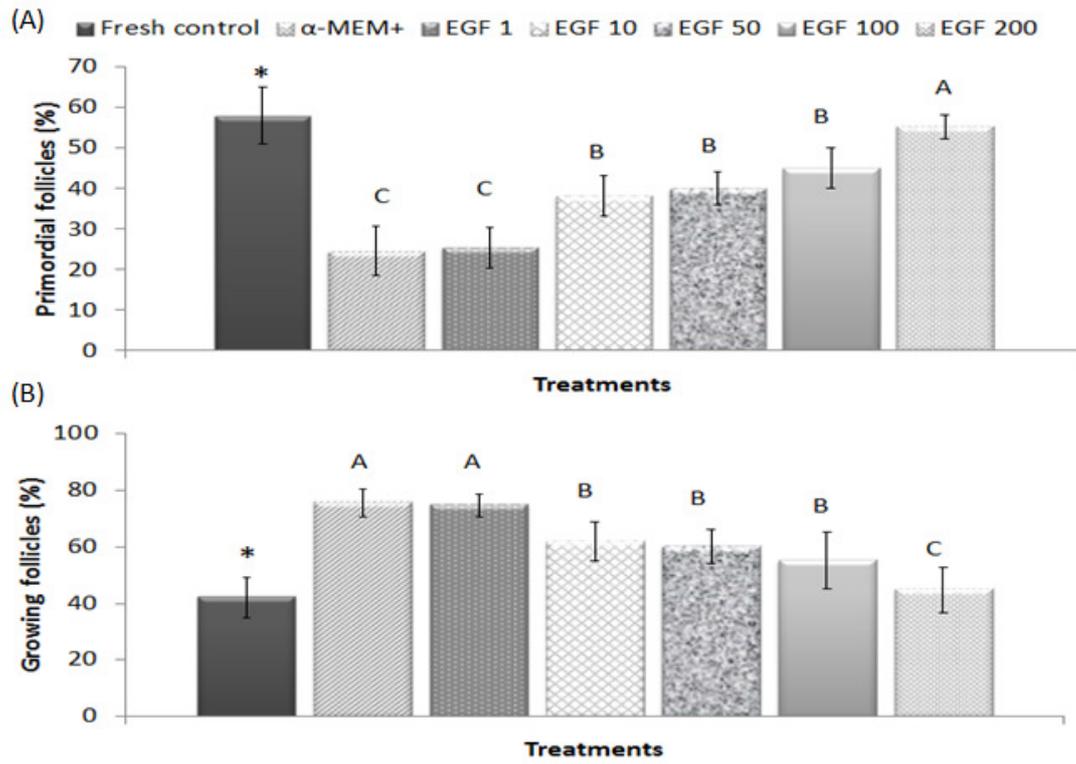


Figura 3.

7. Considerações finais

Este trabalho demonstrou a presença da proteína para o EGF em ovários ovinos, bem como demonstrou, que este fator de crescimento pode exercer influência na ativação de folículos cultivados *in situ* e na sobrevivência e formação de antro de folículos secundários, ovinos, cultivados *in vitro*. No entanto, mais estudos são necessários, para uma melhor compreensão acerca dos efeitos desse fator de crescimento na foliculogênese dos animais da espécie ovina.

8. Referências

- ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BENRAFAEL, Z. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. **Human Reprod.** v. 7, p. 603-610, 2002.
- AGUIRRE S. A., PONS P., SETTEMBRINI B. P., ARROYO D., CANAVOSO L. E Cell death mechanisms during follicular atresia in *Dipetalogaster maxima*, a vector of Chagas' disease (Hemiptera: Reduviidae). **Jourl of Insect Physi.** 59, p 532-541, 2013
- Almeida Campos-Jr, P. H., Assuncao, C. M., Carvalho, B. C., Batista, Ribrio, I. T. P., Garcia, R. M.G., Viana, J. H. M. Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of different strains of mice **Reprod Bio** ; Vol. 12, No. 1; p 41-55, 2012
- ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; ARAÚJO, V. R. BELETTI, M. H.; GAMBARINI, M. L.; JACOMINI, J. O. Quantitative and Morphological Study of Preantral Follicles From Prepubertal Gilts. **Act Sci Vet**, v. 40, p. 1079, 2012.
- ANDRADE, E.R., SENEDA, M.M., ALFIERI, A.A., OLIVEIRA, J.A., BRACARENSE, A.P.F.R.L., FIGUEIREDO, J.R, TONIOLLI, R. Interactions of índole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 64, p. 1104-1113, 2005.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, 2010 (*in press*).
- BAILLET, A.; MANDON-PEPIN, B. Mammalian ovary differentiation. A focus on female meiosis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v 356, p. 13-23, 2012.
- BAUM, J.S., GEORGE J.P. ST., MCCALL K. Programmed cell death in the germline **Semin Cell Dev Biol.**16(2): p 245-59, 2005
- BENNETT, R.A., OSATHANONDH, R. & YEH, J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v, 8, p. 3073-3076, 1996.
- BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v. 38, p. 87-98, 1989.
- BOLAND, N.I. & GOSDEN, R.G. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. **Journ of Reprod and Fertil**, v. 101, p. 369-74, 1994.
- BRAW-TAL, R. & YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of

follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BRISTOL-GOULD S, WOODRUFF TK. 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.V.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of in vitro caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reprod, Fertil. and Develop.** v. 21, p. 679–687, 2009.

BUKOVSKI, 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.

CASALINI P., IORIO M.V., GALMOZZI E. & MENARD S.. Role of HER receptors family in development and differentiation. **J. Cell.Physiol.** v.200,p. 343-350, 2004.

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

CELESTINO J.J., BRUNO J.B., SARAIVA M.V., ROCHA R.M., BRITO I.R., DUARTE A.B., ARAÚJO V.R., SILVA C.M., MATOS M.H.T, CAMPELLO C.C., SILVA J.R., FIGUEIREDO J.R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res.** v.344, p. 539-50, 2011.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J.R. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured In Vitro. **Reprod. Sci.**, v. 16, p. 239-246, 2009.

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

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; RODRIGUES, G.Q.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; LOPES, C.A.P.; ALMEIDA, A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MOURA, A.A.A.; LOBO, C.H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The Effects of Insulin and Follicle-Simulating Hormone (FSH) During In Vitro Development of Ovarian Goat Preantral Follicles and the Relative mRNA Expression for Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles. **Bio Reprod.**, v.87, p.1–11, 2012.

CHOI, J. K., AGARWAL, P. and HE, X. In Vitro Culture of Early Secondary Preantral Follicles in Hanging Drop of Ovarian Cell-Conditioned Medium to Obtain MII Oocytes from Outbred Deer Mice. **Tissue engineering: Part A**, V.00, N. 00, 2013

CONTI, M., HSIEH, M., PARK, J.Y. & SU Y.Q.. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molec Endocrinol**. V. 20: p715-723,2006.

DE LA FUENTE, R., O'BRIEN, M.J. & EPPIG, J.J. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. **Hum. Reprod.**, v. 14,p. 3060–3068, 1999.

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

EPPIG, J.J. & SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. **Biology Reproduction**. v. 41, p. 268-276, 1989.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Sem in reprod endocrinol**, v. 4, p. 233-254, 1986.

ERGIN, K., GURSOY, E., KOCA, Y.B.M., LU, H. B.L., SEYREK, K. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-b2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary. **Cytokine**. v. 43, p 209–214, 2008.

FENG, P., KNECHT, M. & CATT, K. Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. **Endocrinology**, v. 120, p. 1121–1126, 1987.

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*. 98, 192-195, 2011.

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.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Development of combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.

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.

GALL, L.; CHENE, N.; DAHIREL, M.; RUFFINI, S.; BOULESTEIX, C.
Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. **Molec Reprod and Develop** v. 67, p. 439-445, 2004.

GARNETT, K., WANG, J. & ROY, S.K. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. **Biol. Reprod**, v. 67, p. 1593–1604, 2002.

GOSPDAROWICZ, D., BIALECKI, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. **Endocrinology**, v. 104, p. 757-764, 1979.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales d'Endocrinol**, v. 71, p. 132-143, 2010.

GOUD, P.T., GOUD, A.P., QIAN, C., LAVERGE, H., VAN Der ELST, J., DE SUTTER, P. & DHONT, M. *In vitro* maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. **Hum.Reprod.**, v. 13, p. 1638–1644, 1998.

GULER, A., POULIN, N., MERMILLOD, P., TERQUI, M. & COGNIE, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v. 54, p. 209–218, 2000.

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

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HATTORI, M.A., YOSHINO, E., SHINOHARA, Y., HORIUCHI, R. & KOJIMA, I. A novel action of epidermal growth factor in rat granulosa cells: its potentiation of gonadotrophin action. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 283–291, 1995.

HILL, J.L., HAMMAR, K., SMITH, P.J. & GROSS, D.J. Stage dependent effects of epidermal growth factor on Ca²⁺ efflux in mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 244–253, 1999.

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

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

- HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reprod Up**, v. 11, p. 162-178, 2005.
- JEONG, W., KIM, J., BAZER, F.W., SONG, G., Epidermal Growth Factor Stimulates Proliferation and Migration of Porcine Trophectoderm Cells Through Protooncogenic Protein Kinase 1 and Extracellular-Signal-Regulated Kinases 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Cascades During Early Pregnancy † , **Molec and Cel Endoc Molec and Cel Endoc**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.024>, 2013.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; FORKERT, R. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, p. 303-315, 2005
- JOHNSON, J., CONNING, J., KANEKO, T., PRU, J.K. and TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, 426. 145-150, 2004.
- JORIO, A.; MARIANA, J. C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D`man and Timahdite sheep. **Anim Reprod Scien**, v. 26, p. 239-250, 1991.
- LAFKY J.M., WILKEN J.A., BARON A.T. & MAIHLE N.J.. Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. **Biochim Biophys. Acta**. V.1785: p232-65,2008.
- LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.; ALVES, A.M.; SARAIVA, M.V.; ARAÚJO, V.R.; LIMA, I.M.; LOPES, C.A.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured in vitro. *Homeopathy*. v.102, p. 41-8, 2013.
- LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H. & MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 1420–1429, 1996.
- LORET DE MOLA JR, BARNHART K, KOPF GS, HEYNER S, GARSIDE W, COUTIFARIS CB. Comparison of two culture systems for the in-vitro growth and maturation of mouse preantral follicles. **Clin Exp Obstet Gynecol.** ;31(1):15-9, 2004
- LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.** v. 56, p. 39-49, 1999.
- LUCIANO, A.M., PAPPALARDO, A., RAY, C. & PELUSO, J.J. Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 646–654, 1994.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; MORORÓ, M. B. S.; SILVA, C. M. G.; RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. **Reprod in Dom Anim**, 2010.

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

MAO, J., SMITH, M.F., RUCKER, E.B., et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 1967-1975, 2004.

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, 112-120, 2007.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v.62, p.65–80, 2004.

MARUO, T., LADINES-LLAVE, C.A., SAMOTO, T., MATSUO, H., MANALO, A.S., ITO, H. & MOCHIZUKI, M. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. **Endocrin**. 132:924-931, 1993.

MASSAGUE J. & PANDIELLA, A. Membrane-anchored growth factors. **Annu. Rev. Biochem**. 62:515-541, 1993.

MAY, J.V., BRIDGE, A.J., GOTCHER, E.D. & GANGRADE, B.K. The regulation of porcine theca cell proliferation *in vitro*: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet derived growth factor. **Endocrinology**, v. 131, p. 689–697, 1992.

MCCAFFERY, F. H.; LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. Culture of Bovine Preantral Follicles in a Serum-Free System: Markers for Assessment of Growth and Development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 267-273, 2000.

McCULLY, J.D., WAKIYAMA, H., HSIEH, Y-J., JONES, M., LEVITSKY, S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemiareperfusion injury. **Am J Physiol - Heart Circulation Physiology**, v. 286, p. 1923- 1935, 2004.

McGEE, E.A. & HSUE. A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Review**. v. 21, p. 200-214, 2000.

MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin Promotes Follicular Integrity and Oogenesis in Cultured Preantral Bovine Follicles. **Molec Hum Reprod**, v. 16, p. 644 - 653, 2010.

MISAJON, A., HUTCHINSON, P., LOLATGIS, N., TROUNSON, A.O.& ALMAHBOBI, G. The mechanism of action of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha on aromatase activity in granulosa cells from polycystic ovaries. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 5, p. 96–103, 1999.

MIYOSHI T, OTSUKA F, YAMASHITA M, INAGAKI K, NAKAMURA E, TSUKAMOTO N, TAKEDA M, SUZUKI J, MAKINO H Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol** 325:84–92, 2010.

MORBECK, D.E., FLOWERS, W.L., BRITT, J.H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and EGF in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 577-584, 1993.

MIYOSHI T, OTSUKA F, YAMASHITA M, INAGAKI K, NAKAMURA E, TSUKAMOTO N, TAKEDA M, SUZUKI J, MAKINO H. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol** 325:84–92, 2010.

NILSSON E. & SKINNER MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Bio. Reprod**, v.67, p.1018-1024, 2002.

NILSSON, E. E.; KEZELE, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, p. 65-73, 2002.

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Bio Reprod*, v. 68, p.1682–1686, 2003.
O'DONNELL, J.B. JR, HILL, J.L. & GROSS, D.J. Epidermal growth factor activates cytosolic [Ca²⁺] elevations and subsequent membrane permeabilization in mouse cumulus–oocyte complexes. **Reproduction**, v. 127, p. 207–220, 2004.

PALMA, G. A., ARGANARAZ, M., BARRERA, A. D., RODLER, D., MUTTO, A. A. and SINOWATZ F. Review Article: Biology and Biotechnology of Follicle Development. **The Scientific World Journal**, Article ID 938138, 14, 2012

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.

PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v. 303, p. 682-684, 2004.

PROCHAZKA, R., KALAB, P. & NAGYOVA, E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 797–803, 2003.

QU, J.P., GODIN, P.A., NISOLLE, M. & DONNEZ, J. Distribution of epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 302–310, 2000.

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.; BÁO, 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

ROSKOSKI, R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 319:1-11, 2004

ROY, S.K. & GREENWALD, G.S. Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. **Endocrinology**, v. 126, p. 1309–1317, 1990.

ROY, S.K. & KOLE, A.R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: *in vitro* effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF beta on receptor expression in human preantral follicles. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 207–214, 1998.

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

SAHA, S., SHIMIZU, M., GESHI, M., IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 27-39, 2000.

SANCHEZ, F. e SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et biophysica acta* (article in press), 2012.

SANCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO,S.; SMITZ, J. Different follicle-stimulating hormone exposure regimes during antral follicle growth after gene expression in the cumulus-oocyte complex in mice. **Biol Reprod.** 83: 514-524, 2010.

SERAFIM, M. K.; ARAUJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ALMEIDA, A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, L. D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, v. 74, p. 749-55, 2010

SHARMA G. T., DUBEY P. K., NATH A. e SAIKUMAR G. Co-culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles with antral follicles: a comparative study of

developmental competence of oocytes derived from *in vivo* developed and *in vitro* cultured antral follicles. **Zygote**: page 1 of 9 Cambridge University Press 2011

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

SINGH, B., RUTLEDGE, J.M. & ARMSTRONG, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localisation in porcine ovarian follicles. **Mol.Reprod. Dev.**, v. 40, p. 391–399, 1995.

SINGH, B., KENNEDY, T.G., TEKPETEY, F.R. & ARMSTRONG, D.T. Gene expression and peptide localisation for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. **Mol. Cell. Endocrinology**, v. 113, p. 137–143, 1995.

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

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

SILVA, C. M. G. FAUSTINO, L. R., CELESTINO, J. J.H, RODRIGUES,A. P.R., FIGUEIREDO,J.R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na função ovariana e desenvolvimento embrionário. **Acta Vet Bras**, v.4, p.215-226, 2010.

SILVA,C.M.G., CASTRO, S.V. , FAUSTINO, L.R. , RODRIGUE,G.Q. S, BRITO, I.R. , ROSSETTO, R. , SARAIVA, M.V.A. , CAMPELLO, C.C. , LOBO, C.H. , SOUZA, C.E.A. , MOURA, A.A.A. , DONATO, M.A.M. , PEIXOTO, C.A. ,FIGUEIREDO, J.R. . The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Res in Vet Sci**; V 94, 3, P 453–461, 2013.

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

SRIVASTAVA. A.; ALEXANDER. J. LOMANKIN, I. et al. Immunohistochemical expression of transforming growth factor alfa and epidermal growth factor receptor in pancreatic endocrine tumor. **Human Pathol.** V.32: p 1184-1189, 2001.

STRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem**, 69:217- 245. 2000.

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

TEKPETEY, F.R., SINGH, B., BARBE, G. & ARMSTRONG, D.T. Localisation of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor- α stimulation of luteal cell steroidogenesis *in vitro*. **Mol. Cell. Endocrinology**, v. 110, p. 95–102, 1995.

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.

Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. **Nat Immunol**, 4:404-409. 2003.

TOYODA T, NAKAMURA K, YAMADA K, et al. SNP analyses of growth factor genes EGF, TGF- β 1, and HGF reveal haplotypic association of EGF with autism. **Biochem Bioph Res Commun.** v. 360, p.715-720, 2007.

UHM S.J., GUPTA M.K., YANG J.H., CHUNG.H -J., MIN T.S., LEE H.T. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v 73, p 1024–1036, 2010.

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.

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

WANG, Y., LI, J., WANG, C.Y., KWOK, A.H.Y., LEUNG, F.C. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary. I. Evidence for heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) as a potential oocyte-derived signal to

control granulosa cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. **Endocrinol** v.148:p 3426–3440, 2007.

WHITE, Y.A.R.; WOODS, D.C.; TAKAI, Y.; ISHIHARA, O.; SEKI, H.; TILLY, J.L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nat Med**.18: 413-21, 2012.

WU, J.; BENJAMIN, R.E.; CARRELL, D.T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 375-381, 2007.

WU J. AND TIAN Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. **Zygote**, v. 15, pp. 233–240, 2007.

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.

Zhou HM, Zhang Y. Impact of growth factors on in vitro development of caprine oocytes at pre-antral stage. **Reprod Domest Anim.**; v 40: p161-165, 2005.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer:signaling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur. J. Cancer**. V.37: p 3-8, 2001.