

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

**EFEITO DO TEMPO E DA TEMPERATURA SOBRE A
VIABILIDADE DE TECIDO OVARIANO DE FETOS
BOVINOS**

Jairo de Melo Júnior

Médico Veterinário

UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL
Fevereiro 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária

**EFEITO DO TEMPO E DA TEMPERATURA SOBRE A
VIABILIDADE DE TECIDO OVARIANO DE FETOS
BOVINOS**

Jairo de Melo Júnior

Orientador: Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Co-orientadora: Dra. Kele Amaral Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva)

UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL
Fevereiro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M528e Melo Júnior, Jairo de, 1987
2017 Efeito do tempo e da temperatura sobre a viabilidade de tecido
ovariano de fetos bovinos / Jairo de Melo Júnior. - 2017.
68 f. : il.

Orientador: José Octavio Jacomini.
Coorientador: Kele Amaral Alves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Reprodução - Teses. 3.
Fertilização in vitro - Teses. 4. - Teses. I. Jacomini, José Octavio. II.
Alves, Kele Amaral, 1975-. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

“O Senhor é a minha luz e a minha salvação; a quem temerei? O Senhor é a força da minha vida; de quem me recearei?”

Livro de Salmos, capítulo 27, verso 1

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Jairo e Sandra, por todo o amor e carinho que eles tem por mim
e por todo o suporte e ajuda para estar aqui
A minha irmã Juliana, por todo o incentivo
A todos os familiares e amigos que também participaram dessa caminhada ao meu lado*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Senhor meu Deus, por tudo que ele tem me preparado, por esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal e por sempre abençoar a minha vida.

Aos meus pais, Jairo e Sandra, por tudo que eles são para mim e por todo o amor e carinho que eles sempre tiveram, me ajudando em todos os caminhos que eu trilhei na minha vida.

A minha irmã Juliana, minha tia Sônia, minhas avós Maria Aparecida e Ondina e todos os meus parentes que me apoiaram nessa caminhada.

A todos os meus amigos e irmãos na fé que sempre estiveram a meu lado me dando apoio e incentivo.

Ao meu orientador, José Octávio Jacomini, por toda a paciência, pelos ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar.

A minha co-orientadora, Kele Amaral Alves, por toda a ajuda, paciência, dedicação e ensinamentos em todos os momentose etapas de realização deste trabalho.

As amigas pós-graduandas Deize, Mayara Oliveira e Mayara Mafra pela amizade, bom convívio e muita paciência para me ajudarem sempre. A Renata, Carina, Paula e Amanda pela amizade e bom convívio.

Aos professores do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, professora Teresinha, professora Ricarda e professor Gustavo, pelos ensinamentos e convívio.

A dona Maria, pela atenção e ajuda e a Graciele pelo convívio. E a todos os alunos, Luciana, Bárbara, Susiandra, Tatiane, Mateus, Brunner, Luiz, Igor, Rodolfo, Aparecida e Lorena pela amizade e Augusto, Rudgery, Jaine e Bianca , alunos da Renata que muito ajudaram na realização do trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Histologia da Universidade de Uberlândia, professor Marcelo Emílio Beletti pela paciência, pela confiança por ceder seu laboratório para realização dos experimentos e pelos ensinamentos e aos demais integrantes Ester, Marianni, Fabrício e Roseane pela ajuda nas etapas realizadas.

Aos integrantes do LAMOFOPA, em especial ao professor José Ricardo Figueiredo pela oportunidade de realizar parte de meu experimento na instituição e ao pós-graduando Yago pela grande ajuda.

Ao pós- doutor Benner Geraldo Alves por toda a ajuda durante as etapas do trabalho.

A equipe do Frigorífico Real, por sempre nos ajudar disponibilizando material.

Muito obrigado!

RESUMO

Objetivou-se com este estudo estabelecer o melhor intervalo de tempo e a temperatura ideal do meio para se realizar o transporte de ovários de fetos bovinos do local de coleta até o laboratório. A morfologia e a integridade dos folículos pré-antrais e a viabilidade tecidual foram os parâmetros avaliados. Para isso, o trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, (Experimento 1) ovários de fetos bovinos, coletados em frigorífico, foram transportados em garrafas térmicas com temperaturas de 4°C, 22°C e 33°C. No Experimento 2, foram testados para a viabilidade mediante o tempo que levaram para ser manipulados, sendo que cada grupo foi manipulado com intervalos de 4hs, 10hs e 16hs após sua coleta. O experimento 1 demonstrou que a maior proporção ($P < 0,05$) de folículos pré-antrais viáveis foi observada na temperatura de 4°C. O grupo de 33°C apresentou a maior degeneração tecidual emitida pela proba iodeto de propídeo. A proporção de folículos primordiais foi menor ($P < 0,05$) em todos os grupos de tratamento após o término do cultivo *in vitro* comparado ao controle e ao D0. O experimento 2 demonstrou que a viabilidade e morfologia dos folículos foi melhor mediante o intervalo de tempo de 4 horas em comparação aos intervalos de 10 e 16 horas. O grupo transportado durante 4 horas apresentou emissão de fluorescência relativa a índice de células apoptóticas inferior ($P < 0,05$) ao controle e aos outros grupos. Os resultados permitiram concluir que a melhor temperatura para o transporte de ovários de fetos bovinos é a 4°C sendo que o melhor intervalo para que isso seja feito é o de 4 horas.

Palavras-chaves: viabilidade folicular, preservação tecido ovariano, fertilidade

ABSTRACT

The aim of this study was to establish the best time interval and the ideal temperature of the medium to carry the ovaries from bovine fetuses from the collection site to the laboratory. The morphology and integrity of the preantral follicles and tissue viability were the evaluated parameters. For this, the work was divided into two steps. In the first one, (Experiment 1), ovaries of bovine fetuses, were transported in thermal bottles with temperatures of 4 ° C, 22 ° C and 33 ° C. In the Experiment 2 was carried out, tested for viability by the time it took to be manipulated, and each group was manipulated with intervals of 4hs, 10hs and 16hs after their collection. Experiment 1 demonstrated that the highest proportion ($P < 0.05$) of viable preantral follicles was observed at 4°C. The group of 33°C showed the highest tissue degeneration emitted by propidium iodide. The proportion of primordial follicles was lower ($P < 0.05$) in all treatment groups after *in vitro* culture compared to control and D0. Experiment 2 demonstrated that the viability and morphology of the follicles was better during the 4 hour time interval compared to the 10 and 16 hour intervals. The group transported for 4 hours presented the lower fluorescence emission relative to apoptotic cell index ($P < 0.05$) to the control and to the other treatment groups. The results showed that the best temperature for the transport of ovaries of bovine fetuses is 4 °C and the best interval for this to be done is 4 hours.

Key words: follicular viability, ovarian tissue preservation, fertility

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo H₂DCFDA, em relação a diferentes temperaturas de transporte após 7 dias de cultivo; (B)- a 4°C; (C)- a 22°C; (D)- a 33°C. * Indica diferença com relação ao controle (P < 0,05). ^{a,b} indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05). Barra 100 µm. 39
- Figura 2.** (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo Iodeto de Propídeo, em relação a diferentes temperaturas de transporte após 7 dias de cultivo; (B) a 4°C; (C) a 22°C; (D) a 33°C. * Indica diferença com relação ao controle (P < 0,05). ^{a,b} indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05). Barra 100µm..... 40
- Figura 3.** (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo YOPRO 1, em relação a diferentes temperaturas de transporte após 7 dias de cultivo; (B) a 4°C; (C) a 22°C; (D) a 33° C. * Indica diferença com relação ao controle (P < 0,05). ^{a,b} indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05). Barra 100µm. 41
- Figura 4.** (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo corante H₂DCFDA, em relação a diferentes tempos de transporte após 7 dias de cultivo; (B) 4hs; (C) 10hs; (D) 16hs. * Indica diferença com relação ao controle (P < 0,05). ^{a,b} Indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05). Barra 100µm. 44
- Figura 5.** (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo Iodeto de Propídeo, em relação a diferentes tempos de transporte após 7 dias de cultivo *in vitro*; (B) 4hs; (C) 10hs; (D) 16hs. * Indica diferença com relação ao controle (P < 0,05). ^{a,b} Indica diferença entre os tratamentos (P < 0,05). Barra 100µm. 45

Figura 6. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo YOPRO 1, em relação a diferentes tempos de transporte após 7 dias de cultivo; (B) tecido transportado durante 4hs; (C) tecido transportado durante 10hs; (D) tecido transportado durante 16hs. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). ^{a,b} indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$); Barra 100 μ m..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção de folículos pré-antrais normais inclusos em ovário de fetos bovinos submetidos a diferentes temperaturas de transporte.....	37
Tabela 2. Proporção de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento inclusos em ovários de fetos bovinos submetidos a diferentes temperaturas de transporte.....	38
Tabela 3. Proporção de folículos pré-antrais normais inclusos em ovário de fetos bovinos submetidos a diferentes tempos de transporte	42
Tabela 4. Proporção de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento inclusos em ovários de fetos bovinos submetidos a diferentes tempos de transporte	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- MOIFOPA- manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
PIVE- produção *in vitro* de embriões
°C- graus Celcius
CGP- célula germinativa primordial
TGB β - fator transformador de crescimento β
BMP-2- proteína morfogenética óssea 2
BMP-4- Proteína morfogenética óssea 4
BMP-7- proteína morfogenética 7
BMP-8b-proteína morfogenética 8b
BMP-15- proteína morfogenética 15
FSH- hormônio folículo estimulante
LH- hormônio luteinizante
GDF 9-fator de diferenciação 9
IGF 1 e 2- fatores de crescimento semelhantes a insulina
EGF- fator de crescimento epidermal
FGF- fator de crescimento fibroblástico
VFGF- fator de crescimento endotélio vascular
KGF- fator de crescimento de queratinócitos
VIP- ativina e pepitídeo do endotélio vascular
pH-potencial de hidrogênio
ROS- espécie reativa de oxigênio
H₂DCFDA- 2'-7'-diclorodihidrofluorescência
DCFH₂-diclorodihidrofluorescêina
DCF- diclorofluoresceina
ATP- adenosina trifosfato
AIF- fator indutor de apoptose
 μ m/ml- microlitros por mililitros
ng/ml- nanogramas por mililitro
mM- milimolar
PBS- tampão fosfato salino
Na⁺-cloreto de sódio
K⁺-potássio

Cl⁻ -cloro

RNAm- ácido ribonucléico mensageiro

IP- iodeto de propídeo

PAS- Ácido Periódico de Schiff

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Ovogênese	17
3.2 Foliculogênese	18
3.3 Moifopa	22
3.4 Desafios do transporte de ovários.....	24
3.5 Processos de injúria celular e formas de identificação	26
3.6 Cultivo <i>in vitro</i>	28
3.7 Biotecnias e trabalhos com fetos bovinos.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Reagentes Químicos e Meios	32
4.2 Coleta do material.....	32
4.3 Experimento 1- Efeito da temperatura.....	32
4.4 Experimento 2- Efeito do tempo de transporte.....	33
4.5 Análise Histológica	33
4.6 Análise de Microscopia Confocal	34
4.7 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Experimento	37
5.2 Experimento 2	41
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução são ferramentas indispensáveis para diversos programas de seleção e melhoramento genético além de propiciarem a preservação da fertilidade em mulheres. O potencial reprodutivo das fêmeas não é totalmente explorado, mesmo em técnicas de transferência de embriões e produção *in vitro*, pois a grande maioria dos gametas femininos permanece inclusa em folículos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 2007; AMORIM et al., 2009). Para compensar tal problema, desenvolveu-se uma biotécnica que consiste na manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA).

Esta técnica consiste em captar ovários de fêmeas das diversas espécies de animais domésticos, ou mesmo de animais selvagens e de mulheres, conservar esse material ou os fragmentos de tecido ovariano através de processo de congelamento e posteriormente cultivar estes folículos para a obtenção de uma população homogênea de ovócitos para serem fecundados *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2007).

No tocante a espécie bovina a aplicação da MOIFOPA pode ser realizada tanto em ovários de vacas quanto em ovários obtidos ainda de fetos, o que abre possibilidades não só para a PIVE propriamente dita, mas também proporciona uma redução no intervalo de gerações entre os rebanhos e fornece material em grande quantidade para o estudo da ovogênese e da folículogênese nesta espécie (FIGUEIREDO et al., 1994; CHOCHAN e HUNTER, 2004). Apesar desta grande perspectiva, a realização da técnica esbarra no fato de que geralmente os ovários utilizados para os estudos e experimentos de MOIFOPA são obtidos em abatedouros. A distância do abatedouro e a disponibilidade de manipulação imediata dos ovários coletados, podem representar entraves na execução de experimentos com folículos pré-antrais (LUCCI et al., 2004).

Assim, o teste com diferentes intervalos de tempo e temperatura do meio de transporte de ovários de fetos bovinos é importante para determinar a influência desses fatores na viabilidade do tecido ovariano do momento de sua coleta até a chegada no laboratório afim de determinar valores ideais de ambos os parâmetros para se obter folículos viáveis para posterior cultivo ou preservação.

Estudos anteriores, realizados em espécies diferentes demonstraram tal importância (bovinos: CELESTINO et al., 2007; ovinos: GONÇALVES et al., 2015; caninos: PEREIRA et al., 2015). A eficiência de meios de transporte como a solução salina 0,9% e o TCM 199, a incubação em diferentes tempos de transporte e temperaturas foi testada sobre a conservação de folículos pré-antrais de bovinos *in situ*, reportando que os folículos são melhor preservados 4°C em ambas as soluções e a 20°C por 4 a 12 horas em solução salina e meio TCM 199 respectivamente (CELESTINO et al., 2007).

Os parâmetros de temperatura e tempo de transporte podem ser espécie específicos, visto resultados observados em ovelhas: intervalo de transporte de 6 horas a 35°C (GONÇALVES et al., 2015) e em cadelas: folículos transportados a 4°C, tanto no estro quanto no diestro, se mostraram mais viáveis que aqueles transportados a 37°C (PEREIRA et al., 2015). Dentro de nosso conhecimento não existem estudos similares com ovários de fetos bovinos, que por sua já citada importância na pesquisa, faz-se necessário com a finalidade de preservar os folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Com este estudo objetivou-se estabelecer o intervalo de tempo e a temperatura do meio de transporte adequado para o transportede ovários de fetos bovinos por meio da avaliação morfológica dos folículos pré-antrais inclusos nesses ovários e a viabilidade do tecido ovariano após o transporte.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a morfologia e integridade de folículos pré-antrais de ovários de fetos bovinos transportados em diferentes intervalos de tempo e diferentes temperaturas.

Avaliar a viabilidade tecidual de fragmentos ovarianos transportados em diferentes intervalos de tempo e temperatura.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ovogênese

A ovogênese é definida como a sequência de processos que leva ao desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) de uma fêmea até a formação de um ovócito fecundado (RUSSE, 1983). Essas células derivam do mesoderma embrionário e migram a partir do endoderma do saco vitelínico para a região da crista gonadal por meio de movimentos amebóides ou por movimentos de tecidos adjacentes em desenvolvimento, sendo esse processo ainda discutido (FREEMAN, 2003; AERTS e BOLS, 2010). Este processo é orientado pelo contato entre receptores c-kit que estão presentes na superfície das células e o Kit-ligante expresso nas células somáticas que formam o substrato para a migração para a crista gonadal (FLEISCHMAN, 1993) sendo que tal processo ocorre entre o 20º e o 30º dia de gestação nos bovinos (GORDON, 1994). A proliferação e colonização dos ovários em desenvolvimento pelas CGPs são dependentes da ação de fatores como os membros da família do fator transformador de crescimento β (TGF β), proteína morfogenética óssea 4 (BMP 4), a BMP-8b e a BMP-2, que atuam na formação das CGPs, na regulação da expressão de genes e interação dos mesmos com as células somáticas que os circundam (YING et al., 2001; SÁNCHEZ e SMITZ, 2012). Ao chegarem às cristas, as CGPs perdem sua característica de mobilidade passam por processo de redistribuição de organelas citoplasmáticas e em seguida multiplicam-se por mitose. Estes processos originam dois tipos de células germinativas com funções diferentes, sendo que uma inicia de forma imediata uma segunda divisão mitótica, que dá origem a uma linha de ovogônias, enquanto a segunda permanece em interfase e divide-se periodicamente dando origem a células germinativas primordiais novas que darão origem a novas ovogônias posteriormente (HIRSHFIELD, 1991). As ovogônias que estão ligadas por pontes citoplasmáticas circundadas por células somáticas originárias dos mesonéfrons formam

aglomerados de células germinativas que encerram suas divisões mitóticas e iniciam as divisões meióticas entrando no estádio de prófase I. Este processo ocorre entre o 75 e 80 dias da fase embrionária nos bovinos e gera os ovócitos primários (GINSBURG, 1990; SADEU et al., 2006). Em seguida os ovócitos passam pelas fases seguintes da prófase I, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, sendo que esta fase ocorre entre o 75° e 80° dia da gestação e estacionam na fase de diplóteno, primeira parada da meiose, onde os cromossomos são descondensados e circundados por uma membrana nuclear que forma as vesículas germinativas (PICTON et al., 1998; SMITZ e CORTVRINDT, 2002). Os ovócitos permanecerão na fase de diplóteno da primeira divisão meiótica até que os folículos entrem em atresia ou que os folículos maduros recebam uma onda do hormônio luteinizante (LH) que faz com que o ovócito complete a meiose (BETTERIDGE et al., 1989).

Na puberdade, antes da ovulação com o pico do hormônio folículo estimulante (FSH) e do (LH), os ovócitos que terminaram seu crescimento retomam o processo de meiose, segunda divisão meiótica onde o núcleo do ovócito entra no estádio de diacinese, onde se dá início o processo de rompimento da vesícula germinal e ocorrem as fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, que é o momento em que ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do ovócito secundário onde seu núcleo se encontra na segunda divisão da meiose (BITTERIDGE et al., 1989). O ovócito permanecerá nesta fase até que seja fecundado por um espermatozoide, quando completará a meiose onde ele passará pelos estádios de anáfase II e telófase II e expulsará o segundo corpúsculo polar formando um ovócito haplóide fecundado (MOORE e PERSAUD, 1994).

3.2 Foliculogênese

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular que se inicia com a formação do folículo primordial e terminando com a formação do folículo

maturado, também chamado de folículo de Graaf ou folículo pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981). A função do folículo é fornecer um ambiente favorável para a manutenção e a viabilidade do ovócito, além de proporcionar o crescimento e a maturação ovocitária (SAUMANDE, 1981). A foliculogênese se inicia de maneira simultânea a ovogênese, no momento quando o ovócito está entre os estádios de prófase I e de metáfase II e os aglomerados de células germinativas se desfazem e iniciam o processo de formação dos folículos, sendo que o início da ovogênese antecede o começo da foliculogênese e se conclui quando ocorre a ovulação com posterior fecundação (PEPLING, 2006; FIGUEIREDO et al., 2008). Nos bovinos ao redor do 130° dia de gestação ocorre o envolvimento de um ovócito primário, que apresenta seu núcleo em prófase I, por uma camada de células somáticas planas ou achatadas conhecidas como células da pré-granulosa que se originam do mesoderma. Após a formação dos folículos primordiais ocorre a parada da multiplicação das células da pré-granulosa e a entrada dos mesmos em quiescência, sendo que a proliferação celular volta a ocorrer quando um folículo primordial começa a crescer, processo que pode levar dias, meses ou anos após sua formação para gerar os folículos primários, secundários e terciários (HIRSHFIELD, 1991). Os folículos pré-antrais são classificados em folículos primordiais, folículos intermediários ou de transição, folículos primários e folículos secundários, enquanto os folículos antrais englobam os folículos terciários e os pré-ovulatórios ou folículos de Graaf (SAUMANDE, 1991). Os folículos pré-antrais não são totalmente dependentes das gonadotrofinas FSH e LH para se desenvolverem, pois, seu crescimento é estimulado por fatores intraovarianos e locais. Os folículos antrais em contrapartida, são dependentes da ação das gonadotrofinas para seu desenvolvimento e maturação (MAGALHÃES et al., 2012). Os folículos primordiais, primários e secundários aparecem no ovário fetal com aproximadamente 90, 140 e 210 dias de gestação, respectivamente. A ativação do crescimento folicular se dá quando ocorre a formação de uma

camada completa de 11 a 20 células cúbicas da granulosa ao redor do início da formação de zona pelúcida (LIMA-VERDE et al., 2011).

Os folículos primordiais possuem diâmetro de aproximadamente 36 micrômetros, constituídos por um ovócito de formato esférico sem zona pelúcida e rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas que compõe a reserva ovariana (HIRSHFIELD, 1991; KACINSKIS et al., 2005). Em um determinado momento, onde o ovócito está circundado tanto por células da granulosa de formato pavimentoso, quanto de formato cúbico, recebe o nome de folículo intermediário ou transição. Esses possuem diâmetro aproximado de 42 micrômetros (BEZERRA et al., 1998). Os folículos primários apresentam diâmetro de 50 micrômetros, apresentando formato esférico e uma camada de células cúbicas e início da formação da zona pelúcida. Os folículos secundários apresentam diâmetro de 88 micrômetros (HIRSHFIELD, 1991; KACINSKIS et al., 2005) sendo circundados por duas ou mais camadas de células cúbicas da granulosa, formação de grânulos corticais no interior do citoplasma ovocitário, início da síntese de RNA e capacidade de resposta ao FSH e ao LH da teca externa e interna e lâmina basal e aumento do número de camadas das células da granulosa (FAIR et al., 1997a; FAIR et al., 1997b; FAIR, 2003; LIMA-VERDE et al., 2011). Após a etapa de crescimento e organização das células cúbicas em camadas, ocorre a formação de uma cavidade preenchida por líquido, o antro. Neste estádio o folículo passa a ser denominado de folículo terciário, atingindo 400 micrômetros de diâmetro (LEITÃO, 2009; SARAIVA, 2010). Os folículos antrais bem desenvolvidos apresentam células da granulosa diferenciadas em compartimentos de células do cumulus e murais que conferem ao ovócito a capacidade de retomar a meiose (Van den HURK e ZHAO, 2005; AERTS e BOLS, 2010; SÁNCHEZ e SMITZ, 2012). O fluido presente no antro tem como função servir de reservatório para substâncias regulatórias e de inibição oriundas do sangue ou de secreções das células do folículo como gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, proteoglicanos, enzimas e lipoproteínas. A produção do

fluido antral se torna mais intensa durante o desenvolvimento do folículo pelo aumento vascular do folículo e da permeabilidade dos vasos sanguíneos que acompanham o aumento do tamanho do folículo (Van den HURK e ZHAO, 2005).

O crescimento e desenvolvimento dos folículos primordiais para folículos ovulatórios envolve o processo de diferenciação e de proliferação das células foliculares, além do aumento do diâmetro do ovócito (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997). Este processo é resultado da ação de fatores inibitórios e estimulatórios sistêmicos e locais como o hormônio anti-mulleriano, que apresenta ação inibitória e da ativina A que tem efeito estimulatório e atuam na regulação da ativação de folículos primordiais para originarem folículos primários (LI et al., 1994; DURLINGER et al., 2002). A transição de folículo primário para secundário ocorre através da atuação de fatores parácrinos intraovarianos que são produzidos pelos ovócitos e por células da teca e da granulosa. Quando duas ou mais camadas de células da granulosa se desenvolvem os folículos secundários se formam, sendo que nesse estádio o ovócito entra em crescimento, suas células da granulosa adjacentes proliferam-se e ocorre o desenvolvimento da teca ao redor da granulosa a partir das células do estroma intersticial (ARAÚJO et al., 2014). O processo de crescimento ovocitário, término da maturação nuclear, fertilização e realização da clivagem celular, leva a um processo de reorganização citoplasmática e produção de novos genes e organelas que levam também a modificação e redistribuição das que já existiam (PICTON et al., 1998). Durante este processo os ovócitos secretam uma glicoproteína de membrana que originará a zona pelúcida. Esta forma uma camada de proteção ao redor do ovócito e é constituída por três glicoproteínas, a ZP1, a ZP2 e a ZP3, sendo que a expressão da ZP2 já ocorre em folículos primordiais. Em seguida ocorre a ligação das células da granulosa com o ovócito por meio da formação de junções gap que atravessam a zona pelúcida. Essas ligações são responsáveis por facilitar a comunicação bidirecional e permitir a transferência de

nutrientes, aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, fatores de crescimento e sinais de inibição e estimulação meiótica (PICTON et al., 1998)

3.3 Moifopa

A manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), é uma biotecnologia que consiste em isolar ou resgatar folículos pré-antrais. Estes poderão ser conservados, por processo de resfriamento ou congelação e pelo cultivo folicular com o objetivo de obter o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* dos mesmos (FIGUEIREDO et al., 2007). Esta biotecnologia tem sua importância no aprofundamento no conhecimento sobre a fase pré-antral dos folículos durante a foliculogênese, que em comparação a fase antral, ainda carece de estudos para o total entendimento dos processos de ativação e desenvolvimento folicular. Trabalhos com os folículos isolados do ambiente ovariano permitem que em laboratório tais estruturas sejam expostas a diversas substâncias como aminoácidos, carboidratos, hormônios e fatores de crescimento adicionadas ao meio de cultivo *in vitro* para a descoberta e entendimento de seu desenvolvimento. Dentre estas substâncias destacam-se o hormônio folículo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhante a insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2), kit ligand (KL), fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF) ativina e peptídeo endotélio vascular (VIP) (WANDJI et al., 1996; SILVA et al., 2004; GUTIERREZ et al., 2000; ZAMA et al., 2005; ANDRADE et al., 2005; NILSSON e SKINNER, 2003; LEE et al., 2004; VITT et al., 2000; FORTUNE, 2003; SKINER, 2005; YANG e FORTUNE, 2007; APA et al., 1997).

Com relação à reprodução aplicada, a MOIFOPA visa a produção de embriões em larga escala, por meio do isolamento dos folículos pré-antrais dos ovários antes que a maioria deles

(90%) se torne atresica, e seu posterior cultivo, até que os ovócitos atinjam estádios de desenvolvimento que permitam sua maturação (FIGUEIREDO et al., 2007). O isolamento de diversos folículos ovarianos pré-antrais de um único ovário e o cultivo *in vitro* dos ovócitos inclusos nos mesmos permitirá a multiplicação de animais de elevado valor genético, possibilitando a reprodução de animais que tenham morrido ou que apresentem patologias reprodutivas em tubas uterinas e útero ou daqueles que não respondam mais a protocolos de superovulação (FIGUEIREDO et al., 2007). Ainda no campo do melhoramento pode-se ainda obter a diminuição do intervalo entre gerações mediante o uso de ovários de animais jovens como fetos, recém-nascidos e de animais pré-púberes e a recuperação de espécies animais em via de extinção. Todos estes empregos possibilitados pelo uso deste material em outras biotecnias da reprodução como a transferência de embriões, a produção de embriões *in vitro* e a clonagem. O fornecimento dessa população ovocitária uniforme, proveniente de um mesmo animal, pode ser utilizada para padronizar as técnicas acima citadas e a transgenia, proporcionar material para o desenvolvimento de meios de cultivo eficazes para a maturação destes ovócitos e possibilitar o congelamento dos folículos, tanto isolados quanto inclusos no tecido ovariano para a formação de bancos de germoplasma animal para conservação dos ovócitos (FIGUEIREDO et al., 2008).

Para que todas essas possibilidades possam ser alcançadas, primeiramente é necessária a obtenção dos folículos possíveis por meio de técnicas de isolamento com o intuito de se obter o maior número possível de estruturas com o mínimo de danos em sua estrutura e assim a sobrevivência dos folículos (FIGUEIREDO et al., 2007; ROSSETO et al., 2011). Para isso existem tanto métodos mecânicos quanto métodos enzimáticos que podem ser utilizados em conjunto ou individualmente. O princípio desses métodos consiste na separação dos folículos dos demais elementos constituintes do tecido ovariano como fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina entre outros. Os procedimentos mecânicos basicamente utilizam como

equipamentos o tissue chopper, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes. Esses métodos tem a desvantagem de recuperar um número menor de folículos quando comparado ao enzimático, mas em contrapartida permitem que a membrana basal e as células da teca permaneçam mais integras. Com relação aos procedimentos enzimáticos os mais utilizados são as enzimas proteolíticas como a colagenase, a tripsina, a pronase e a DNase que tem como fundamento digerir o estroma e assim permitir a obtenção dos folículos. O método enzimático melhora a taxa de folículos recuperados, porém as células da teca e a membrana basal podem ser danificadas no processo e assim comprometer a estrutura e o crescimento *in vitro* do folículo (ROSSETTO et al., 2011), sendo que já foi utilizado para o isolamento dos folículos em animais de laboratório como camundongo, rato, hamster e coelho, em animais domésticos como fetos bovinos, gatos, ovinos e suíños e também em seres humanos (GREENWALD et al., 1989; CANDY et al., 1991; ROY et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 2008). métodos mecânicos já foram empregados em bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), bubalinos (SANTOS et al., 2006), caprinos (SARAIVA et al., 2010), ovinos (TAMILMANI et al., 2005), felinos (JEWGENOW, 1996), ratos (DANIEL et al., 1989), camundongos (CORTVRIND et al., 1996) e mulheres (ABIR et al., 1999), sendo a microdissecção (método que utiliza agulhas dissecantes) o que tem atingido melhores resultados pois além de manter a estrutura do folículo e de sua membrana basal, preserva os receptores de superfície e mantém a interação entre a teca, a granulosa e o ovócito após o isolamento, sendo ambas as técnicas eficientes para a recuperação de folículos.

3.4 Desafios do transporte de ovários

A manutenção da qualidade folicular durante seu transporte é muito importante para o sucesso da aplicação das técnicas relativa à MOIFOPA. A distância do local de coleta do ovário com o laboratório onde ocorrerá a manipulação dos folículos é um entrave para a técnica sendo

necessário que se determine parâmetros e métodos para uma estocagem ideal do material que se vai trabalhar (LUCCI et al., 2004). Além de ser muito difícil a manipulação dos ovócitos em um curto período de tempo, o que afeta a viabilidade antes do cultivo *in vitro* (CELESTINO et al., 2007) ovócitos imaturos são sensíveis ao ambiente e as condições em que são transportados sendo então de suma importância para a manutenção da viabilidade dos mesmos que estas sejam feitas de maneira adequada (WANG et al., 2011). Durante o transporte o suprimento sanguíneo dos ovários é cortado e assim os ovócitos inclusos nos folículos entram em condição isquêmica. Essa condição desenvolve diversas mudanças adversas aos folículos como baixa oxigenação, acúmulo de metabólitos, queda na concentração de glicose e aumento da taxa de apoptose das células da granulosa (WONGSRIKEAO et al., 2005; SAKAMOTO et al., 2006). Guibert et al (2011) reportaram que baixas temperaturas tem sido efetivas para a manutenção tecidual, pois a diminuição da temperatura do meio de transporte leva à diminuição do metabolismo que diminuem a ação de enzimas mitocondriais, reduz o acúmulo de ácido láctico e a diminuição do pH intracelular, a lise de proteínas e de gordura e a peroxidação lipídica associada a isquemia. Dentro do que já foi testado, a temperatura de transporte de 4°C tem sido efetiva para o armazenamento e a preservação de folículos pré-antrais de cabras e de ovelhas tanto em um período de 12 quanto de 24 horas (SILVA et al., 2000; CARVALHO et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; FERREIRA et al., 2001). Em bovinos a temperatura de 4°C foi efetiva para o transporte de ovários por até 18 horas e por 6 horas em 20°C sem apresentar taxas de degeneração e descolamento das células da granulosa que são indicativos de apoptose (LUCCI et al., 2004). Por estarem em estado de quiescência, os folículos primordiais são mais resistentes que os ativados ou em desenvolvimento ao processo de transporte, pois nestes o processo de ativação está em andamento e as diversas mudanças que estão acontecendo em suas células como proliferação das células da granulosa, mudança de formato, crescimento ovocitário e

proliferação de organelas citoplasmáticas tornam as células mais sensíveis as mudanças de ambiente (LUCCI et al., 2007).

3.5 Processos de injúria celular e formas de identificação

Dentre os fatores que podem determinar a viabilidade celular, além dos fatores externos previamente falados, também deve-se levar em consideração os fatores intrínsecos ao metabolismo celular, como a produção de espécies reativas de oxigênio, a apoptose e a necrose (SARAFIAN e BREDESEN, 1994; YANG et al., 1998). Segundo Sies (1991), o termo espécie reativa a oxigênio (ROS), descreve uma variedade de pequenas moléculas ativas resultantes do metabolismo do oxigênio molecular. O ROS participa de diversos processos celulares como a proliferação celular, adaptação a processos de hipóxia celular e até no processo apoptótico (DRÖGE, 2003). Além disso, o ROS também está relacionado ao processo de manutenção ou re-estabelecimento da homeostase, atuando como mensageiros intracelulares secundários e moduladores de sinais de transdução (CHANDEL e SCHUMACKER, 2000). Ainda de acordo com esses autores, em condições fisiológicas os efeitos deletérios do ROS são minimizados por mecanismos de defesa antioxidante, que diminuem a produção de ROS prevenindo o seu acúmulo em excesso e atuando também no reparo de danos celulares que o mesmo possa causar. Quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores pró e antioxidativos ocorrerá um processo deletério chamado estresse oxidativo ou produção descontrolada de ROS.

O uso de corantes fluorescentes tem sido eficaz para monitorar e quantificar a geração de ROS em amostras biológicas (KOHEN E NYSKA, 2002; TARPEY e FRIDOVICH, 2001) sendo o 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) o mais utilizado (BRANDIT e KESTON, 1965). Este corante apresenta uma intensa fluorescência sob excitação com um comprimento de onda de 485-500 nanômetros e comprimento de onda de emissão de 515-530 nanômetros. Sua ação como corante ocorre ainda como H₂DCFDA, que é a forma lipofílica não fluorescente,

que se difunde e atravessa a membrana celular. Sob a ação de esterases intracelulares o corante desacetilata e forma o DCFH₂, que ainda não é fluorescente, dentro da célula. Nesse ponto o DCFH₂ reage com o ROS intracelular e produz o composto fluorescente DCF (CHEN et al., 2010).

A apoptose é um processo geneticamente programado da morfogênese e remodelamento dos órgãos que atua nas células individualmente. Este processo é mediado por proteínas da família Bcl-2 que inclui membros que promovem (Bax) e que inibem (Bcl-2, Bcl-xL) o processo. Quando ocorre uma mudança no equilíbrio entre estas proteínas, as Bcl-2 fazem com que a membrana mitocondrial se torne permeável e libere o citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF) no citoplasma (YANG et al., 1997). As proteínas Bcl-2 afetam a apoptose tanto por promoverem quanto inibirem a clivagem de caspases de execução. As caspases são proteases de cisteína que clivam suas proteínas de substrato especificamente sobre um resíduo de aspartato. Elas são expressas em uma forma de pró enzima inativa e são ativadas após a clivagem de resíduos específicos de aspartato. A ativação das caspases de execução leva a uma progressão irreversível da cascata de apoptose. Este processo culmina com a desestabilização da membrana celular, que se torna levemente permeável, e com a clivagem do DNA internucleosomal e a condensação nuclear. Necrose é um processo passivo de células contíguas afetadas por isquemia e trauma nocivo. A membrana plasmática de células necróticas é permeável a macromoléculas e o DNA é degradado de uma maneira não seletiva. Independente do dano celular o processo de apoptose é seguido por um processo de necrose (ALLEN et al., 1997; JÜRGENSESMEIER et al., 1998).

Estes processos podem ser diferenciados mediante o uso dos corantes YO-PRO 1 e iodeto de propídeo. O corante YO-PRO 1, uma probe verde fluorescente que apresenta comprimento de onda excitatório de 491 nanômetros e pico de emissão de 509 nanômetros, que pode entrar nas células desde que sua membrana plasmática tenha atingido um certo grau de

permeabilidade. A membrana plasmática se torna levemente permeável durante o processo de apoptose e o YO PRO 1 consegue entrar livremente na célula e se ligar aos seus ácidos nucleicos aumentando grandemente a intensidade de sua fluorescência (IDZIOREK et al., 1995).

O iodeto de propídeo é um corante que se liga a nucleotídeos, sendo que ele marca de forma brilhante o núcleo da maioria das células. Por se ligar ao par de nucleotídeos guanina e citocina, ele cora não somente o DNA nuclear, mas também o RNA do citoplasma. O pico de seu comprimento de onda excitatória é de 536 nanômetros e o pico de emissão é de 620 nanômetros sendo que secções de tecido celular expostas a emissão de laser azul a 536 nanômetros se coram com vermelho fluorescente. Este corante só consegue atravessar a membrana de células necróticas e não consegue atravessar aquelas em apoptose. Ambos os corantes são incapazes de atravessar a membrana de células viáveis (ZAMPOLLA et al., 2008).

3.6 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais visa o desenvolvimento folicular pelo crescimento, maturação dos ovócitos, a multiplicação e diferenciação das células da granulosa. Para isso, o sistema de cultivo deve preservar a viabilidade dos folículos, sua morfologia e proporcionar seu crescimento e sua maturação (THOMAS et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2008). Sendo assim, métodos diferentes de cultivo *in vitro* têm sido desenvolvidos para que todas essas etapas possam ser obtidas. (CHAVES et al., 2010). Tanto para bovinos quanto para outras espécies animais existem duas maneiras de cultivo *in vitro* de folículos. O cultivo com os folículos inclusos em fragmentos de tecido ovariano, chamado *in situ* ou isolados. Quando são cultivados de maneira isolada existem dois sistemas de cultivo que vem sendo utilizados. O cultivo bidimensional, onde os folículos ficam em contato com o substrato e o sistema tridimensional onde por meio da internalização do folículo no substrato, a morfologia esférica do mesmo é mantida intacta (ARAÚJO et al., 2014). No cultivo bidimensional a arquitetura

folicular não consegue se manter por conta da aderência e achatamento do folículo ao substrato em que se encontra, independente de que o mesmo seja o plástico da placa, ágar ou componentes da matriz extracelular como o colágeno, a fibronectina, a laminina, o matrigel ou monocamadas de células somáticas (DEMEESTERE et al., 2002; PANGAS et al., 2003; BASSO et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2008). O sistema tridimensional preserva a integridade da estrutura tecidual e permite que ocorra interação entre os folículos (ABIR et al., 2006), porém, apresenta limitação em relação ao fornecimento de nutrientes para a massa tecidual em desenvolvimento ou ação do estroma exercendo controle inibitório no começo do crescimento folicular (WANDJI et al., 1996). Outro fator que deve ser levado em consideração ao sistema a se utilizar é com relação a composição do meio de cultivo. As substâncias que serão utilizadas podem interferir na sobrevivência e crescimento folicular como antibióticos, tampões, substratos nutricionais como lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos, vitaminas, ácidos nucleicos, antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento. Portanto, o sistema de cultivo e a composição do meio podem variar de acordo com a classe e o tamanho do folículo e a espécie animal trabalhada (CHAVES et al., 2010).

O principal uso do cultivo de folículos isolados é dar condições de crescimento e desenvolvimento para ovócitos imaturos, e assim, entender os mecanismos de desenvolvimento ovocitário, diferenciação de células da granulosa e a regulação de fatores autócrinos e parácrinos da foliculogênese (THOMAS et al., 2003). Dentre os avanços e resultados obtidos de processos *in vitro* de cultivo dos folículos em animais doméstico e de laboratório tem-se o crescimento folicular em gatas (SONGSASEN et al., 2012) e cabras (MATTOS et al., 2011), a formação de antro em cadelas (SONGSASEM et al., 2012) e vacas (ARAÚJO et al., 2015), obtenção de embriões em ovelhas (ARUNAKUMARI et al., 2010), cabras (MAGALHÃES et al., 2011), porcas (WU et al., 2001) e búfala (GUPTA et al., 2008), o nascimento dos embriões em camundongas e ratas (WANG et al., 2011), desenvolvimento folicular e crescimento

ovocitário em éguas (HAAG et al., 2013), sobrevivência e crescimento folicular após criopreservação em humanos (AMORIN et al., 2009; KHOSRAVI et al., 2013).

3.7 Biotecnias e trabalhos com fetos bovinos

O Brasil é detentor de um bom nível técnico em relação as biotecnologias da reprodução e isso está diretamente relacionado ao desenvolvimento da pecuária nacional e consolidação do país como produtor de embriões e de tecnologia (VIEIRA, 2012). O grande intuito em desenvolver e aplicar as biotecnologias na bovinocultura, tanto de corte quanto de leite é o de melhorar os índices de produção animal, elevando os índices zootécnicos de produção de carne e leite, melhorando os índices de eficiência reprodutiva por meio do aumento do número de animais prenhes em um curto espaço de tempo e corrigindo problemas de falhas reprodutivas nos rebanhos como sucessivas repetições de ciclos estrais e longos intervalos de partos, selecionar animais superiores que transmitam características de interesse econômico e que os mesmos sejam mantidos animais nos rebanhos com a possibilidade de disseminação de seus genes para outros rebanhos, diminuir o intervalo entre as gerações animais e pesquisar e produzir animais com características produtivas modificadas através de transgênia que possam ser depois propagadas (VISINTIN et al., 2008; RODRIGUES e RODRIGUES, 2009; SARTORI et al., 2016).

Para que todas as biotecnologias acima citadas sejam plenamente aplicadas, é necessário que a fisiologia reprodutiva dos bovinos seja bem dominada e entendida. Uma fonte interessante de material para estudos fisiológicos são os ovários de fetos bovinos, que é uma fonte rica para obtenção de material para testes de formas de cultivo e incremento na área de fertilização *in vitro*, formação de bancos de germoplasma e diminuição no intervalo de gerações (BETTERIDGE et al., 1989; CHOCHAN e HUNTER, 2004). Dentre os estudos feitos com folículos obtidos de ovários de fetos bovinos destacam-se estudos de maturação, fertilização e

cultivo *in vitro* de ovócitos (CHOHAN e HUNTER, 2004; BASSO et al., 2007; YANG et al., 2008), formação e desenvolvimento folicular em fetos (TANAKA et al., 2001, CUSHMAM et al., 2002; MURANISHI et al., 2002; DINIZ et al., 2005; MONTEIRO et al., 2009; BURKHART et al., 2010), cultivo de tecido de ovários de fetos após criopreservação (MOUTTHAM et al., 2015), estudo de apoptose folicular (SANTOS et al., 2013), métodos de isolamento e recuperação de folículos pré-antais (CARAMBULA et al., 1998; CARAMBULA et al., 1999), isolamento e caracterização de folículos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 1993; HULSHOF et al., 1994).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes Químicos e Meios

Os reagentes químicos e os meios utilizados na execução deste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma.

4.2 Coleta do material

Foram coletados 40 ovários de fetos bovinos com idade entre 6 e 8 meses (REXROAD et al., 1974), em frigorífico situado no município de Uberlândia-MG. Os fetos tiveram a cavidade abdominal seccionada por uma incisão longitudinal para exposição e coleta de seus ovários, que em seguida foram lavados com álcool a 70% por imersão 10 segundos e lavados 2 vezes em meio MEM-HEPES suplementado com 100 μ g/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina e armazenados em 4 tubos contendo meio MEM-HEPES. Todas as análises foram realizadas no dia da coleta D0 e após o período de cultivo D7.

4.3 Experimento 1- Efeito da temperatura

Na 1^a etapa do experimento 20 ovários foram coletados e armazenados em diferentes temperaturas (4°C, 22°C, 33°C), determinados com base em outros trabalhos (LUCCI et al., 2004; CHAVES et al., 2008; WANG et al., 2011), formando assim os grupos G 4°C, G 22°C e G 33°C. Cada grupo recebeu 3 ovários. Os ovários do grupo denominado controle G C, foram fragmentados e imediatamente fixados após a coleta para análise histológica (4 fragmentos) e de microscopia confocal (8 fragmentos). Ao chegarem ao laboratório, os ovários foram imediatamente manuseados retirando fragmentos da córtex de cada ovário com aproximadamente 9 mm³ gerando 72 fragmentos. Desses, 36 fragmentos foram fixados após o transporte para posterior análises histológicas (12 fragmentos) e de microscopia confocal (24

fragmentos). Os outros 36 fragmentos foram cultivados em placa de 24 poços por 7 dias com troca parcial do meio a cada 2 dias. Em seguida, os fragmentos de cada tratamento foram distribuídos nas análises propostas.

O meio de cultivo foi composto por TCM 199 (Bicarbonato), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 1% BSA, 10 ng/ml insulina, 2,5 μ g/ml transferrina, 4 ng/ml selênio, 50 μ g/ml de ácido ascórbico e 100 μ g/ml de estreptomicina.

4.4 Experimento 2- Efeito do tempo de transporte

No 2º experimento 20 ovários foram coletados sendo armazenados em tubos com meio de transporte MEM-HEPES, com a melhor temperatura definida no primeiro experimento (4°C). Nesta etapa foram avaliados os efeitos do tempo de transporte dos ovários sobre a viabilidade e posterior ativação de folículos pré-antrais, onde 2 ovários foram fragmentados e imediatamente fixados após a coleta para análise histológica e de microscopia confocal (controle-G C), e outros grupos contaram com 18 ovários distribuídos em três tempos de transporte para início da fragmentação (4 horas, 10 horas e 16 horas), formando os grupos G 4hs, G 10hs, G 16hs. Em ambas as etapas os tubos foram armazenados em caixa de isopor onde através de um termômetro a temperatura foi constantemente monitorada até a manipulação. Os fragmentos dos grupos foram distribuídos para fixação ou cultivo como descrito no primeiro experimento.

4.5 Análise Histológica

Após a preparação histológica padrão (desidratação e emblocagem em parafina), as amostras foram totalmente seccionadas a 7 μ m de espessura colocadas em lâminas de vidro, e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina (ALVES et al., 2015).

As leituras das lâminas histológicas foram realizadas no microscópio óptico marca Olympus modelo CBA a um aumento de 40x. As seguintes variáveis foram avaliadas: a viabilidade folicular; classificação quanto ao estágio de desenvolvimento, classificação morfológica (folículos normais ou degenerados) conforme o número de folículos por fragmento; classificação quanto ao estágio de desenvolvimento (primordial: folículo com ovócito imaturo localizado no centro do folículo e rodeado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso; transição: folículo com crescimento ovocitário e multiplicação das células da granulosa com mudança morfológica de pavimentoso para cubóide; primário: folículo com ovócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide, secundário: folículo com ovócito imaturo rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide e presença de células da teca quando em estágio mais avançado), classificação morfológica onde folículos serão considerados normais ou degenerados conforme padrão descrito por Alves et al. (2015), e diâmetro folicular e ovocitário (estruturas normais) em cada estágio de desenvolvimento.

4.6 Análise de Microscopia Confocal

Os fragmentos destinados para análise de intensidade de fluorescência foram lavados em solução PBS com soro fetal bovino a 5% e colocados para corar ao abrigo da luz em solução com 1 µl/ml de 2'7'-dicitrōdihidrofluoresceina por 30 minutos, em seguida corados com 10 µM/ml YO PRO 01 durante 30 minutos, seguido de solução com 100 µg/ml de iodeto de propídeo, incubados por mais 15 minutos. Após este período foram fixados em paraformaldeído 4% durante 15 minutos e armazenados em PBS a 4°C ao abrigo da luz. Após esta etapa as amostras foram levadas para análise da intensidade de fluorescência (pixels) em diferentes profundidades teciduais com a utilização de microscópio LSM 710 ZEISS®.

A análise confocal avaliou as condições de viabilidade, apoptose e oxidação do tecido ovariano após os referidos tratamentos de diferentes temperaturas e períodos de transporte. O corante H₂DCFDA ($\lambda= 485\text{-}530$ nm) emite fluorescência que indica a intensidade de emissão de espécies reativas de oxigênio e detecção de processo oxidativo em células fagocíticas. Já a probe YO PRO 01 ($\lambda= 491\text{-}509$ nm) indica através da emissão da fluorescência a quantidade de células em processo de apoptose. Finalmente, o corante iodeto de propídio ($\lambda= 536\text{-}620$ nm) emite a fluorescência adquirida por células degeneradas. Esta análise foi realizada com três fragmentos de cada grupo, onde comprimento de onda para cada corante foi previamente programado e as secções foram realizadas em intervalos de 8 micrômetros com média de 10 secções em Z-Stack (FABBRI et al., 2014). As imagens salvas no programa Zen 2008[®] instalado ao microscópio traziam os dados numéricos da intensidade de fluorescência utilizados nas análises estatísticas.

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Os dados que não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram submetidos a transformação logarítmica. A intensidade de fluorescência das probes utilizadas (diclorofluoresceína, YO-PRO-1 e iodeto de propídeo) foram comparadas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallise. A proporção de folículos normais e a ativação folicular foram analisadas entre os tratamentos e dias de cultivo pelo teste do qui-quadrado. Os dados foram apresentados na forma de média (\pm erro padrão da média) e porcentagem e os resultados considerados significativos quando $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

O total de 1395 folículos pré-antrais foram avaliados em 62 secções histológicas de tecido ovariano de fetos bovinos. No D0, os folículos pré-antrais transportados a 4°C apresentaram viabilidade semelhante ($P > 0,05$) ao grupo controle (Tabela 1). Adicionalmente, este grupo apresentou a proporção de folículos viáveis superior ($P < 0,05$) aos folículos transportados em temperaturas mais elevadas. Após sete dias de cultivo (D7), todos os tratamentos apresentaram menor proporção ($P < 0,05$) de folículos normais comparado ao grupo controle e ao D0. No D7, o grupo transportado a 4°C apresentou maior proporção ($P < 0,05$) de folículos normais.

Tabela 1. Proporção de folículos pré-antrais normais inclusos em ovário de fetos bovinos submetidos a diferentes temperaturas de transporte

Porcentagem de folículos pré-antrais normais		
Controle	80,5 (161/200)	
Cultivo <i>in vitro</i>		
Temperatura	Dia 0	Dia 7
4°C	75,3 (150/199) ^{aA}	47,0 (94/200) ^{bA*}
22°C	64,0 (128/200) ^{aB*}	42,0 (84/200) ^{bAB*}
33°C	53,7 (107/199) ^{aC*}	34,0 (67/197) ^{bB*}

*Difere do controle ($P < 0,05$).

^{a,b}Difere entre os dias de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

^{A,B,C}Difere entre os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo ($P < 0,05$).

A proporção de folículos primordiais observada nos grupos 4°C e a 22°C foi semelhante ($P > 0,05$) ao controle no dia 0. Em contrapartida, a proporção de folículos primordiais foi menor ($P < 0,05$) em todos os grupos após o término do cultivo *in vitro* comparado ao controle e ao D0. O grupo de transporte 33°C não apresentou diferença ($P < 0,05$) na proporção de folículos primordiais entre o D0 e D7 (Tabela 2).

Tabela 2. Proporção de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento inclusos em ovários de fetos bovinos submetidos a diferentes temperaturas de transporte

	Primordial	Desenvolvimento		
Controle	76,4 (123/161)	23,6 (38/161)		
<i>Cultivo in vitro</i>				
	Dia 0	Dia 7		
Temperatura	Primordial	Desenvolvimento	Primordial	Desenvolvimento
4°C	84,0 (126/150) ^{aA}	16,0 (24/150)	62,7 (59/94) ^{bA*}	37,3 (35/94)
22°C	78,1 (100/128) ^{aA}	21,9 (28/128)	57,1 (48/84) ^{bA*}	42,9 (36/84)
33°C	65,4 (70/107) ^{ab*}	34,6 (37/107)	55,2 (37/67) ^{aA*}	44,8 (30/67)

*Diferença do controle ($P < 0,05$).

^{a,b}Dentro da mesma classe folicular e entre dias de cultivo ($P < 0,05$).

^{A,B}Diferença da mesma classe folicular e entre tratamentos ($P < 0,05$).

A emissão de espécies reativas de oxigênio após o D7 foi menor ($P < 0,05$) em todos os tratamentos comparados ao controle (Figura 1). Esta emissão foi semelhante ($P > 0,05$) entre os tecidos transportados a 4°C e 33°C.

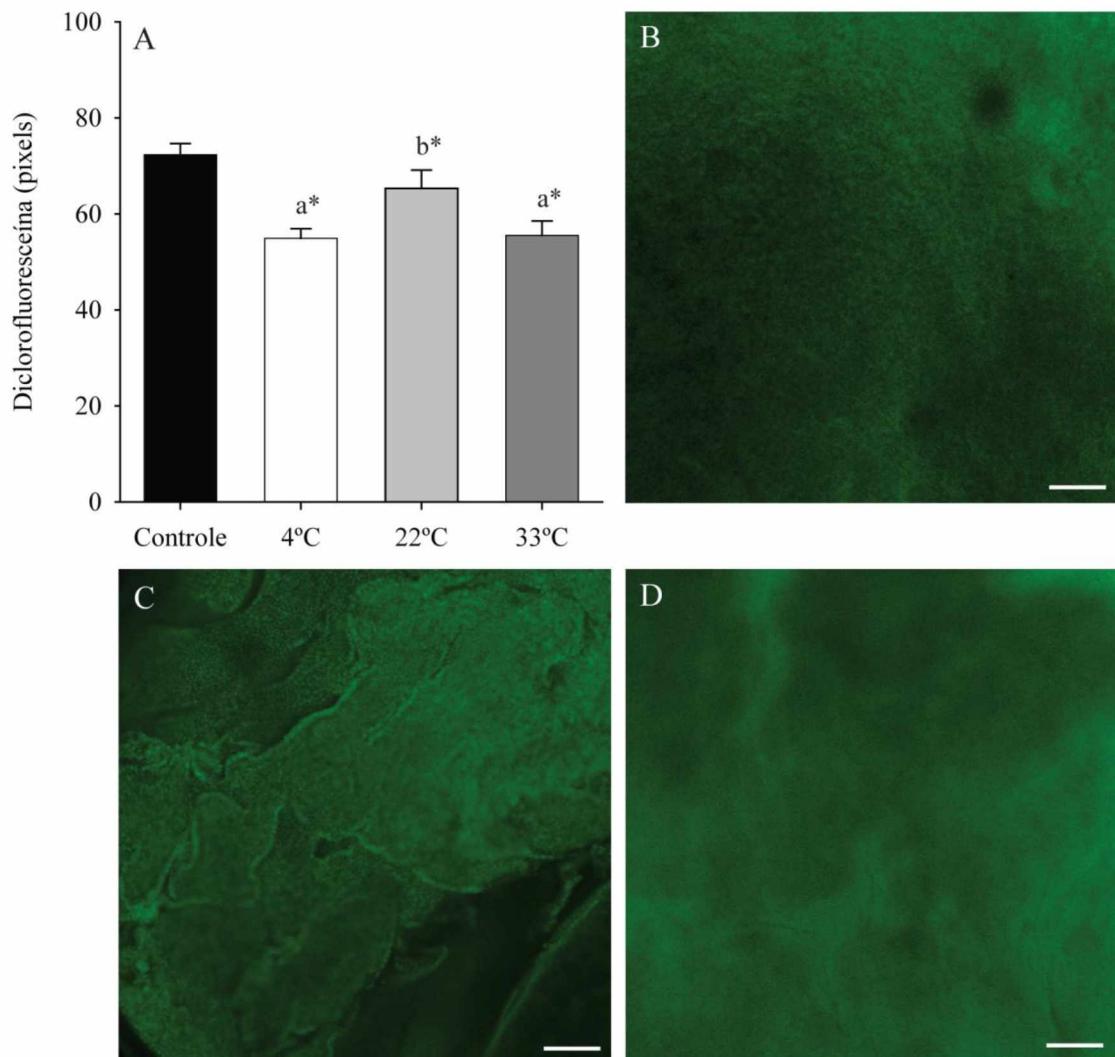


Figura 1. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo H₂DCFDA, em relação a diferentes temperaturas de transporte após 7 dias de cultivo; (B)- a 4°C; (C)- a 22°C; (D)- a 33°C. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). ^{a,b} indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Barra 100 μ m.

O índice de degeneração tecidual observado pela intensidade de fluorescência emitida pela probe iodeto de propídeo demonstrou que o grupo de fragmentos a 4°C foi semelhante ao controle ($P > 0,05$) e ao grupo de 22°C (Figura 2). O tratamento 33°C apresentou maior degeneração tecidual ($P < 0,05$) após 7 dias de cultivo.

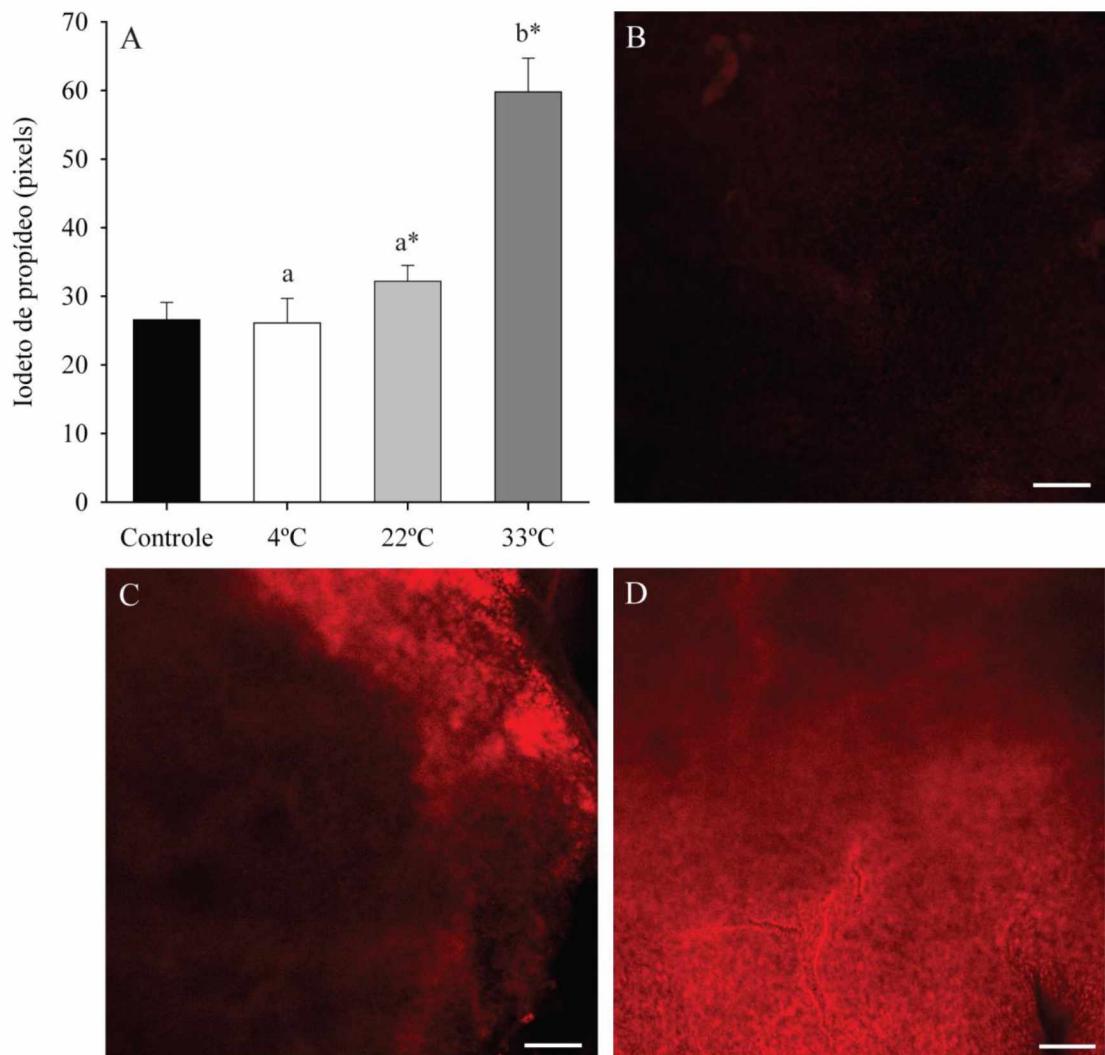


Figura 2. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo Iodeto de Propídeo, em relação a diferentes temperaturas de transporte após 7 dias de cultivo; (B) a 4°C; (C) a 22°C; (D) a 33°C. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). a,b indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Barra 100 μ m.

O grupo de fragmentos transportados a 33°C apresentou a menor ($P < 0,05$) taxa de células em apoptose (Figura 3). Adicionalmente, este grupo apresentou emissão semelhante ao controle ($P > 0,05$). Todos os grupos de tratamentos diferiram entre si ($P > 0,05$) e o grupo de 22°C apresentou a maior taxa de apoptose.

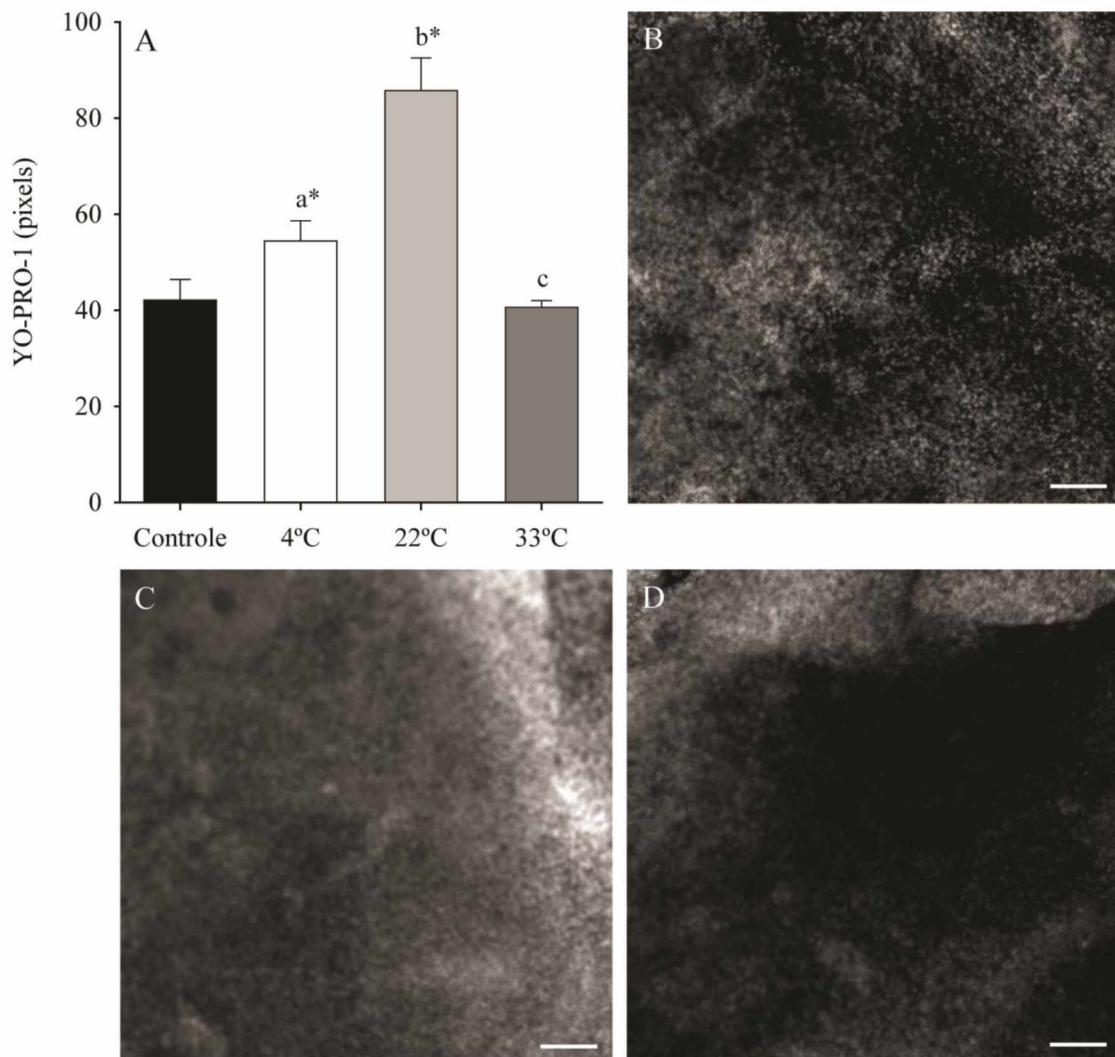


Figura 3. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo YOPRO 1, em relação a diferentes temperaturas de transporte após 7 dias de cultivo; (B) a 4°C; (C) a 22°C; (D) a 33°C. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). a,b indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Barra 100 μ m.

5.2 Experimento 2

O total de 1400 folículos pré-antrais foram avaliados em 69 secções histológicas de tecido ovariano de fetos bovinos. A proporção de folículos pré-antrais normais do grupo 4 hs foi semelhante ($P > 0,05$) aos grupos controle e ao 10hs (Tabela 3). Por outro lado, a viabilidade reduziu ($P < 0,05$) em todos os grupos após sete dias de cultivo comparado ao controle e ao D0. Ao final, todos os grupos apresentaram taxas de viabilidade semelhante ($P > 0,05$).

Tabela 3. Proporção de folículos pré-antrais normais inclusos em ovário de fetos bovinos submetidos a diferentes tempos de transporte

Porcentagem de folículos pré-antrais normais		
Controle	76,6 (153/200)	
<i>Cultivo in vitro</i>		
Tempo	Dia 0	Dia 7
4 hs	75,0 (150/200) ^{aA}	47,0 (94/200) ^{bA*}
10 hs	67,0 (134/200) ^{aB*}	44,5 (89/200) ^{bAB*}
16 hs	51,5 (103/200) ^{aC*}	39,0 (78/200) ^{bB*}

* Difere do controle ($P < 0,05$).

^{a,b}Difere entre os dias de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

^{A,B}Difere entre os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo ($P < 0,05$).

O grupo de transporte de 4hs apresentou taxas de folículos primordiais semelhante ($P > 0,05$) ao grupo controle (Tabela 4). Os grupos de 10hs e 16hs apresentaram menor proporção de folículos primordiais ($P < 0,05$) em relação ao controle e ao grupo de 4hs. Após sete dias de cultivo, todos os grupos apresentaram menor ($P < 0,05$) proporção de folículos primordiais, exceto o grupo 16hs.

Tabela 4. Proporção de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento inclusos em ovários de fetos bovinos submetidos a diferentes tempos de transporte

Primordial	Desenvolvimento
------------	-----------------

Controle	79,1 (121/153)	20,9 (32/153)		
<i>Cultivo in vitro</i>				
	Dia 0	Dia 7		
Tempo	Primordial	Desenvolvimento	Primordial	Desenvolvimento
4 hs	77,3 (116/150) ^{aA}	22,7 (34/150)	53,1 (50/94) ^{bA*}	46,9 (44/94)
10 hs	65,6 (88/134) ^{aB*}	34,4 (46/134)	48,3 (43/89) ^{bA*}	51,7 (46/89)
16 hs	58,2 (60/103) ^{aB*}	41,8 (43/103)	50,0 (39/78) ^{aA*}	50,0 (39/78)

*Diferença do controle ($P < 0,05$).

^{a,b}Dentro da mesma classe folicular e entre dias de cultivo ($P < 0,05$).

^{A,B}Diferença da mesma classe folicular e entre tratamentos ($P < 0,05$).

O grupo de fragmentos transportados a 4 horas apresentou níveis de ROS semelhante ($P > 0,05$) ao grupo controle e menor ($P < 0,05$) grupo transportado por 10 e 16 horas (Figura 4). Esta emissão nos grupos 10 e 16 horas foi maior do que o grupo controle ($P < 0,05$) e semelhante entre si ($P > 0,05$).

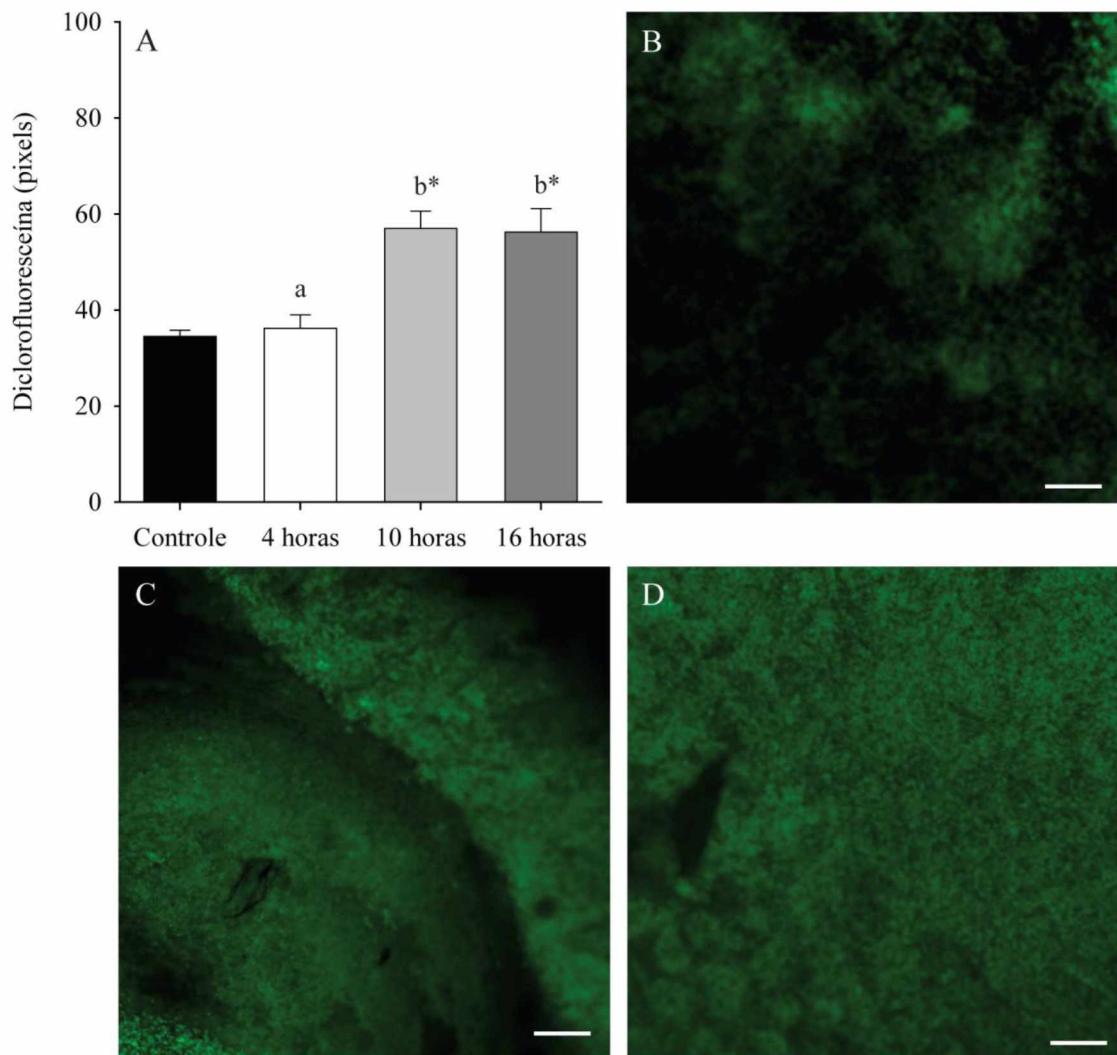


Figura 4. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo corante H₂DCFDA, em relação a diferentes tempos de transporte após 7 dias de cultivo; (B) 4hs; (C) 10hs; (D) 16hs. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). a,b Indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Barra 100 μ m.

Todos os grupos apresentaram maior ($P < 0,05$) intensidade de fluorescência relativa ao iodeto de propídeo quando comparados ao controle (Figura 5). Adicionalmente, o grupo 16hs apresentou maior degeneração tecidual ($P > 0,05$) em relação aos demais.

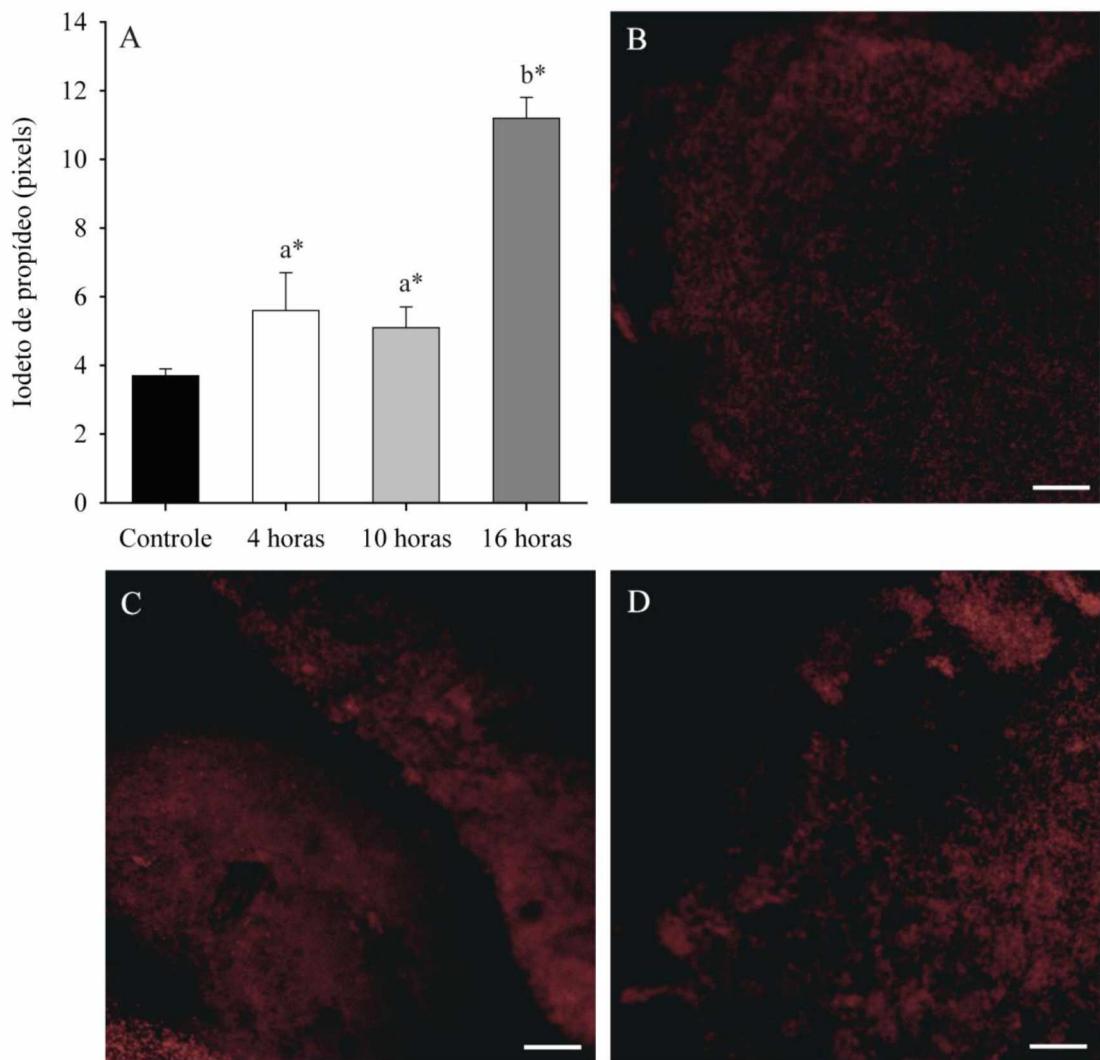


Figura 5. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo Iodeto de Propídeo, em relação a diferentes tempos de transporte após 7 dias de cultivo *in vitro*; (B) 4hs; (C) 10hs; (D) 16hs. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). a,b Indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). Barra 100 μ m.

Os níveis de fluorescência relativos ao índice de células em apoptose, foram semelhantes ($P > 0,05$) entre o grupos controle 10hs (Figura 6). A taxa de apoptose após 4 horas de transporte foi inferior ($P < 0,05$).

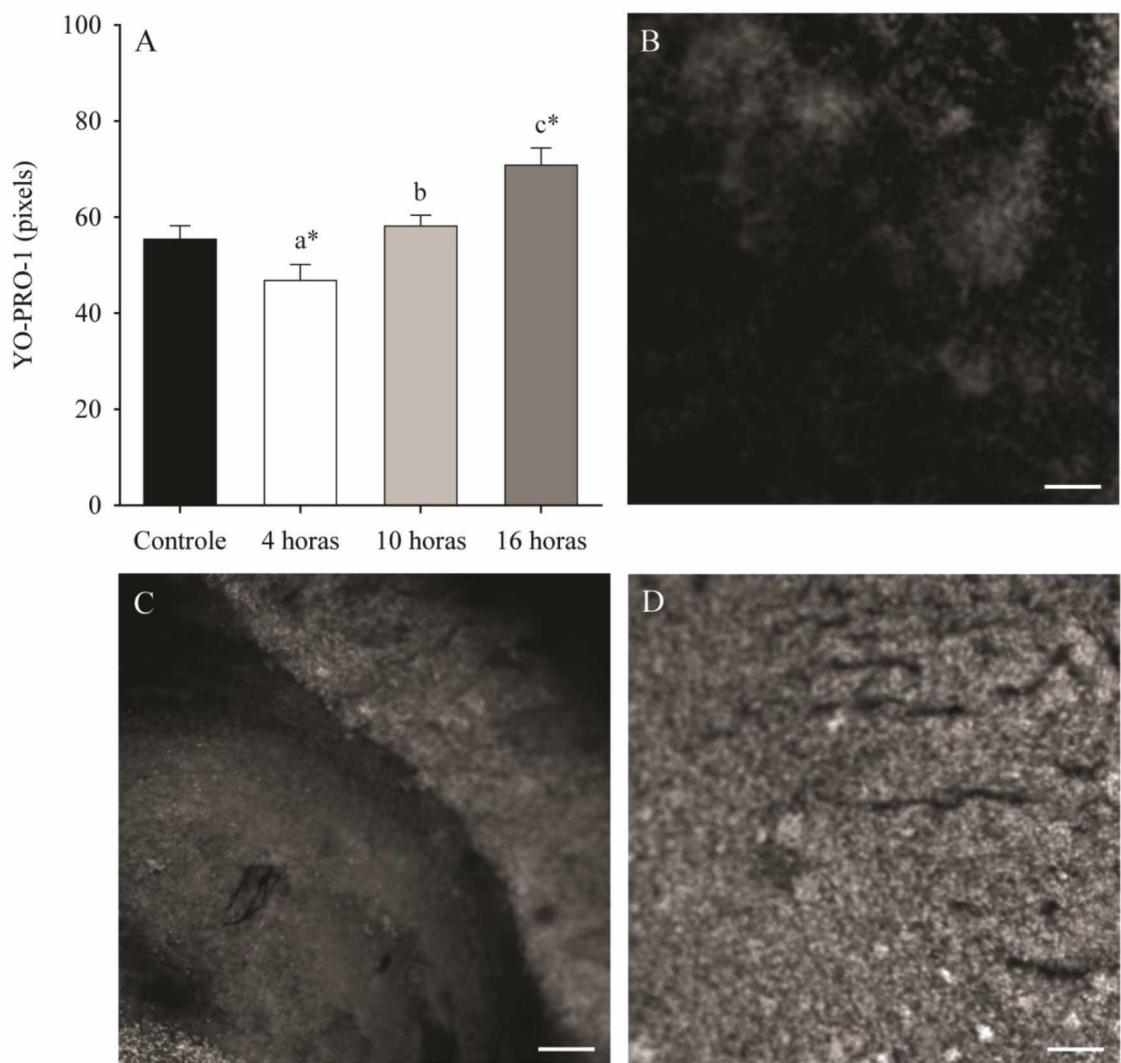


Figura 6. (A)-Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano de feto bovino corado pelo YOPRO 1, em relação a diferentes tempos de transporte após 7 dias de cultivo; (B) tecido transportado durante 4hs; (C) tecido transportado durante 10hs; (D) tecido transportado durante 16hs. * Indica diferença com relação ao controle ($P < 0,05$). ^{a,b} indica diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$); Barra 100 μ m.

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a temperatura e o tempo de transporte influenciam a viabilidade tecidual e de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de fetos bovinos.

A temperatura de 4°C no D0 propiciou taxa de viabilidade folicular semelhante ao controle e superior aos grupos transportados em temperaturas mais elevadas. Estudos anteriores observaram que a temperatura de 4°C foi benéfica para viabilidade de folículos pré-antrais de cabras e de bovinos adultos (CARVALHO et al., 2001; LUCCI et al., 2004). As baixas temperaturas, promovem a redução das taxas de metabolismo celular e consequente menor exigência metabólica, de modo que há um consumo equilibrado das reservas energéticas dos folículos e do meio de transporte. Desta forma, a resistência dos folículos mediante a ausência de nutrientes e de oxigênio foi incrementada (WANG et al., 2011).

Após sete dias de cultivo (D7), todos os tratamentos apresentaram menor proporção de folículos normais comparado ao grupo controle e ao D0. A viabilidade celular reduz após período de cultivo *in vitro*, pois as condições laboratoriais ainda não correspondem fidedignamente ao ambiente *in vivo*. Na comparação entre os grupos, o grupo transportado a 4°C apresentou maior proporção de folículos normais. A maior temperatura de transporte estimulou o metabolismo e a exigência nutricional dos folículos acima da capacidade que o meio permitia sustentar (WONGSRIKEAO et al., 2005). A temperatura de 4°C proporcionou uma condição metabólica mais favorável para os folículos durante o transporte e estes se mostraram mais aptos para sobreviver ao processo de cultivo (CHAVES et al., 2008).

O processo de ativação folicular foi observada após 7 dias de cultivo *in vitro* para os grupos de 4°C e 22°C. Porém, o grupo transporte a 33°C não apresentou alteração na proporção de folículos primordiais entre o D0 e o final do período de cultivo. A ausência da ativação folicular pode estar associada ao baixo nível de oxigênio, a temperatura de armazenamento próxima do limite fisiológico e ao aumento do metabolismo durante o período de cultivo, o que

leva ao consumo maior de nutrientes e a uma taxa maior de degeneração folicular (TAS et al., 2006). A ativação celular em cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, possivelmente se deve a liberação de fatores estimulatórios ou devido a interrupção na produção de fatores inibitórios presentes no estroma, na granulosa ou em células pré-tecais (McCAFERRY et al., 2000). Além disso a queda desses fatores associado a presença de fatores estimulantes no meio de cultivo como a insulina, e fatores estimulatórios como a BMP-7, Kit-ligant, GDF-9 e FDF-2 contribuem para a sua ativação (KEZELE et al., 2002; FORTUNE, 2004; Van den HURK e ZHAO, 2005).

Os fragmentos ovarianos transportados por um período de 4 horas demonstraram maior proporção de folículos pré-antrais normais em relação ao transportados por 16 horas. Adicionalmente, após sete dias, todos os grupos de fragmentos cultivados apresentaram taxas de viabilidade semelhantes. Em longos períodos de armazenamento onde se apresenta isquemia, há um rápido esgotamento das reservas energéticas, o que resulta em acidificação do meio e prejudica a viabilidade celular. Buja (2005) descreve que mudanças na permeabilidade da membrana celular, induzidas pela isquemia, causam mudanças intracelulares de NA^+ , K^+ e Cl^- que associadas a mudanças da distribuição do Ca^{2+} e o aumento da presença de água intracelular, pode levar ao aumento do volume celular e consequentemente a degeneração tecidual. Quanto mais tempo os ovários permaneceram consumindo suas reservas metabólicas, do meio e privados de oxigênio, sua viabilidade apresenta decréscimo quando comparados ao controle e ao tratamento com menor tempo de transporte e manipulação (WANG et al., 2011).

Após sete dias de cultivo a ativação folicular foi observada nos fragmentos transportados durante 4 e 10 horas. O transporte ovariano por longos períodos conduz a fragmentação do DNA ovocitário (WONKSRIKEO et al., 2005). A fragmentação do DNA pode interferir no processo de ativação nuclear pois dessa maneira não seria possível sintetizar o RNAm para o c-kit e suas proteínas responsáveis pela formação do Kit Ligand assim como o

RNAm para o Fator de Crescimento e Diferenciação-9 que são fatores de suma importância para a ativação folicular (BODENSTEINER et al., 1999; DONEDA et al., 2002; WANG et al., 2011). Adicionalmente, é sabido que em células apoptóticas os níveis de IGF-1 são baixos, sendo que em bovinos o mesmo pode ser importante durante a foliculogênese (GUTIEREZ et al., 1997; SCHANS et al., 1999).

O transporte dos ovários em temperatura mais elevada ou por um período mais longo resultou em um índice de degeneração tecidual mais elevado. Após a remoção dos ovários, a oclusão do aporte sanguíneo, a redução do suprimento de oxigênio e de reservas de energia do órgão aceleram o processo de necrose (WONGSRIKEO et al., 2005). Apesar dos folículos pré-antrais serem capazes de suportar pequenos períodos de hipóxia e a glicólise possa sustentar sua viabilidade por um período de tempo, a presença de oxigênio é importante para assegurar a viabilidade celular. A deficiência de oxigênio pode levar a degeneração e a morte quando a temperatura de transporte se aproxima do fisiológico (BOLAND et al., 1994; SMITZ et al., 1996).

A emissão de espécies reativas de oxigênio, foi menor em todos os grupos de temperatura comparados ao controle. Este resultado pode estar associado a uma grande demanda de energia para a realização do processo de divisão celular, sendo que esse aumento na atividade metabólica é uma consequência do aumento da atividade mitocondrial, sendo a fosforilação mitocondrial oxidativa a maior fonte de produção de ATP nessa fase (LEESE, 1995; THOMPSON et al., 1996).

O grupo de folículos transportados a 33°C apresentou a menor taxa de células em apoptose. Este fato se relaciona aos achados encontrados na avaliação da degeneração tecidual, pois provavelmente a quantidade de células desse grupo já teria passado por essa etapa e já se encontraria em necrose que é um processo seguinte a apoptose (ALLEN et al., 1997; JÜRGENSMEIER et al., 1998). A apoptose, que é um processo de suicídio celular ativo em

todos os seres multicelulares, ocorre em tecidos que apresentam alterações em seu desenvolvimento ou respondendo a um estímulo fisiológico. Sua característica mais marcante é a condensação da cromatina e a clivagem do DNA levando a formação de corpos apoptóticos (TILLY, 1996). Em folículos pré-antrais as primeiras alterações do processo ocorrem no ovócito, mas a partir do momento que o folículo se desenvolve, este se torna mais resistente sendo que o processo passa a ocorrer primeiro nas células da granulosa (MORITA e TILLY, 1999).

Finalmente, estes parâmetros devem ser testados para cada espécie pois podem haver variações na conformação tecidual ovariana de cada uma e o melhor resultado para determinada espécie pode não se refletir em outra, especialmente se tratamos de tecido fetal.

7 CONCLUSÃO

Os resultados nos permitiram concluir que: 1) a temperatura de 4°C é a melhor temperatura para transportar ovários de fetos bovinos garantindo melhor viabilidade folicular; 2) o melhor intervalo de tempo entre a coleta dos ovários de fetos bovinos material e sua manipulação é o de 4 horas; 3) as análises da intensidade de fluorescência refletiram os resultados da análise histológica e pode ser adotada como metodologia para avaliação imediata da viabilidade tecidual.

REFERÊNCIAS

- ABIR, R.; ROIZMAN, P.; FISCH, B. R. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. **Human Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 299–1301, 1999.
- ABIR, R.; NITKE, S.; BEM-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 26, p. 887-898, 2006.
- AERTS, J. M., BOLS, P. E. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 171-179, 2010.
- ALLEN, R. T.; HUNTER, W. J.; AGRAWAL, D. K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 37 p. 215-228, 1997.
- ALVES, K. A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F. F.; GASTAL, M. O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, p. 1048-1055, 2015.
- AMORIM, C. A.; Van LANGENDONCKT, A.; DAVID, A.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and *in vitro* culture in a calcium alginate matrix. **Human Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 92-99, 2009.
- ANDRADE, E.R.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; DODE, M.A. N. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 235–43, 2002.
- 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**, v. 64, p. 1104-1113, 2005.

APA, R.; LANZONE, A.; MASTRANDREA, M.; MICELI, F.; MACCHIONE, E.; FULGHESU, A. M.; CARUSO, A.; CANIPARI, R.; CARUSO, A.; CANIPARI, R. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and denuded rat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1074-1079, 1997.

ARAUJO, M. S.; GUASTALI, M. D.; VOLPATO, R.; LANDIM, F. C. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese á maturação *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 2373, 2014.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; WISCHRAL, A.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Long-term *in vitro* culture of bovine preantral follicles: Effect of base medium and medium replacement methods. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 23-31, 2015.

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

BASSO, A. C.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 134-143, 2007.

BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; OLIVEIRA, L. C. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, p. 30-41, 1998.

BRANDIT, R.; KESTON, A. S. Synthesis of diacetyl dichlorofluorescin: a stable reagent for fluorometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 6-9, 1965.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 165-171, 1997.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBING, R. B., XU, K. P.; KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.

BODENSTEINER, K. J.; CLAY, C. M.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Molecular cloning of the ovine GDF-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 381-386, 1999.

BOLAND, M. I. Characterization of follicular energy metabolism. **Human Reproduction**, v. 9, p. 604-609, 1994.

BUJA, L. M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. **Cardiovascular Pathology**, v. 14, p. 170-175, 2005.

BURKHART, M. N.; JUENGEL, J. L.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; GARVERICK, H. A. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 43-54, 2010.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAN, D. G. Effect of dibutyryl adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. **Journal of reproduction and Fertility**, v. 92, p. 197-207, 1991.

CARAMBULA, S. F.; GONÇALVES, P. B. D.; COSTA, L. F. S.; FIGUEIREDO, J. R.; NEVES, J. P.; MONDADORI, F. G. Períodos de digestão enzimática para o resgate de folículos pré-antrais em ovários de fetos bovinos, **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 659-663, 1998.

CARAMBULA, S. F.; GONÇALVES, P. B. D.; COSTA, L. F. S.; FIGUEIREDO, J. R.; HEELER, M. B.; NEVES, J. P.; MONDADORI, R. G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 52, p. 563-571, 1999.

CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C. M.; SILVA, J. R. V.; ANDRADE, E. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of Braun–Collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 195–208, 2001.

CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 591-599, 2007.

CHANDEL, N. S.; SCHUMACKER, P. T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 1880-1889, 2000.

CHAVES, R. N.; MARTINS, A. D. F. S.; SARAIVA, R. N. 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.; CAMPOLLO, C. C. SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 640–647, 2008.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n.1, p. 37-49, janiero-março, 2010.

CHEN, X., ZHONG, Z.; XU, Z; CHEN, L.; WANG, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofl uorescein as a fl uorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 587–604, 2010.

CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rate of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v. 61, p. 373-380, 2004.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; Van STEIRTEGHEM, A. *In vitro* maturation, fertilisation and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. **Human Reproduction**, v. 11, p. 2656–2666, 1996.

CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: A model for studies on the activation of primordial follicles. **Human Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 48-54, 2002.

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

DEMEETER, I.; DELBAERE, A.; GERVY, C.; Van den BERGH, M.; DEVREKE, F.; ENGLERT, Y. Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2152-2159, 2002.

DINIZ, E. G.; ESPER, C. R.; JACOMINI, J. O.; VIEIRA, R. C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 70-76, 2005.

DONEDA, L.; KLINGER, F. G.; LARRIZZA, L.; DeFELICI, M. KL/KIT co-expression in mouse fetal oocytes. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 46, p. 1015-1021, 2002.

DRÖGE, W. Oxidative stress and aging. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 543, p. 191-200, 2003.

DURLINGER, A. L. L., GRUIJTERS, M. J. G., KRAMMER, P., KARELS, B., INGRAHAM, H. A., NACHTIGAL, M. W., UILENBROEK, J. T. J., GROOTEGOED, J. A., THEMHEN, A. P. N. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 143, p. 1076–1084, 2002.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELLÁQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCHI, M.; MAGNANI, V.; PARADISO, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v. 101, p. 795-803, 2014.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. **Anatomy Embryology**, v. 195, p. 327-336, 1997a.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproductive Device**, v. 46, p. 208-215, 1997b.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproductive Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

FERREIRA, M. A. L.; BRASIL, A. F.; SILVA, J. R. V.; ANDRADE, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199, with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v. 55, p. 1607-1617, 2001.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; Van den HURK, R.; ECTORS, F. J.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. Development of a 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.

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

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 16, p. 303-327.

FLEISCHMAN, R. A.; From white spots to stem cells: the role of the kit receptor in mammalian development. **Trends in Genetics**, v. 9, p. 285-290, 1993.

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

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

FREEMAN, B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. **Reproduction**, v. 125, p. 635-643, 2003.

GINSBURG, M.; SNOW, M. H.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development**, v. 110, p. 521-528, 1990.

GONÇALVES, R. J. S.; CAVALCANTE, A. Y. P.; GOUVEIA, B. B.; LINS, T. L. B.; BARBERINO, R. S.; MENEZES, V. G.; BARROS, V. R. P.; MACEDO, T. J. S.; FIGUEIREDO, J. R.; MATOS, M. H. T. Lower apoptosis rate in ovarian preantral follicles from ovaries stored in supplemented preservation media. **Zygote**, p. 1-8, 2015.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **CABI International**, p. 640, 1994.

GREENWALD, G.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 561-571, 1989.

GUIBERT, E. E.; PETRENKO, A. Y.; BALABAN, C. L.; SOMOV, A. Y.; RODRIGUES, J. V.; FULLER, B. J. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. **Transfusion Medicine Hemotherapy**, v. 38, p. 125-142, 2011.

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

GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G.; CAMPBELL, B. K.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Insulin-like growth factor (IGF) I production and expression of IGFI and II by bovine granulosa and theca cells in vivo and *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series**, v. 66, p. 17:25, 1997.

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

HAAG, K. T.; PADILHA-MAGALHÃES, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**, v. 79, p. 911-917, 2013.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HULSHOF, S. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; Van den HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; De BELS, F.; AMEISEN, J. C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal of Immunology Methods**, v. 185, p. 249-258, 1995.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats-viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 183-193, 1996.

JÜRGENSMEIER, J. M.; XIE, Z.; DEVERAUX, Q.; ELLERBY, L.; BREDSEN, D.; REED, J. C. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 95, p. 4997-5002, 1998.

KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C. M.; LUQUE, M. C. A.; BÁO, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 45-57, 2005.

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

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v. 30, p. 620 – 650, 2002.

LEE, W. S.; YOON, S. J.; YOON, T. K.; CHA, K. Y.; LEE, S. K.; SHIMASAKI, S.; LEE, S.; LEE, K. A. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 159-163, 2004.

LEESE, H. J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. **Human Reproduction Update**, v. 1, p. 63–72, 1995.

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

LI, S., MARUO, T., LADINES-LLAVE, C. A., KONDO, H., MOCHIZUKI, M. Stage limited expression of myconcoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. **Journal of Endocrinology**, v. 41, p. 83-92, 1994.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETO, R.; FIGUEIRDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 472-482, 2011.

LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; RUMPF, R.; BÁO, S. N. Effects of lowered temperature and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 61, p. 461-472, 2004.

LUCCI, C. M.; SCHREIER, L. L.; MACHADO, G. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; DOBRINSKY, J. R. Effects of Storing Pig Ovaries at 4 or 20°C for Different Periods of Time on the Morphology and Viability of Pre-Antral Follicles. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 76-82, 2007.

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 PreAntral Follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 134-140, 2011.

MAGALHÃES, D. M.; SALES, E. T.; PADILHA, R. T.; SILVA, T. F. P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogênese in vivo e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 32-38, 2012.

MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA, R. M. P.; LIMA-VERDE, I. B.; SANTOS, K. D. B.; SARAIVA, M. V. A.; SILVA, J. R. V.; MARTINS, F. S.; CHAVES, R. N.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 404-411, 2011.

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.

MONTEIRO, C. M. R.; BIAGI, M. B.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, R. G.; NOGUEIRA, G. P. Desenvolvimento folicular em ovários de fetos zebuíños (*Bos taurus indicus*), **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p.185-191. 2009.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. Início do desenvolvimento humano. In: Moore KL, Persaud TVN. **Embriologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 13-38 1994.

MORITA, A. Y.; TILLY, J. L. Oocyte Apoptosis: Like Sand through and Hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, p. 1-17, 1999.

MOUTTHAM, L.; FORTUNE, J. E.; COMIZZOLI, P. Damage to fetal bovine ovarian tissue caused by cryoprotectant exposure and vitrification is mitigated during tissue culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 1239-1250, 2015.

MURANISHI, Y.; ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Changes in the number of preantral follicles and hormone concentrations in the bovine fetus. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 6, p. 553-560, 2002.

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

PANGAS, S. A.; SAUDYE, H.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. **Tissue Engineering**, v. 9, p. 1013-1021, 2003.

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

PEREIRA, L. M. C.; BERSANO, P. R. O.; LOPES, M. D. Influência da temperatura de transporte de ovários na maturação *in vitro* de oócitos caninos coletados em diferentes estágios do ciclo estral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 158-166, 2015.

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37, 1998.

REXROAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, L. E. Crown-Rump Length of Fetuses in Pubered holstein Friesian Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 346-347, 1974.

RODRIGUES, J. L.; RODRIGUES, B. A. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 428-436, 2009.

ROSSETTO, R.; LIMA, I. M. T.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDES, I. B.; SALES, E. T.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 15-23, 2011.

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

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.

SADEU, J. C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured freeze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, p. 1130-1141, 2006.

SAKAMOTO, A.; IWATA, H.; SATO, H.; HAYASHI, T.; KUWAYAMA, T.; MONJII, Y. Effect of modification of ovary preservation solution by adding glucose on the maturation and development of pig oocytes after prolonged storage. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 669-674, 2006.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Bophysica Acta**, p. 1896-1912, 2012.

SANTOS, S. S. D.; BIONDI, F. C.; CORDEIRO, M. S. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 1-15, 2006.

SANTOS, S. S. D.; FERREIRA, M. A. P.; SAMPAIO, R. V.; COSTA, N. N.; SANTOS, D. C. N.; SANTANA, P. P. B.; SÁ, A. L. A.; SILVA, B. B.; CORDEIRO, M. S.; SILVA, T. V. G.; MIRANDA, M. S.; OHASHI, O. M. Evaluation of apoptosis as a mechanism of follicular cell atresia in the ovaries of cattle (*bos indicus*) and buffalo (*bubalus bubalis*) fetuses. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 55-61, 2013.

SARAFIAN, T. A.; BREDESEN, D. E. Is apoptosis mediated by reactive oxigen species? **Free Radical Research**, v. 21, p. 1-8, 1994.

SARAIWA, M. V. A.; MATOS, M. H. T, FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 206-221, 2010.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANAS, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODES, M. A. N.; MONTEIRO, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300-312, 2016.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogènese. **Recueil de Medicine Veterinaire**, v. 157, p. 29-38, 1981.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; EINSPANIER, R.; AMSELGRUBER, W.M. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 279–285, 1999.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 31S – 38S, 1991.

SILVA, J. R. V.; LUCCI, C. M.; CARVALHO, F. C. A.; BÁO, S. N.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R. Effect of coconut water and Braun–Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Theriogenology**, v. 54, p. 809–22, 2000.

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

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Humane Reproduction Update**, v. 11, p. 461-471, 2005.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; STEIRTEGHEBM, C. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 466-475, 1996.

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

SONGSASEN, N.; COMIZZOLI, P.; NAGASHIMA, J.; FUJIHARA, M.; WILDT, D.E. The Domestic Dog and Cat as Models for Understanding the Regulation of Ovarian Follicle Development *In vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 13-18, 2012.

TAMILMANI, G.; RAO, B. S e VAGDEVI, R. Nuclear maturation of ovine oocytes from sheep preantral follicles cultured *in vitro*. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 295-305, 2005.

TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v. 121, p. 777-782, 2001.

TARPEY, M. M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. **Circulation Research**, v. 89, p. 224-236, 2001.

TAS, M.; EVECEM, M.; OZDAS, O. B.; CITIT, U.; DEMIR, K.; BIRLER, S.; PABUCCUOGLU, S. Effect of transport and storage temperature of ovaries on *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 30-34, 2006.

THOMAS, F. H.; WALTERS, K. A.; TELFER, E. E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 541-555, 2003.

THOMPSON, J. G.; PARTRIDGE, R. J.; HOUGHTON, F. D. COX, C. I.; LEESE, H. J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 299–306, 1996.

TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 162-172, 1996.

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.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Bovina: Generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL Clonagem e transgenia animal. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 139-144, 2008.

VITT, U. A.; McGEE, E. A.; HAVASHI, M.; HSUEH, A. J. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v. 141, p. 3814-3820, 2000.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. 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.

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

WANG, Y. S.; ZHAO, X.; SU, J. M.; AN, Z. X.; XIONG, X. R.; WANG, L. J.; LIU, J.; QUAN, F. S.; HUA, S.; ZHANG, Y. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, n. 124, p. 48-54, 2011.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N. W. K.; AGUNG, B.; NII, M., NAGAI, T. Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 87–97, 2005.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. *In vitro* Growth, Maturation, Fertilization and Embryonic Development of Oocytes from Porcine Preantral Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PENG, T. I.; JONES, D. P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, p. 1129–1132, 1997.

YANG, H. W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C, KIM, H. S.; CHOI, K. W.; OH, K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmentated embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-1002, 1998.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Vascular Endothelial Growth Factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 9, p. 1095-104, 2007.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth *In vitro* Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 1153-1161, 2008.

YING, Y., QI, X., ZHAO, G-Q.; Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n.14, p. 7858-7862, 2001.

ZAMA, A. M.; HUDSON, F. P.; BEDELL, M. A. Analysis of Hypomorphic KitlSl Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells. **Biology Reproduction**, v. 73, p. 639-47, 2005.

ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. **Cryo Letters**, v. 29, p. 463–75, 2008.