

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE RECOMBINANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS E OVINOS ISOLADOS

[Effect of different concentrations of recombinant follicle stimulating hormone on the *in vitro* development of preantral follicles isolated from goats and sheeps]

Giovanna Quintino Rodrigues*, Cleidson Manoel Gomes Silva, Luciana Rocha Faustino, Jamily Bezerra Bruno, Leonardo Correia Pinto, Claudio Afonso Pinho Lopes, Claudio Cabral Campello, José Ricardo de Figueiredo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Faculdade de Veterinária-Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE.

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPA) caprinos e ovinos isolados. Folículos pré-antrais ($\geq 150 \mu\text{m}$) foram isolados de fragmentos do córtex ovariano de cabras e ovelhas e cultivados individualmente por 24 dias em α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de insulina-transferrina-selênio (ITS), 1% de antibióticos e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico, na ausência (controle) ou presença de FSHr (100 ou 1000 ng/mL), a 39 °C com 5% de CO_2 em ar. Durante o cultivo avaliou-se a morfologia, o crescimento folicular e a formação de antro. Foi observado que, na espécie caprina, o cultivo com FSHr apresentou percentuais de folículos morfologicamente normais semelhantes ao controle até o 12º dia de cultivo ($P>0,05$), ocorrendo uma redução deste parâmetro no 18º dia ($P<0,05$) somente no tratamento com 1000 ng/mL de FSHr. Na espécie ovina, o percentual de folículos morfologicamente normais foi semelhante em todos os tratamentos, observando-se um decréscimo a partir do 12º dia ($P<0,05$). Com relação ao desenvolvimento folicular, em caprinos, a adição de FSHr aumentou a taxa de crescimento em relação ao controle ($P<0,05$). Entretanto, em ovinos, isso só foi observado no tratamento com 1000 ng/mL de FSHr. No que se refere à formação de antro, em ambas as espécies, não houve diferença significativa entre os tratamentos com FSHr e o controle. Quanto à análise da configuração da cromatina, todos os oócitos permaneceram em estágio de vesícula germinativa. Assim, pôde-se concluir que FOPA caprinos e ovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágio antral na ausência de FSH. Contudo, este hormônio teve um papel importante na taxa de crescimento folicular em ambas as espécies.

Palavras-Chave: FSH, cultivo *in vitro*, cabras, ovelhas, folículo pré-antral, oócito.

ABSTRACT - The aim of this work was to evaluate the effects of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) on the *in vitro* development of isolated caprine and ovine preantral follicles. Preantral follicles (≥ 150 micron) were isolated from fragments of goats and sheeps ovarian cortex and individually cultured for 24 days in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% insulin-transferrin -selenium (ITS), 1% antibiotics and 50 mg / mL ascorbic acid, in the absence (control) or presence of FSHr (100 or 1000 ng / mL) at 39 °C with 5% CO_2 in air. Follicular morphology, growth and antral cavity formation were assessed throughout the culture. The results showed that addition of rFSH to the medium had no effect on the percentages of caprine morphologically normal follicles until day 12 as compared with the control, but a decrease was observed on day 18 with the use of the hormone ($p<0.05$) only rFSH (1000 ng/mL). Regarding ovine follicles, percentages of normal follicles were significantly reduced from day 12 onwards in all treatments, which led to similar results. Growth rates were increased in caprine follicles by use of rFSH (100 and 1000 ng/ml) in comparison to the control ($p<0,05$). In ovine follicles, such effect was observed only when rFSH was used at 1000 ng/ml . With respect to antral cavity formation, no difference among treatments was observed for both species. The analysis of chromatin configuration revealed that all oocytes remained at the germinal vesicle stage. In conclusion, caprine and ovine preantral follicles are capable to survive and develop to the antral stage *in vitro* without FSH. However, this hormone is important for increasing follicular growth rates in both species.

Keywords: FSH, *in vitro* culture, goats, ewes, preantral follicle, oocyte.

* Autor para correspondência. E-mail: gqrvet@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é comumente realizada a partir de folículos antrais (FA) (Nagano et al., 2007), cuja população compreende apenas cerca de 5 a 10% do total de folículos ovarianos, sendo significativamente menor que a população de folículos pré-antrais (FOPA) (Figueiredo et al., 2007). Nesse contexto, diversos trabalhos vêm tentando desenvolver um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade bem como promover o crescimento de FOPA, uma vez que o cultivo dessa classe folicular resultaria no fornecimento de milhares de oócitos viáveis, aumentando o rendimento da PIV.

Apesar dos esforços de diversas equipes, apenas alguns estudos têm obtido sucesso no cultivo *in vitro* de FOPA em diversas espécies (bubalinos: Gupta et al., 2008, ovinos: Arunakumari et al., 2007, suínos: Wu & Tian, 2007, humanos: Telfer et al., 2008), sendo o mais relevante o trabalho de O'Brien et al. (2003), que obtiveram o nascimento de camundongos saudáveis.

A eficiência do cultivo de FOPA pode ser afetada por diferentes fatores, tais como atmosfera gasosa, período de cultivo, tipo de meio e suplementos adicionados. Um suplemento bastante utilizado no meio de cultivo de FOPA é o soro fetal bovino (SFB), o qual é composto por diversas substâncias como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (Picton et al. 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteróides (Hulshof et al. 1995). Estudos têm demonstrado que o SFB mantém a sobrevivência de FOPA suínos (Telfer et al. 2000), além de promover a ativação de FOPA humanos (Wright et al. 1999) e a formação de antro em FOPA ovinos (Cecconi et al. 1999).

Com relação aos hormônios utilizados no cultivo *in vitro* de FOPA, pode-se destacar o hormônio folículo estimulante (FSH), uma importante gonadotrofina que desempenha papel fundamental no desenvolvimento folicular e na regulação da esteroidogênese ovariana (Richards 1980, Hsueh et al. 1989), sendo identificada como essencial para o crescimento folicular *in vitro* (Adriaens et al. 2004, Cecconi et al. 1999, Mao et al. 2002). Existem diversos tipos de FSH, os quais se diferenciam de acordo com a sua origem, como, por exemplo, extrato pituitário de animais domésticos, principalmente suínos (FSHp) e ovinos (FSHo), e urina de mulheres no período de menopausa. Outra fonte de FSH que vem sendo bastante utilizada é obtida a partir da tecnologia de DNA recombinante,

a qual utiliza células de ovários de hamsters. O FSH recombinante (FSHr) é mais puro e homogêneo, o que pode propiciar uma alta eficácia nos resultados de crescimento folicular (Calder et al. 2003). Apesar disso, o efeito desse hormônio sobre o cultivo *in vitro* de FOPA depende de alguns fatores como a espécie a ser estudada, os diferentes sistemas de cultivo e o grau de pureza das preparações comerciais. Nesse sentido, Cecconi et al. (1999) cultivaram FOPA de ovino isolados utilizando FSHp (nas concentrações de 100 e 1000 ng/mL) associado a SFB (10%), obtendo formação de antro pela primeira vez nesta espécie. Entretanto, ainda não há relatos do efeito do FSHr no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos e ovinos isolados. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do FSHr sobre o desenvolvimento *in vitro* de FOPA caprinos e ovinos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, E.U.A.), sendo as exceções devidamente descritas.

Foram utilizados 60 ovários oriundos de cabras (n=30) e ovelhas (n=30) adultas sem raça definida (SRD), provenientes de abatedouros locais. Imediatamente após o abate, os ovários foram lavados em álcool a 70% e, em seguida, duas vezes em Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido de HEPES e antibióticos (75 mg/L de penicilina e 50 mg/L de estreptomicina), no qual foram transportados ao laboratório a 4 °C em até 1 h.

Após remoção do tecido adiposo, ligamentos e medula, o córtex ovariano foi fragmentado (1-2 mm) com auxílio de um bisturi sob condições estéreis. Destes fragmentos, FOPA intactos (150-250 µm) foram isolados mecanicamente com o auxílio de um estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão) a um aumento de 20X, utilizando-se agulhas de calibre 26 G acopladas a seringas de insulina. Folículos com o oócito visível, circundado por células da granulosa e uma membrana basal intacta, e sem cavidade antral foram selecionados para o cultivo.

O meio de cultivo utilizado foi o α -MEM (pH 7.2 - 7.4) suplementado com 10% de SFB, 1% de ITS (6.25 µg/mL de insulina, 6.25 µg/mL de transferrina e 6.25 ng/mL de selênio), antibióticos (75 mg/L de penicilina, 50 mg/L estreptomicina) e 50 µg/mL de ácido ascórbico, o qual foi denominado α -MEM⁺. Os folículos foram cultivados em α -MEM⁺ sozinho ou suplementado com 100 ou 1000 ng/mL de FSHr

(Nanocore, Campinas, Brasil). Para cada tratamento, foram selecionados, no mínimo, 30 folículos, os quais foram cultivados individualmente em gotas de 25µL de meio, cobertas com 6 mL de óleo mineral, em estufa a 39 °C com 5% de CO₂ em ar por até 18 dias. A cada dois dias, 15 µL de meio de cada gota foi trocado por meio fresco.

Durante todo o período de cultivo, o crescimento folicular foi avaliado de acordo com o aumento do diâmetro e com a formação da cavidade antral, a qual foi definida como uma área clara dentro das camadas de células da granulosa. O diâmetro folicular foi avaliado a cada seis dias com auxílio de uma ocular micrométrica acoplada ao estereomicroscópio, sendo calculado como a média de duas medidas ortogonais (horizontal e vertical). Os folículos foram analisados de acordo com seu aspecto morfológico, sendo considerados viáveis aqueles que se apresentaram translúcidos, com membrana basal intacta, células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes, e sem sinais de degeneração (contorno irregular, escurecimento do oócito e/ou células da granulosa e redução do diâmetro).

Ao final do período de cultivo, os oócitos foram recuperados dos folículos com auxílio de agulhas 26 G, aspirados e lavados duas vezes em meio TCM199 contendo HEPES (TCM199H), suplementado com piruvato e 10% SFB. Em seguida, os oócitos foram cultivados por 26 horas em gotas de 50 µL de meio de MIV, constituído por TCM199 com bicarbonato (TCM199B), suplementado com 5 µg/mL de FSHr, 5µg/mL de LH, 1µg/mL de 17β-estradiol, 1 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF), 20% de SFB e 0,23 mM de piruvato. O cultivo foi realizado em placas (35 x 15 mm) sob óleo mineral, em estufa contendo 5% de CO₂ em ar a 39°C.

Após o período de incubação, os oócitos foram desnudados das células do cumulus por repetidas pipetagens, lavados em TCM199H, colocados entre uma lâmina e uma lamínula e fixados em uma solução de etanol e ácido acético (3:1) por 24 h. Após esse período, os oócitos foram corados com lacmóide e observados sob microscópio ótico para avaliação da configuração da cromatina.

A taxa de recuperação dos oócitos foi calculada da seguinte forma: o número total de oócitos selecionados ($\geq 110\mu\text{m}$) para a maturação *in vitro* (MIV) dividido pelo número total de folículos pré-antrais cultivados.

Os dados de morfologia, formação de antro e maturação após o cultivo *in vitro* foram comparados pelo teste de Qui-quadrado e os resultados foram expressos como percentuais. Os dados de taxa de crescimento que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram submetidos à ANOVA seguida do teste t de Student para comparação das médias (SAS, 1999). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Com relação à morfologia, os folículos que se apresentaram translúcidos, com membrana intacta e células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes foram considerados normais (Figura 1A), enquanto aqueles com contorno irregular, escurecimento do oócito e/ou células da granulosa, perda da integridade da membrana e redução do diâmetro foram considerados degenerados (Figura 1B).

As percentagens de FOPA morfologicamente normais caprinos e ovinos após o cultivo *in vitro* são mostradas nas figuras 2 e 3, respectivamente. Com relação à espécie caprina, até o 12º dia de cultivo, o percentual de folículos morfologicamente normais foi similar nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$). Entretanto, no 18º dia, esse percentual foi significativamente inferior no grupo tratado com FSHr na concentração de 1000 ng/mL quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). No grupo tratado com 100 ng/mL de FSHr, houve uma redução do percentual de folículos morfologicamente normais apenas do dia 0 para o dia 6 e do dia 6 para o dia 12 ($P < 0,05$), enquanto que, no grupo tratado com 1000 ng/mL de FSHr, essa redução ocorreu de forma significativa ($P < 0,05$) apenas do dia 0 para o dia 6. No grupo controle, foi observada queda significativa do percentual de folículos morfologicamente normais somente do dia 0 para o dia 6 (Figura 2). Na espécie ovina, o percentual de folículos morfologicamente normais foi semelhante entre todos os tratamentos em cada dia ($P > 0,05$). Houve redução significativa desse percentual nos grupos tratados com FSHr ($P < 0,05$) no 12º dia de cultivo (Figura 3).

No que se refere ao desenvolvimento folicular, a adição de FSHr em ambas as concentrações testadas

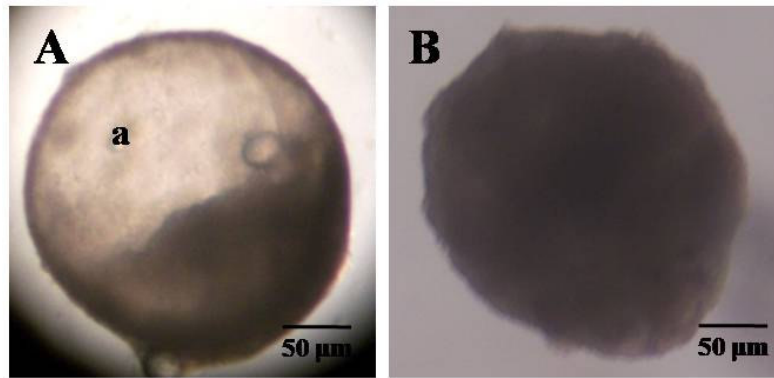


Figura 1. Folículo morfologicamente normal, translúcido, com membrana intacta e células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes (A), folículos degenerado, com contorno irregular, escurecimento do oócito e células da granulosa, perda da integridade da membrana e redução do diâmetro (B). (aumento de 20X)

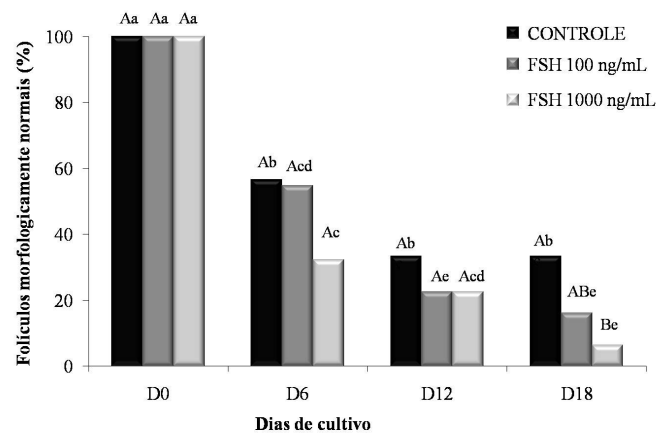


Figura 2. Percentual de folículos caprinos morfologicamente normais no grupo controle e nos grupos cultivados nas diferentes concentrações de FSHr.

A, B diferem entre os grupos dentro do mesmo dia ($P < 0,05$).
a, b, c diferem entre os dias dentro do mesmo grupo ($P < 0,05$).

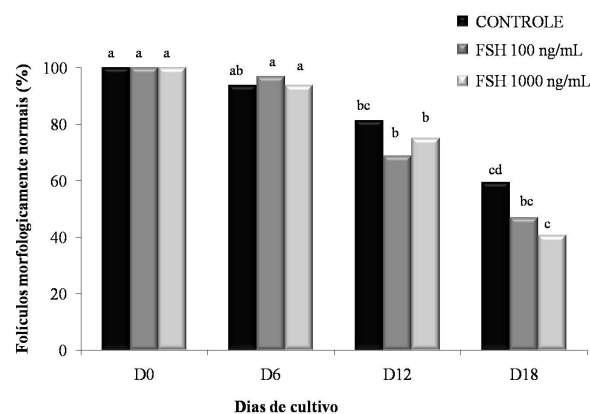


Figura 3. Percentual de folículos ovinos morfologicamente normais no grupo controle e nos grupos cultivados nas diferentes concentrações de FSHr.

a, b, c diferem entre os dias dentro do mesmo grupo ($P < 0,05$).

aumentou significativamente a taxa de crescimento de FOPA caprinos quando comparado ao controle (Figura 4). Na espécie ovina, esse aumento somente foi observado no grupo tratado com FSHr na concentração de 1000 ng/mL com relação ao controle ($P < 0,05$).

O efeito da adição de FSHr ao meio de cultivo de FOPA caprinos e ovinos sobre o desenvolvimento da cavidade antral está descrito na Figura 5. Os primeiros folículos antrais foram observados no 6º dia de cultivo tanto no grupo controle como nos tratamentos com FSHr. Com relação à taxa de formação de antro, em cada espécie, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$).

A Figura 6 mostra o percentual de oócitos destinados à MIV após cultivo *in vitro* na ausência ou presença de FSHr. Não foi observada diferença significativa

entre os grupos tratados com FSHr e o grupo controle em relação aos percentuais de oócitos recuperados com diâmetro $\geq 110 \mu\text{m}$ ($P > 0,05$). Além disso, foi verificado que, após o período de cultivo para a MIV, todos os oócitos apresentaram-se morfológicamente normais e em estágio de vesícula germinativa (Figura 7).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliado o efeito do FSH sobre o cultivo *in vitro* de FOPA de pequenos ruminantes, uma vez que diversos trabalhos têm mostrado efeitos positivos desse hormônio no crescimento folicular em diversas espécies (humanos: Telfer et al. 2008, murinos: Cecconi et al. 2004, bubalinos: Gupta et al. 2008, suínos: Wu & Tian 2007).

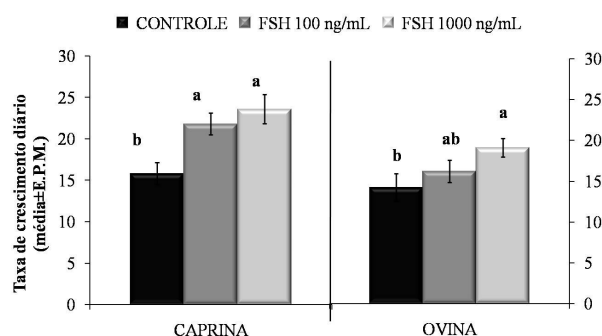


Figura 4. Taxa de crescimento diário de FOPA caprinos e ovinos durante 18 dias de cultivo. a, b diferem entre os grupos dentro da mesma espécie ($P < 0,05$).

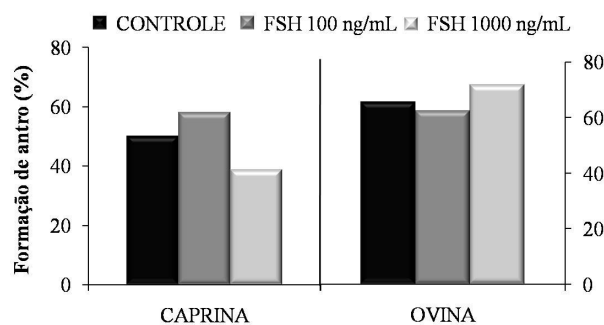


Figura 5. Efeito do FSHr sobre o percentual de formação de antro após cultivo de FOPA caprinos e ovinos por 18 dias.

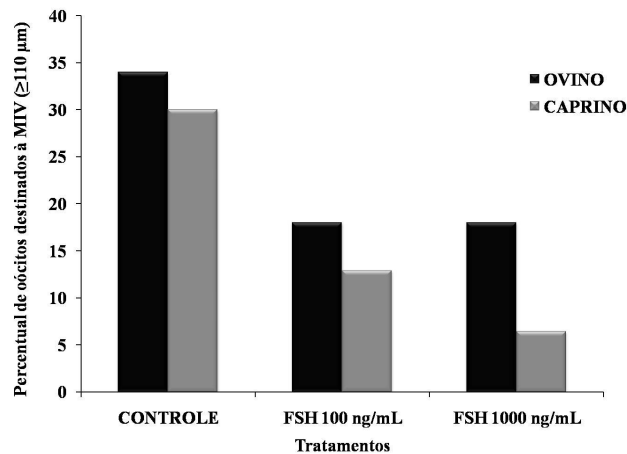


Figura 6. Taxa de recuperação de oócitos com crescimento completo oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

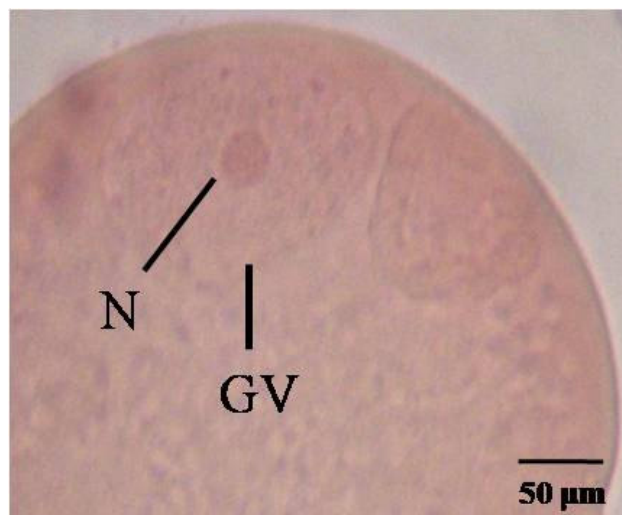


Figura 7. Oócito morfologicamente normal com vesícula germinativa intacta (aumento de 1000 x). VG – vesícula germinativa, N-nucléolo.

Neste trabalho, o FSHr não teve influência na sobrevivência folicular, uma vez que, em ambas as espécies, os grupos tratados com essa gonadotrofina apresentaram valores semelhantes àqueles cultivado na sua ausência até 18 dias. Resultados similares foram descritos por Silva et al. (2004), que, ao cultivarem FOPA caprinos *in situ*, observaram que o FSH porcino (FSHp) na concentração de 100 ng/mL não alterou a taxa de sobrevivência folicular quando comparado ao grupo cultivado sem FSH. Além disso, Rajarajan et al. (2006) observaram uma taxa de degeneração em torno de 40% em FOPA caprinos

isolados e cultivados na presença de FSHp por 6 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho provavelmente estão relacionados ao fato de ter sido utilizado um meio de base bastante complexo composto por suplementos protéicos, energéticos, antioxidantes, dentre outros. Acredita-se, dessa forma, que esse meio de base proporcionou um microambiente favorável para manutenção da sobrevivência folicular. Além disso, a presença de SFB no meio de cultivo pode não ter permitido

efeitos positivos adicionais do FSHr, uma vez que o soro é composto por diversas substâncias como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (Picton et al. 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteróides (Hulshof et al. 1995).

Cecconi et al. (1999), ao cultivarem FOPA ovinos isolados na presença de FSHp na concentração de 1000 ng/mL associado ao SFB, obtiveram uma taxa de sobrevivência folicular de aproximadamente 93% após seis dias de cultivo. Nossos resultados foram similares (94%) nesse mesmo período utilizando essa mesma concentração de FSHr, porém o mesmo não ocorreu com caprinos (32%). Nesta espécie, os melhores resultados foram verificados com a concentração de 100 ng/mL (54%). Com relação ao desenvolvimento folicular, em FOPA caprinos, o FSHr promoveu um aumento significativo da taxa de crescimento diário em relação ao controle em ambas as concentrações testadas, enquanto em FOPA ovinos, esse resultado foi observado apenas no grupo tratado com 1000 ng/mL de FSHr. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que têm demonstrado que o FSH exerce importante papel no crescimento *in vitro* de FOPA (Campbell et al. 2004; Silva et al. 2004; Wu et al. 2007; Matos et al. 2007). Por outro lado, Rajarajan et al. (2006), utilizando uma concentração fixa de FSHp no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos isolados por no máximo 6 dias não observaram efeitos significativos deste hormônio sobre o desenvolvimento folicular. No presente trabalho, os tratamentos com FSHr promoveram um crescimento acelerado dos folículos, o que pode também ter ocorrido devido à presença de SFB no meio de base. Cecconi et al. (1999) obtiveram um rápido crescimento folicular utilizando 10% de SFB durante o cultivo *in vitro* de FOPA ovinos. Além disso, o cultivo *in vitro* de FOPA isolados de ovários de fetos bovinos é mais efetivo em relação ao aumento do diâmetro folicular quando se utiliza SFB que outras fontes de macromoléculas como BSA ou KnockoutSR, um suplemento definido sintético substituto do soro que também pode ser utilizado no cultivo embrionário e na fertilização *in vitro*. (Basso et al. 2007). Entretanto, a identificação dos diferentes fatores de crescimento e proteínas presentes no soro que são essenciais para o crescimento folicular ainda é um desafio. De fato, o soro contém numerosas proteínas conhecidas e desconhecidas que podem interagir com outros componentes adicionados ao meio (Demeestere et al. 2005).

As espécies aqui estudadas se comportaram de forma diferente, uma vez que foi observado que a concentração de 100 e 1000 ng/mL aumentou a taxa

de crescimento em folículos caprinos e ovinos, respectivamente. Isto ocorreu provavelmente pelo fato de que os níveis necessários desta gonadotrofina para o crescimento folicular são diferenciados entre as espécies. Estima-se que a concentração plasmática de FSH *in vivo* na fase estral varia em torno de 250 ng/mL na espécie caprina (Rodello, 2004) e 2000 ng/mL na espécie ovina (Campbell et al. 2009).

Com relação à formação de antro, foram obtidos no presente estudo, taxas de até 58% e 72% em caprinos e ovinos, respectivamente. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, em ambas as espécies. Newton et al. (1999) obtiveram uma taxa de 7% de formação de antro após cultivo *in vitro* de FOPA ovinos na ausência de FSH, além disso, a formação de cavidade antral também foi observada em FOPA humanos cultivados sem gonadotrofinas (Wu et al. 1998).

No presente trabalho, em ambas as espécies, o percentual de oócitos destinados à MIV ($\geq 110 \mu\text{m}$) foi semelhante entre os tratamentos testados. Além disso, todos os oócitos destinados à MIV permaneceram em estágio de vesícula germinativa e apresentaram-se morfológicamente normais. Este fato corrobora com Daniel et al. (1989), os quais mostraram que oócitos são capazes de continuar seu crescimento por até 12 dias de cultivo na ausência de FSH. Ademais, Eppig et al. (1998) relataram que a adição de FSH no co-cultivo *in vitro* de células da granulosa e complexos cumulus-oócito não influenciou a competência meiótica.

Frente às mesmas condições de cultivo, o desempenho de FOPA ovinos foi superior ao de FOPA caprinos em todos os parâmetros avaliados, exceto na taxa de crescimento diário. De fato, diversos estudos com FOPA ovinos têm sido realizados com sucesso (Cecconi et al. 1999, Hemamalini et al. 2003, Talmimani et al. 2007). Nesta espécie oócitos meioticamente competentes já foram obtidos após cultivo *in vitro* de FOPA (Arunakumari et al. 2007, Tamilmami et al. 2007), o que ainda não foi alcançado na espécie caprina. Resultados ainda mais satisfatórios foram relatados por Salle et al. (2002, 2003), que obtiveram o nascimento de crias após autotransplante de ovários criopreservados. As diferenças espécie-específicas envolvem diversos aspectos, tais como: o tempo total para completar a foliculogênese e a oogênese; tamanho dos folículos e dos oócitos maduros e as diferenças entre as fontes, concentrações e efeitos dos fatores de crescimento que modulam o desenvolvimento dos folículos e oócitos (Picton et al. 2008).

Diante do exposto, pode-se concluir que FOPA caprinos e ovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágio antral na ausência de FSH. Contudo, o FSHr teve um papel importante no aumento da taxa de crescimento folicular em ambas as espécies.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Líliam Mara Trevisan Tavares e à Msc. Ana Beatriz Graça Duarte pela ajuda na realização da maturação *in vitro* e à CAPES pelo suporte financeiro.

REFERENCES

- Adriaens I., Cortvrindt R., J. Smitz. 2004. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence I. Human Reproduction.19: 398-408.
- Arunakumari G., Vagdevi R., Rao B.S., Naik B.R., Naidu K.S., Suresh Kumar R.V., Rao, V.H. 2007. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. Small Ruminant Research. 70: 93-100.
- Basso A.C., Garcia J.M., Esper C.R. 2007. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 44: 134-143.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. Reproductive Biology and Endocrinology.14: 1-12.
- Campbell B. K., Telfer E. E., Webb R., Baird D. D. T. 2004. Evidence of a Role for Follicle-Stimulating Hormone in Controlling the Rate of Preantral Follicle Development in Sheep. Endocrinology. 145: 1870-1879.
- Campbell B. K. 2009. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. Animal Reproduction. 6: 159-171.
- Cecconi S., Barboni B., Coccia M., Mattioli, M. 1999. *In vitro* development of sheep preantral follicles. Biology of Reproduction. 60: 594-601.
- Cecconi S., Rossi G., Barberi M., Scaldaferrri L., Canipari R. 2004. Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development *in vitro*. Endocrinology.145: 2071-2979.
- Daniel S. A. J., Armstrong D. T., Gore-Langton R. E. 1989. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. Gamete Research. 24: 109-121.
- Demeestere I., Centner J., Gervy C., Englert Y., Delbaere A. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. Reproduction. 130: 147-156.
- Eppig J. J., O'Brien M. J., Pendola F. L., Watanabe S. 1998. Factors Affecting the Developmental Competence of Mouse Oocytes Grown *In vitro*: Follicle-Stimulating Hormone and Insulin. Biology of Reproduction. 59: 1445-1453.
- Figueiredo J. R. Celestino J. J. H., Rodrigues A. P. R., Silva J. R. V. 2007. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. Revista Brasileira de Reprodução Animal.31: 143-152.
- Freitas C. P. 2004. Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos: meios de cultivo e fatores de crescimento. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- Gupta P. S. P., Ramesh H. S., Manjunatha B. M., Nand, S., Ravindra J.P. 2008. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. Zygote. 16: 57-63.
- Hemamalini N.C., Rao B.S., Tamilmani G., Amarnath D., Vagdevi R., Naidu K.S., Reddy K.K., Rao V.H. 2003. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. Small Ruminant Research. 50: 11-22.
- Hsueh A. J. W., McGee E. A., Hayashi M., Hsu S.Y. 1989. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. Molecular and Cellular Endocrinology.63: 100.
- Hulshof S.C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F., Bevers M.M., Van Der Donk J.A. and Van Den Hurk R. 1995. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17- β estradiol on the culture of bovine preantral follicles. Theriogenology.44: 217-226.
- Mao J., Wu G., Smith M.F., McCauley T.C., Cantley T.C., Prather R.S., Didion B.A., Day B.N. 2002. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicle development and antrum formation *in vitro*. Biology of Reproduction. 67: 1197-1203.
- Matos M. H. T., Lima-Verde I. B., Luque M. C. A., Maia JR J. E., Silva J. R.V., Celestino J. J. H., Martins F. S., Bão S. N., Lucci C. M., Figueiredo J. R. 2007. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. Zygote. 15: 173-182.
- Nagano M., Atabay E. P., Atabay E. C., Hishinuma M., Katagiri S., Takahashi Y. 2007. Effect of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on *in vitro* viability of mouse preantral follicles. Biomedical Research. 28: 153-160.
- Newton H., Picton H., Gosden R. G. 1999. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. Journal of Reproduction and Fertility. 115: 141-150.
- O'Brien M. J., Pendola J.K., Eppig J.J. 2003. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. Biology of Reproduction. 68: 1682-1686.
- Picton H. M., Harris S. E., Muruvi W., Chambers E. L. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. Reproduction. 136: 703-715.
- Rajarajan K., Rao B.S., Vagdevi R., Tamilmani G., Arunakumari G. Sreenu M., Amarnath D., Naik B.R., Rao V.H. 2006. Effect

of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. Small Ruminant Research. 63: 204–212.

Richards 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian... Richards *Physiol. Rev.* 60: 51-89.

Rodello, L. Dinâmica folicular ovariana e seu controle em cabras. 2004. 23 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

Salle B., Demirci B., Franck M., Rudigoz R. C., Guerin J. F., Lornage J. 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility.* 77: 403-408.

Salle B., D., Demirci B., Franck M., Berthollet C., Lornage J. 2003. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility.* 80: 172-177.

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

Tamilmani G., Rao B.S., Vagdevi R., Amarnath D., Naik B.R., Mutharao M., Rao V.H. 2005. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. *Small Ruminant Research.* 60: 295–305.

Telfer E.E., Binnie J.P., McCaffery F.H, Campbell B.K. 2000. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 163: 117–123.

Telfer E.E., MCLAughlin M., Kini S., Williams A., Thong K.J. 2008. Development of human preantral follicles *in vitro* is enhanced by timed exposure to activin-A followed by FSH. *Fertility and Sterility.* 90: 54. Page Abstracts of the Scientific Oral & Poster Sessions Program Supplement, American Society for Reproductive Medicine 64th Annual Meeting. The development of porcine preantral follicle *in vitro*. 2007. *Zygote.* 15: 233–240.

Wright C.S., Hovatta O., Margara R., Trew G., Winston R.M.L., Frank S., Hardy K. 1999. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction.* 14: 1555–1562.

Wu J., Zhang L., Liu P. 1998. A new source of human oocytes: preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicle from follicular aspirates. *Human Reproduction.* 13: 2561-2563.

Wu, J. & Tian, Q. 2007. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote.* 15: 233–240.

Wu J., Xu Bo., Wang W. 2007. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown *in vitro*. *Journal of Assist. Reprod. Genet.* 24: 419–424.