



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Adriel Behn de Brito

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de córtex ovarianos cultivados *in vitro* de macaca-prego (*Sapajus apella*)

Belém
2011

Adriel Behn de Brito

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de córtex ovarianos cultivados *in vitro* de macaca-prego (*Sapajus apella*)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sheyla Farhayldes Souza Domingues

Co-orientadora: Profa. Dra. Regiane Rodrigues dos Santos

Belém
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
BIBLIOTECA NÚCLEO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DESENVOLVIMENTO
RURAL / UFPA, BELÉM-PA**

Brito, Adriel Behn de

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de córtex ovarianos cultivados *in vitro* de macaca-prego (*Sapajus apella*) / Adriel Behn de Brito: orientadora, Sheyla Farhayldes Souza Domingues, Regiane Rodrigues dos Santos, Belém, PA, 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

1. Macaco-prego – Reprodução. I. Título

CDD – 22.ed. 636.982

Adriel Behn de Brito

Expressão gênica e viabilidade de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de córtex ovarianos cultivados *in vitro* de macaca-prego (*Sapajus apella*)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação: Belém - Pa ___/___/___

Banca Examinadora

Prof^ª Dr^ª Sheyla Farhayldes Souza Domingues
Faculdade de Medicina Veterinária - UFPA
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
Membro titular

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
Membro titular

Dedico este trabalho a minha mãe e ao meu pai, Anelita Behn de Brito e Valdenir Gonçalves de Brito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Dom da vida, pelas oportunidades e vitórias obtidas. Agradeço por sempre estar comigo, me orientando a tomar as decisões corretas e sempre me socorrer mesmo não tendo forças para pedir socorro.

À minha família, por ser o meu pilar de sustentação. Obrigado por sempre me apoiar quando eu necessitei. Agradeço a todos vocês: meus irmãos Vagner Helber e Helen; minha esposa Maria José, minha filha Adrielly; minha querida mãe e ao meu saudoso pai que não mediu esforço para ver os meus sonhos serem realizados.

Às minhas orientadoras Dr^a. Sheyla F. S. Domingues e Dr^a. Regiane Rodrigues dos Santos, que me deram a oportunidade de continuar na sua equipe de trabalho, pela orientação e paciência.

À biomédica Nathália, pela disposição e paciência em ensinar as técnicas de PCR em tempo real.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM), por conceder equipamentos e a todos os seus integrantes: Julianne, Stefânia, Dani, Luana, Carol Neves, Débora, Karol e Valéria, que me ajudaram na execução desse trabalho.

A toda equipe do Centro nacional de Primatas (CENP), por disponibilizar infraestrutura adequada, espaço e apoio para execução desse experimento. Agradeço em especial aos tratadores Obadias, Léo, Rosivaldo, Seu Miguel, Seu Paulo X e à Dona Rosa, pelo auxílio na execução dos projetos; ao Seu Osvaldo, Alessandra, Seu Alfredo, Bosco e Sarah, pelo ajuda no laboratório; ao Dr. Muniz pela agilidade em resolver os problemas; ao Dr. Paulo Castro pelo apoio no manejo e a Dona Laura, pelo apoio dado sempre que foi preciso.

Ao Laboratório de Fecundação *in vitro* (Lab Fiv) da UFPA, por conceder espaço e material necessário e pela confiança em fazer parte da equipe. Ao Prof. Ohashi pela permissão em executar parte meu experimento no laboratório e pelos ensinamentos científicos e ao professor Moysés, pela ajuda e disponibilidade em avaliar resultados muitas vezes incompressíveis. Aos integrantes do Lab Fiv: Nathália, Thiago, André, Davi, Priscilinha, Bruno, Marcela, Chamusca e Prof^a Simone, pela compreensão e paciência em dividir o espaço e os materiais de consumo, pelo ótimo convívio e amizade.

Aos coordenadores e técnicos do laboratório de medicina humana e médicas por disponibilizar os equipamentos para realização de PCR em tempo real.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela infraestrutura, equipe de professores e de funcionários, principalmente o secretário Rodrigo Virgolino pela sua paciência e ajuda sempre que foi necessária.

A todos aqueles que não citei, mas que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Sou grato eternamente a todos vocês!

“Aquele que maltrata os animais porque os tem em seu poder, é tão covarde quanto tirano.”

Ellen G. White

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi analisar a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais de *Sapajus apella*, submetidos a um sistema de cultivo *in vitro* em curto-prazo. Nesse sentido, dois experimentos foram realizados neste trabalho. **Experimento I:** exposição à fresco e à crioprotetores de biopsias de fragmentos do córtex ovariano. Ambos os fragmentos ovarianos foram submetidos à extração total de RNA e síntese de cDNA. Após a amplificação do cDNA por PCR em tempo-real (RT-PCR), os software GeNorm, bestkeeper e Normfinder foram usados para avaliar a estabilidade dos genes GAPDH (glyceraldehyde-2-phosphate dehydrogenase), HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) e TBP (TATA-binding protein). **Experimento II:** o tecido do córtex ovariano de quatro fêmeas foi coletado e dividido em nove pedaços de 1 mm³. Um fragmento ovariano (grupo controle) foi imediatamente dividido em dois pedaços, os quais foram destinados para análise da viabilidade ou por RT-PCR. Os 8 fragmentos restantes foram individualmente cultivados *in vitro* em um meio constituído de TCM suplementado com 100 ng/mL EGF (T1), com adição de 10 µM de BME (T2), 100 ng/mL de BMP4 (T3), 25 IU de PMSG (T4), 10 µM de BME e 100 ng/mL de BMP4 (T5), 10 µM de BME, 25 IU de PMSG (T6), 100 ng/mL de BMP4, 25 IU de PMSG (T7) ou 10 µM de BME, 100 ng/mL de BMP4, 25 IU de PMSG (T8). Os resultados demonstraram que no tecido do córtex ovariano de *S. apella*, os genes HPRT1 e TBP foram os mais apropriados como genes de referência, podendo ser usados como parâmetro para normalizar dados em estudos futuros. Ao contrário, o GAPDH se apresentou como menos estável dos genes de referencia testados. Após o cultivo *in vitro*, todos os tratamentos alcançaram percentuais similares da viabilidade de folículos pré-antrais. O tecido ovariano cultivado na presença de EGF+BME/BMP4/PMSG resultou no aumento da taxa de ativação e crescimento folicular, assim como no aumento da expressão de AMH, BMP15 e GDF9, genes conhecidos como indicadores específicos de desenvolvimento folicular. Dessa forma, o HPRT1 e TBP são os genes de referência mais estáveis, na exposição à crioprotetores, a fresco e no o cultivo de tecidos de córtex ovariano de *S. apella*. Os folículos pré-antrais são capazes de desenvolverem-se *in vitro* quando cultivados em meio suplementado com PMSG, BME e BMP4. A viabilidade folicular, entretanto, permaneceu independentemente do meio de cultivo *in vitro* e o uso de fatores de crescimento, como marcadores de desenvolvimento folicular, foi crucial para identificar o melhor meio de cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: GAPDH. HPRT1. TBP. qRT-PCR. Folículo Pré-antral. *S. apella*.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the stability of three reference genes in the ovarian tissue of capuchin monkeys (*Sapajus apella*) and to develop a short-term *in vitro* culture system for the activation and growth of preantral follicles from capuchin monkeys. To this end two experiments were conducted as follows. **Experiment I:** Fresh and cryoprotectant exposed ovarian biopsies were used. Both fresh and exposed ovarian tissues were subjected to total RNA extraction and synthesis of cDNA. After amplification of cDNA by real-time PCR, the GeNorm, Bestkeeper and Normfinder software were used to evaluate the stability of glyceraldehyde-2-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) and TATA-binding protein (TBP). **Experiment II:** Ovarian tissue from four healthy mature females were collected and divided into nine ovarian cortical pieces of 1 mm³. One ovarian fragment (control) was immediately divided in two pieces, which were subjected to viability analysis or qRT-PCR. The remaining 8 fragments were individually cultured *in vitro* in a medium consisting of TCM supplemented with 100 ng/mL EGF (T1), either or not added with 10 µM BME (T2), 100 ng/mL BMP4 (T3), 25 IU PMSG (T4), 10 µM BME and 100 ng/mL BMP4 (T5), 10 µM BME, 25 IU PMSG (T6), 100 ng/mL BMP4, 25 IU PMSG (T7) or 10 µM BME, 100 ng/mL BMP4, 25 IU PMSG (T8). Results demonstrated that, in the ovarian tissue from capuchin monkeys, HPRT1 and TBP were the most suitable reference genes and thus could be used as parameters to normalize data in future studies. In contrast, GAPDH appeared as the least stable gene among the tested reference genes. After *in vitro* culture, all treatments resulted in similar percentages of viable preantral follicles. Ovarian tissue cultured in the presence of EGF + BME/BMP4/PMSG resulted in an increased rate of follicular activation and growth, as well as in the up regulation of AMH, BMP15 and GDF9, specific markers of follicular development. In conclusion, HPRT1 and TBP are the most stable reference genes in fresh and cryoprotectant exposed ovarian tissue from capuchin monkeys. Preantral follicles are able to develop *in vitro* when cultured in a medium supplemented with PMSG, BME and BMP4. Follicular viability, however, was maintained independently on the culture medium. The use of growth factors as markers of follicular development was crucial to identify the best culture medium.

Key-words: GAPDH. HPRT1. TBP. qRT-PCR. Preantral Follicles. *S. apella*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 OVÁRIO DE MAMÍFEROS.....	12
3.2 FOLICULOGÊNESE.....	12
3.2.1 Classificação dos Folículos Ovarianos.....	12
3.2.2 Crescimento dos folículos.....	13
3.2.3 Dinâmica Folicular.....	17
3.2.4 População de folículos ovarianos de primatas.....	19
3.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI.....	20
3.4 A FÊMEA DE <i>Sapajus apella</i>	22
3.4.1 Taxonomia.....	22
3.4.2 Biologia.....	22
3.4.3 Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva.....	24
3.4.4 O que já foi realizado de moifopa em <i>Sapajus apella</i>.....	24
4 VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA O TECIDO OVARIANO DE MACACAS-PREGO (<i>Sapajus apella</i>).....	26
5 DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI DE MACACAS-PREGO (<i>Sapajus apella</i>): ESTUDO MORFOLÓGICO, MOLECULAR E VIABILIDADE.....	38
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Primatas neotropicais recebem atenção devido às suas similaridades filogenéticas com a espécie humana (ABEE, 2003; WOLF et al., 2004a; WOLF et al., 2004b), o que os tornam importantes modelos experimentais para pesquisas biomédicas (WRIGHT; BUSH, 1977). Além disso, consistem em um único modelo de estudo para algumas doenças que acometem os seres humanos como, por exemplo, a malária, tanto em terapias como em estratégias de prevenção (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006).

As espécies de primatas neotropicais brasileiras mais utilizadas como modelo biológico são *Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus* e *Sapajus apella* (denominado anteriormente de *Cebus apella*), porém ainda são pouco estudadas no Brasil, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de biotécnicas da reprodução que se apresentam como uma alternativa para a diminuição de animais disponíveis em cativeiro para fins experimentais (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006).

A espécie *Sapajus apella* será utilizada neste experimento por se destacar como a mais utilizada em pesquisas biomédicas, principalmente no que diz respeito a estudos relacionados à sua fisiologia reprodutiva (WRIGHT; JERNVALL; RAKOTONARINA, 1994; LINN et al., 1995; FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998; DOMINGUES, 2000) e pela facilidade de sua manutenção em cativeiro (DE LUCA et al., 1990; DOMINGUES, 2000; DOMINGUES, CALDAS-BUSSIÈRE, 2002; DOMINGUES et al., 2003).

Atualmente, visa-se obter oócitos competentes e aptos a serem utilizados em outras biotécnicas de reprodução assistida. Esses estudos buscam desenvolver um sistema ótimo de cultivo folicular que seja capaz de promover o crescimento dos folículos pré-antrais até a fase antral, tornando os oócitos aptos à maturação e à fecundação *in vitro*. Nesse intuito a biotécnica reprodutiva denominada Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA) já é empregada em seres humanos, animais de produção e animais de importância em pesquisas biomédicas e/ ou ameaçados de extinção (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006). No entanto em *S. apella* não foi encontrado nenhum trabalho com cultivo de folículos pré-antrais, sendo essa técnica uma possível alternativa para a obtenção de um grande número de oócitos de boa qualidade que poderão ser destinados para o desenvolvimento de biotécnicas de reprodução visando à produção *in vitro* de embriões de *Sapajus apella*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial, bem como recuperar folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs) de *Sapajus apella* antes da atresia e cultivá-los até que os mesmos possam ser ativados *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter ativação e crescimento de folículos pré-antrais de *S. apella* a partir do cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos.
- Estudar a fase inicial do desenvolvimento folicular em *S. apella*.
- Avaliar o efeito do β -mercaptoetanol (BME), da proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) e da gonadotrofina do soro de égua gestante (PMSG), sozinhos ou associados, sobre a ativação e crescimento de FOPAs de *S. apella in vitro*.
- Avaliar a expressão gênica em folículos ativados *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OVÁRIO DE MAMÍFEROS

O ovário é o órgão reprodutivo primário da fêmea e é constituído por vários tipos de células, incluindo oócito, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. No córtex ovariano estão os folículos em diferentes fases de desenvolvimento, corpos lúteo, corpo hemorrágico ou *corpo albicans*. Ele é coberto por epitélio cúbico simples. O estroma cortical é constituído por tecido conjuntivo frouxo. A túnica albugínea é uma espessa camada de tecido conjuntivo localizada abaixo do epitélio. A região medular está localizada na parte interna do ovário, e é constituída por tecido conjuntivo frouxo, fibras musculares lisas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (DELLMAN; BROWN, 1982).

3.2 FOLICULOGÊNESE

3.2.1 Classificação dos Folículos Ovarianos.

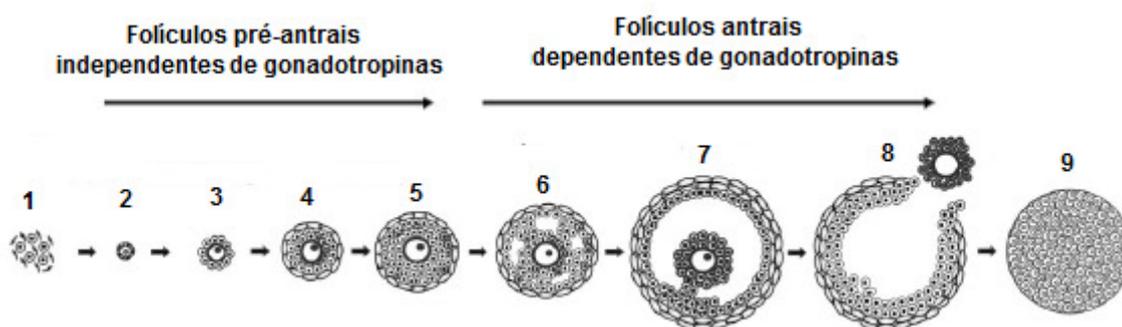
Os folículos ovarianos são considerados a unidade morfofuncional dos ovários, sendo constituídos por um oócito circundado por células somáticas e apresentando duas funções principais: a endócrina, responsável pela produção e liberação de moléculas sinalizadoras (hormônios esteroidais e peptídeos), e a exócrina ou gametogênica, responsável pela produção e liberação de oócitos (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002; FIGUEIREDO et al., 2008).

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1991) e de acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em folículos pré-antrais ou não-cavitários e folículos antrais ou cavitários. Segundo HULSHOF et al. (1994), os folículos pré-antrais incluem três tipos: 1) primordiais, que consistem de um oócito circundado por uma única camada de células da prégranulosa de forma pavimentosa; 2) primários, caracterizados pela presença de um oócito central, circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica; 3) secundários, constituídos por um oócito central, circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (Fig. 1). Em camundongos (LINTERNMOORE; MOORE, 1979), mulheres (GOUGEON; CHAINY, 1987), caprinos (BEZERRA; RONDINA; OLIVEIRA, 1998) e fêmeas de *S. apella* (DOMINGUES et al., 2004) relata-se que existe um folículo de transição entre o folículo primordial e o primário. Este folículo de transição apresenta células da pré-granulosa pavimentosas e células da granulosa cúbicas. A categoria de folículos antrais

compreende os folículos terciários e os folículos De Graaf, sendo este último o estágio final do desenvolvimento folicular (SAUMANDE, 1981).

Existem critérios funcionais para a classificação dos folículos baseados na sua dependência de gonadotrofinas. Desta forma, os folículos podem ser quiescentes (primordial), recrutados para crescer (pré-antrais e antrais), ovulatórios e atrésicos (FINDLAY et al., 2002). Independente da classificação dos folículos ovarianos, não se conhece o mecanismo que retira um folículo do estado quiescente. A hipótese mais aceita é a de que fatores locais seriam responsáveis pela ativação de um folículo do estado de quiescência (FORTUNE et al., 2000; FINDLAY et al., 2002).

Figura 01 – Classificação dos estágios da foliculogênese de mamíferos. (1) Cisto de células germinativas. Folículos pré-antrais dependentes de fatores de crescimento: (2) Folículo primordial; (3) Folículo primário; (4,5) Secundário. Folículos antrais dependentes de gonadotripinas: (6) Terciário; (7) Pré-ovulatório. (8) Ovulação. (9) Corpo lúteo.
Fonte modificada de EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009.



3.2.2 Crescimento dos folículos

No início da foliculogênese de mamíferos no geral, o folículo primordial, consiste do oócito (no estágio de diplóteno da meiose I ou vesícula germinativa, onde se observa a primeira interrupção da divisão meiótica) com uma camada de células da granulosa achatadas que estabelecerá um estoque de folículos primordiais, onde alguns começam a crescer e se diferenciam em vários estágios de desenvolvimento, enquanto outros permanecem quiescentes (Fig. 1) (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009), esses folículos através de fatores de crescimento, diferenciam-se em uma única camada de células da granulosa com núcleo redondo e citoplasma contendo filamentos intermediários de vimentina, associados com mudanças na forma das células da granulosa (plana para cúbicas) (Fig. 1), apresentando também uma intensa atividade mitótica, levando ao início

da proliferação e diferenciação tanto das células da granulosa quanto do próprio oócito (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; ERICKSON, 2001; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Os folículos primordiais representam um *pool* de reserva que dão origem a todos os folículos dominantes que poderão ser ou não selecionados para ovular. Neste sentido, os folículos primordiais são fundamentalmente as unidades reprodutivas do ovário (ERICKSON, 1986, FIGUEIREDO et al, 1997; FORTUNE et al., 2000; FINDLAY et al., 2002; FORTUNE, 2003; DOMINGUES et al., 2004). Desta forma, durante toda a vida da fêmea, muitos folículos primordiais são ativados para dar início à foliculogênese (GOUGEON, 1998; FORTUNE, 2003). No decorrer da vida da fêmea, os folículos primordiais que não estão crescendo compreendem 90 a 95% dos folículos ovarianos. Conseqüentemente, em dado momento, o número de folículos primordiais que entram no pool de folículos em crescimento é relativamente pequeno (ERICKSON, 1986, HIRSHFIELD, 1991, FIGUEIREDO et al., 1997; FINDLAY et al., 2002; FORTUNE, 2003).

Em fêmeas mamíferas como roedoras, ovinas, bovinas e bubalinas o contínuo crescimento folicular é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como por fatores de crescimento que agem direta ou indiretamente, de modo autócrino e/ou parácrino. Entretanto, os mecanismos precisos que controlam o início e a progressão do crescimento folicular ainda precisam ser mais profundamente estudados (MARTINS et al., 2008).

O primeiro sinal de crescimento é a retomada da proliferação das células pavimentosas da pré-granulosa. Os estádios posteriores de crescimento podem ser reconhecidos pelo aumento do tamanho do oócito e pelas mudanças no formato das células da granulosa (HIRSHFIELD, 1991; GOUGEON, 1998; DOMINGUES et al., 2004). Os volumes do citoplasma e núcleo do oócito aumentam drasticamente (LINTERN-MOORE; MOORE, 1979; GOUGEON; CHAYNY, 1998; DOMINGUES et al., 2004) e as células da granulosa, que, usualmente, possuem um formato pavimentoso no folículo quiescente, apresentam um formato cúbico quando estão se proliferando (ERICKSON, 1986; GOUGEON, 1998). Junções GAP estabelecem-se entre as células da granulosa e o oócito. Esta observação dá suporte ao conceito de que as células da granulosa e o oócito tornam-se elétrica e metabolicamente acoplados ainda no início da foliculogênese (ERICKSON, 1986; MATTTIOLI; BARBONI, 1998; NASHTA; WADDINGTON; CAMPBELL, 1998,

TAY; HODGMAN; RICHTER, 2000; WEHREND ; MEINECKE, 2001; BODART et al, 2002; RODRIGUEZ; FARIN, 2004; TEILMANN, 2005).

O oócito cresce rapidamente, atingindo seu tamanho máximo ainda no início do processo de desenvolvimento folicular (DRIANCOURT; THUEL, 1998). O oócito atinge aproximadamente 85% de seu tamanho final quando ocorre o início da formação do antro. As células da granulosa, por sua vez, continuam a proliferar extensivamente, enquanto o oócito cessa seu crescimento (DRIANCOURT; THUEL, 1998).

Sugere-se que o crescimento dos folículos pré-antrais é pouco dependente de gonadotrofinas (DRIANCOURT; THUEL, 1998; GOUGEON, 1998; FORTUNE et al., 2000; FINDLAY et al., 2002; FORTUNE, 2003), e que está relacionado com a interação de fatores intra-ovarianos (WANDJI; FORTIER; SIRARD, 1992; WANDJI; PELLETIER; SIRARD, 1992; FORTUNE et al., 2000; ERICKSON; SHIMASAKI, 2001; FINDLAY et al., 2002). Contudo, WANDJI; FORTIER; SIRARD (1992) constataram a presença de receptores para o FSH em folículos pré-antrais bovinos desde o estágio de folículo primário.

Citocinas e fatores de crescimento (Fig. 2), como o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), hormônio anti-mülleriano (AMH), Kti-ligante (KT), dentre outros são importantes reguladores do estágio inicial do desenvolvimento folicular (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; MCLAREN, 2000; ERICKSON, 2001; PEREDA; ZORN; SOTO-SUAZO, 2006; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

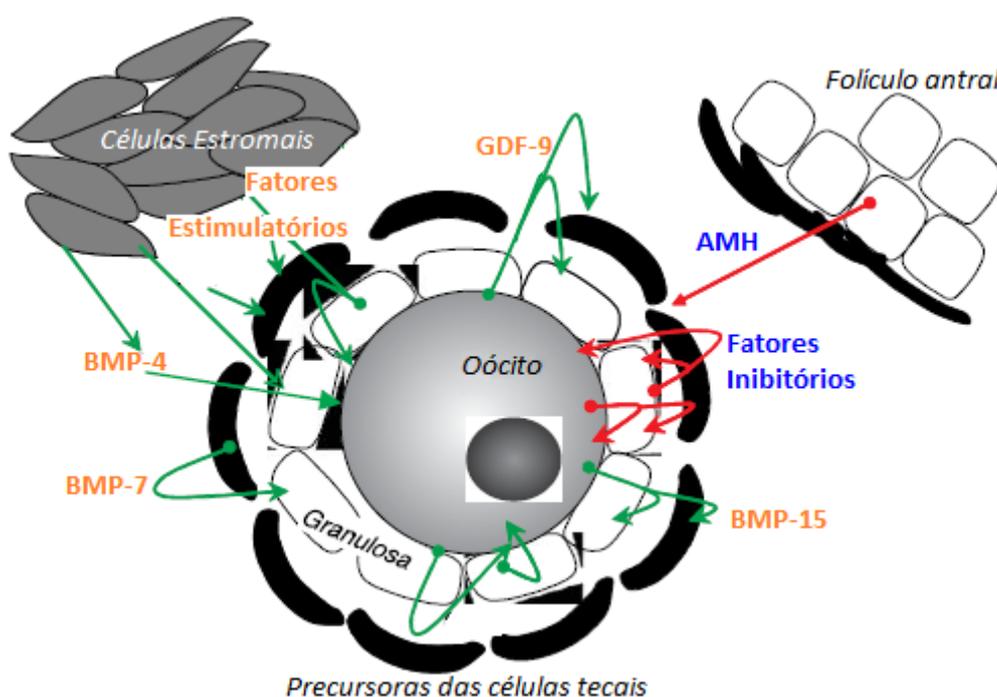
O hormônio anti-mülleriano é o fator de crescimento que leva a regressão do ducto de Müller em indivíduos do sexo masculino, e tem sido bastante descrito como responsável pela manutenção do “pool” de folículos primordiais em fêmeas. Pois, sua produção em células da granulosa, sugere seu papel inibidor na formação de folículos primordiais, tendo com isso uma ação regulatória no processo da foliculogênese (Fig. 2) (RODRIGUES et al., 2008; McLAUGHLIN; MCLVER, 2009). Estudos mostram que este fator pode diminuir a expressão de fatores pró-ativação e aumentar a expressão de fatores inibitórios (NILSSON; ROGERS; SKINNER, 2007).

Muitos membros da superfamília TGF- β estão envolvidos na via de sinalização extracelular para regular o desenvolvimento folicular ovariano, como o GDF-9 e as BMPs (principalmente BMP-4, -7 e -15 ou GDF-9b). O efeito estimulatório na transição do

folículo primordial para primário foi demonstrado por BMP (-4 e -7), produzidas por células estromais e tecais. O GDF-9 e a BMP-15 são secretados pelo oócito e regulam o recrutamento de folículos primordiais, a proliferação das células da granulosa, diferenciação e síntese de esteróides (RODRIGUES et al., 2008; McLAUGHLIN; MCLVER, 2009; SUN et al., 2010). Estudos relatam ainda que essa regulação ocorre também através de folículos vizinhos (EDWARDS et al., 2008). (Fig. 2)

Figura 2 – Representação esquemática de fatores inibitórios (setas vermelhas) e estimulatórios (setas verdes) envolvidos na ativação e transição do folículo primordial para primário.

Fonte modificada DE MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009.



Com relação aos folículos antrais, estes são recrutados e selecionados, tornando-se subordinados, dominantes ou pré-ovulatórios dependendo de sua responsividade aos hormônios gonadotróficos (FSH e o LH) ou podem se degenerar por apoptose (SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Na fase final se observa várias camadas de células da granulosa (Células da mural) e um oócito rodeado por células do cumulus que ligam o oócito a parte mural, as quais englobam um fluido antral cercadas por células bem diferenciadas chamadas de teca. A camada interior da teca é bem vascularizada, possui abundantes células esteroideogênicas

distribuídas em um tecido conjuntivo frouxo, e a teca externa consiste principalmente de tecido conjuntivo resistente (Fig. 1 e 2). (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; McLAREN, 2000; ERICKSON, 2001; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

No folículo pré-ovulatório, o oócito reagirá com o pico do LH e irá se maturar (haverá rompimento das junções do cumulus, redistribuição das organelas, migração perinuclear das mitocôndrias e acúmulo de grânulos corticais ao longo do oolema) e ovular (FERREIRA et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

3.2.3 Dinâmica Folicular

A formação de um folículo pré-ovulatório é um processo altamente seletivo, que envolve uma série de passos nos quais um folículo primordial completa todos os aspectos da foliculogênese e libera um oócito maduro (SAUMANDE, 1981). Em mulheres, apenas uma pequena porção dos 2 milhões de folículos primordiais originais irão sobreviver ao processo de seleção (BAKER, 1976). De um modo geral, a seleção reflete um alto nível de organização, que está baseada na citodiferenciação das células da granulosa, tecais e oócitos (ERICKSON, 1986; FORTUNE, 1994). No decorrer de seu desenvolvimento, os folículos antrais podem passar por três etapas: recrutamento, seleção e dominância (FORTUNE, 1994; DRIANCOURT; THUEL, 1998; GOUGEON, 1998; GILCHRIST et al., 2001).

Com a liberação do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), que são trazidos até os folículos através dos capilares tecais, o folículo terciário aumenta em tamanho de forma surpreendente. Na mulher, o crescimento pode ser de aproximadamente 75 vezes em diâmetro, que corresponde a um aumento de 0,4 mm a 20 mm em diâmetro antes da ovulação (ERICKSON, 1986; GOUGEON, 1998). Em *S. apella* o folículo terciário pode ter em média 514,4 μm (DOMINGUESL et al., 2003; DOMINGUES et al., 2004) e atingir o diâmetro de um folículo pré-ovulatório com 10-12 mm (NAGLE et al., 1980; ORTIZ et al., 2004). A base para este crescimento é a proliferação das células da granulosa e o acúmulo de líquido folicular (ERICKSON, 1986; DRIANCOURT; THUEL, 1998; GOUGEON, 1998). Na macaca-prego, existe um hiato de informações entre os processos de recrutamento e dominância folicular.

Durante o desenvolvimento do folículo De Graaf, as células da teca passam a expressar a sua diferenciação. Na teca interna, células intersticiais altamente diferenciadas acumulam-se progressivamente até que existam 5 a 8 camadas destas células em um folículo pré-ovulatório. Na teca externa do folículo De Graaf, os fibroblastos se diferenciam em células com características típicas de músculo liso, as quais contêm actina e miosina. Estas células contráteis são inervadas por fibras simpáticas e parassimpáticas (ERICKSON, 1986). No decorrer de seu desenvolvimento, os folículos antrais podem passar por três etapas: recrutamento, seleção e dominância (FORTUNE, 1994).

O termo recrutamento tem sido dado para os folículos em crescimento que não sofrem atresia. Durante o recrutamento, os folículos tentam ultrapassar a barreira que os separa da ovulação. O recrutamento não é um fenômeno generalizado ou isolado, ao contrário, os folículos parecem ser recrutados em grupamentos, sugerindo que eles recebem um sinal que permite que continuem a crescer, ao invés de regredirem. O sinal que parece estimular o recrutamento é um sutil aumento da concentração plasmática de FSH. Existem várias evidências que dão suporte a esta hipótese. A primeira é que o recrutamento é temporalmente correlacionado com aumentos nas concentrações de FSH circulante (FORTUNE, 1994; GILCHRIST et al., 2001). Em primatas de ciclo menstrual, as concentrações basais de FSH são ligeiramente mais altas no início da fase folicular do que no fim desta e durante a fase luteal (NAGLE et al., 1979 e 1980).

Existe uma correlação temporal entre as elevações plasmáticas de FSH e o recrutamento de folículos, de forma que perturbações na concentração de FSH também levam a mudanças concomitantes nas características e/ou no número de folículos recrutados (FORTUNE, 1994; MACKLON; FAUSER, 1998). Um exemplo do efeito do FSH sob o número de folículos recrutados é que uma elevação dramática dos níveis plasmáticos de FSH, empregados em regime de superovulação em mulheres e animais domésticos, aumenta o número de folículos recrutados (FORTUNE, 1994).

Para uma dada espécie, geralmente a quantidade de folículos recrutados é maior do que a de folículos ovulatórios. Portanto, o número de folículos que continuam a crescer até alcançar o tamanho de um folículo ovulatório constitui uma característica espécie-específica (MONNIAUX et al., 1997). Imediatamente após o crescimento, inicia-se a fase de seleção, na qual um único folículo emerge do conjunto de folículos recrutados e continua a crescer, enquanto os outros folículos recrutados diminuem de tamanho

(FORTUNE *et al.*, 1991). Na mulher, os folículos passam do recrutamento para a seleção com o diâmetro de 2 a 8 mm (DRIANCOURT; THUEL, 1998).

Aqueles folículos que alcançam o tamanho de folículo ovulatório são chamados de folículos dominantes, porque se acredita que uma vez selecionados, eles evitam o crescimento, a diferenciação e o recrutamento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994). Na mulher, os folículos dominantes são aqueles que possuem diâmetro de 8 mm em diante (DRIANCOURT; THUEL, 1998). Duas hipóteses têm sido postuladas a fim de explicar como o folículo dominante exerce dominância. A primeira é que o folículo dominante secreta alguma substância que impede o crescimento e o desenvolvimento dos folículos subordinados, e a segunda é que o folículo dominante inibe o crescimento e o recrutamento de outros folículos através de *feedback* negativo sobre a secreção de gonadotrofinas. Neste segundo caso, o estradiol e/ou a inibina produzidos pelo folículo dominante causam declínio nos níveis de FSH, os quais não seriam suficientes para manter o crescimento dos folículos subordinados (FORTUNE, 1994).

Um ponto bastante importante da reprodução de fêmeas é a perda acentuada da população folicular que ocorre pelo processo denominado atresia folicular (HENDERSON; BRAUDE; AITKEN, 1987), o qual reduz de modo significativo a quantidade de oócitos potencialmente viáveis durante a vida reprodutiva das fêmeas mamíferas (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002). No intuito de aproveitar de modo mais eficaz a população oocitária, muitos estudos estão sendo realizados visando recuperar os folículos ovarianos antes da atresia e cultivá-los *in vitro* em uma composição ideal que consiga promover o desenvolvimento dos mesmos (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002).

3.2.4 População de folículos ovarianos de primatas

DOMINGUES *et al.* (2004) estudaram aspectos histológicos de folículos ovarianos de *Sapajus apella* adultas, e mostraram o total médio da população de folículos pré-antrais de ovário direito e esquerdo, 56.938 e 49.133, respectivamente. No mesmo trabalho, verificaram uma percentagem média de folículos de 30, 60, 6 e 4% nos estágios: primordial, transição, primário e secundário, respectivamente.

O desenvolvimento folicular em *S. apella*, assim como em outras espécies de mamíferos, apresenta um aumento significativo do número de células da granulosa em diferentes categorias foliculares. DOMINGUES *et al.* (2004) observaram que as células

cúbicas começam a aparecer quando o folículo apresenta cerca de 11 células na camada da granulosa. As células achatadas ainda estão presentes até o estágio de 15 células foliculares. A transformação completa foi alcançada no estágio de 16 células.

Com relação ao diâmetro médio folicular, VAN DEN HURK; SANTOS (2009) destacam uma mensuração entre 30 μm de diâmetro de folículos primordiais em mamíferos, e DOMINGUES et al. (2004) encontraram em *S. apella* uma média de 16-47 μm (min-max). Em comparação com os pré-ovulatórios, estudos mostram um tamanho de 8-10 mm em ovelhas, 15 a >20 mm em cabras e >20 em humanos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), e em *S. apella* pode chegar de 10-12 mm (NAGLE et al., 1980; DOMINGUES et al., 2007).

3.3 CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS

Os cultivos bem-sucedidos dos FOPAs de ratos se processaram em duas etapas (VAN DEN HURK; SANTOS, 2009), sendo que na primeira etapa estes são cultivados *in situ*, já em uma segunda etapa, os folículos são isolados e cultivados de modo bidimensional (CAIN; CHATTERJEE; COLLINS, 1995) ou tridimensional (ZHAO et al., 2001). Como se sabe, a sobrevivência dos folículos pré-antrais é afetada pela composição dos meios de cultivo, e que os sistemas de cultivo disponíveis ainda não conseguem proporcionar as condições adequadas para o ótimo desenvolvimento dos mesmos *in vitro* (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002), alguns autores vêm testando diferentes componentes ao meio de cultivo.

Fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos, dentre eles podemos citar o Fator Crescimento Epidermal (EGF) que pode estar envolvido na foliculogênese inicial (SILVA et al., 2004). O EGF e seus receptores são expressos nos folículos ovarianos de caprinos em todos os estádios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo, na superfície do epitélio ovariano (SILVA et al., 2006), no oócito e células da granulosa de folículos, tanto nos estádios iniciais quanto avançados de seu desenvolvimento em humanos (BENNETT; OSATHANONDH; YEH, 1996). Estudos mostraram que o EGF promove a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais, induz a transição de folículos de porcas do estágio primário para secundário (MORBECK; FLOWERS; BRITT, 1993), além de reduzir os níveis de atresia em folículos

pré-antrais de bovinos cultivados *in vitro* e promover a ativação de folículos primordiais de ovinos e a manutenção da viabilidade por até seis dias de cultivo (ANDRADE et al., 2005).

O β -mercaptoetanol (BME) é um dos anti-oxidantes utilizados em meios de maturação *in vitro* para aumentar as concentrações intracelulares de glutatona nos oócitos (FUNAHASHI, 2005), zigotos (ABEYDEERA et al., 1998) e embriões (SONGSASEN; APIMETEETUMRONG, 2002; TAKAHASHI et al., 2002). Esse agente promove redução no estresse oxidativo nos FOPAs, podendo melhorar o crescimento dos mesmos em meios de cultivo (GUPTA; NANDI, 2010) devido armazenar os transcritos endógenos para enzimas anti-oxidantes durante o crescimento do oócitos, folículos e embriões; esse crescimento é importante por permitir as células adquirirem a amplitude para os FOPAs se desenvolverem (GUERIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001; FUNAHASHI et al., 2005).

Os fatores de crescimento parácrinos, como proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) e BMP-7, e seus receptores, BMPR-II, BMPR-IB, e BMPR-IA, foram encontrados em ovários (SHIMASAKI et al., 1999). Uma mutação em BMPR-IB foi associada com uma taxa de ovulação aumentada em ovelhas (MULSANT et al., 2001; MONTGOMERY et al., 2001; MONGET et al., 2002). Em camundongo, uma mutação *knock-out* no gene do BMPR-IB resulta na não expansão das células do cúmulus na hora da ovulação como também diminui a produção de aromatase pelas células da granulosa (YI et al., 2001). Em ovários de rato, são expressos níveis altos de BMP-4 e BMP-7 nas células da teca de folículos antrais, enquanto BMPR-IB são altamente expressos nas células da granulosa e nos oócitos (SHIMASAKI et al., 1999). Nas células da granulosa de folículos antrais, o BMP-4 e BMP-7 inibem a produção de progesterona e induz a secreção de estrógeno (SHIMASAKI et al., 1999; MULSANT et al., 2001; MONGET et al., 2002). Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são membros da superfamília do fator transformador de crescimento beta (TGFB) (SHIMASAKI et al., 2004). O BMP-4 promove sobrevivência dos oócitos e das células foliculares bem como transição de folículo primordial a folículo primário em ovários de rato neonatal (ERIC; MICHAEL, 2003; NILSSON; SKINNER, 2003). No entanto, sua ação *in vitro* de forma precisa, sobre a ativação e desenvolvimento folicular, ainda não foi descrita através da quantificação de genes relacionados tais como o fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9), proteína morfogenética medular 4 (BMP-4), proteína morfogenética medular 15 (BMP-15), Kti-ligante (KT) e fator anti-mulleriano (AMH).

Muito se conhece sobre as fases finais da foliculogênese, mas relativamente pouco se sabe o início do desenvolvimento folicular, principalmente em relação ao folículo primordial (TANWAR; O'SHEA; MCFARLANE, 2008). O desenvolvimento de folículo primordial a folículo primário é considerado independente de gonadotrofina porque estes folículos se desenvolvem em ratos *knock-out* no gene dos receptores do hormônio estimulante folicular (FSH) (DIERICH et al., 1998). Em contraste, alguns estudos indicaram que o desenvolvimento de folículo primário é influenciado por gonadotrofinas, pois elevados níveis de LH aumentam a depleção da reserva de folículo primordial em ratos (FLAWS et al., 1997), assim como altas concentrações de FSH induzidas por ovariectomia unilateral em ratos são associadas com a diminuição do número de folículos primordiais (MEREDITH et al., 1992). Com base nesses estudos pode-se chegar à hipótese de que os fatores locais produzidos pelos ovários são responsáveis pelo desenvolvimento de folículos primários, e que as gonadotrofinas podem modular este processo (TANWAR; O'SHEA; MCFARLANE, 2008). Mais recentemente foi demonstrado que o FSH e a gonadotrofina do soro de égua gestante (PMSG) são fatores de crescimento significativo para promover o crescimento de folículos preantrais *in vitro* em búfalo (GUPTA et al., 2002) e *in vivo* em rato (TANWAR; O'SHEA; MCFARLANE, 2008)

3.4 A FÊMEA DE *Sapajus apella*

3.4.1 Taxonomia

A espécie *S. apella* é um primata neotropical que pertence à infra-ordem Platyrrhini, superfamília Ceboidea, família Cebidae, subfamília Cebinae, gênero *Sapajus* (JESSICA, W. et al, 2012; SILVA JR, 2001; 2002). Dentro da subfamília Cebinae, o gênero *Cebus* está entre os primatas neotropicais mais importantes para a pesquisa biomédica, incluindo reprodução, neurofisiologia, imunologia e virologia (HEARN, 1994).

3.4.2 Biologia

A espécie *Sapajus apella*, conhecida popularmente como macaco-prego (Fig. 3), está dentro do grupo de primatas neotropicais (Família Cebidae) mais diversificado e populoso, com distribuição em habitats tropicais das Américas Central e do Sul (FLEAGLE, 1999; JESSICA, W. et al, 2012, SILVA JR, 2001; 2002). Os cebídeos (pertencentes à Família Cebidae) se destacam pela sua ampla utilização nas pesquisas científicas, por meio de análises comportamentais (PHILLIPS et al., 1992; OETTING et

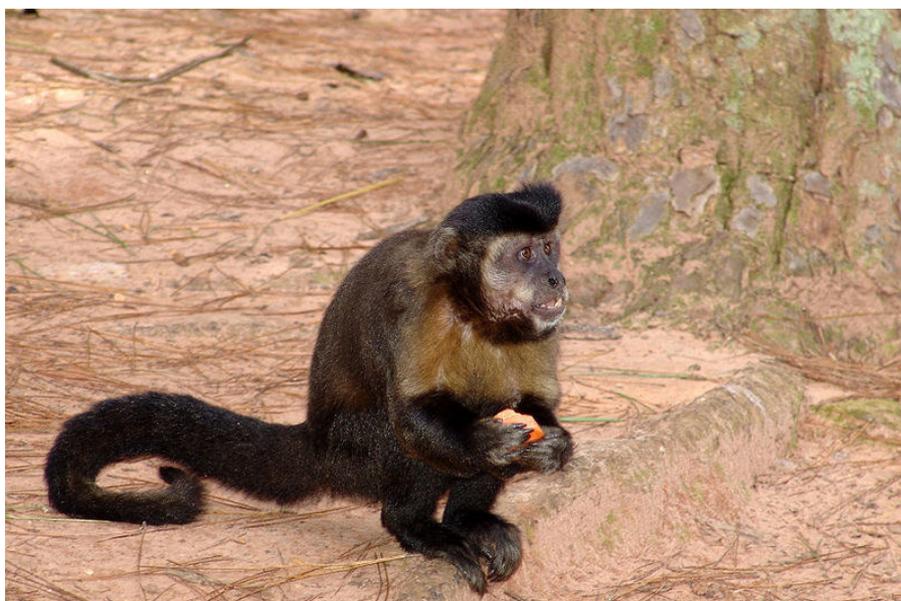
al., 1994; LINN et al., 1995), utilização em terapias e estratégias de prevenção de doenças (CLARKSON, 1976) e nas pesquisas biomédicas como um modelo experimental (VAUGHAN, 1985; NOWAK, 1991; REDFORD, 1992; HEARN, 1994; FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998).

Esta espécie é caracterizada por apresentar porte médio, com peso de aproximadamente 3,5 kg nos machos adultos e cerca de 2,5 kg nas fêmeas adultas (DINIZ, 1997; SILVA JR, 2001; 2002). A pelagem do corpo é curta, com textura sedosa e tonalidade amarela, marrom e preta (DINIZ, 1997; SILVA JR, 2001; 2002).

Figura 3 – Representante da espécie *Sapajus apella*.

Acessado em 25 de Outubro de 2011.

(Fonte:http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Macaco-prego_Manduri_151207_15.JPG).



A maturidade sexual em *S. apella* é atingida aos quatro anos nas fêmeas e aos sete anos nos machos (FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998). O tempo da gestação varia entre 153 a 160 dias (WRIGHT; BUSH, 1977). No ambiente natural, formam grupos de 8 a 16 indivíduos com um ou mais machos (AURICCHIO, 1995). Em cativeiro, esta espécie é considerada de fácil manutenção, podendo se reproduzir anualmente (DE LUCA, 1990), além de apresentar atividade reprodutiva até os 25 anos e alcançar os 44 anos de idade (FRAGASZY; ADAMS-CURTIS, 1998).

3.4.3 Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva

As fêmeas de *S. apella* apresentam ciclo menstrual, com média de 18 a 21 dias (WRIGHT; BUSH, 1977; NAGLE et al., 1979; LINN et al., 1995). A ovulação ocorre entre os dias 8-11 do ciclo (NAGLE et al., 1980; DOMINGUES, et al., 2007). A descrição das fases do seu ciclo menstrual foi obtida pela utilização de citologia vaginal (Wright; Bush, 1977; LINN et al., 1995; MARTINS, 2004), por parâmetros comportamentais (LINN et al., 1995), pela determinação das concentrações plasmáticas de hormônios ovarianos (NAGLE et al., 1979) e mais recentemente pela ultra-sonografia (US) (ORTIZ et al., 2005).

NAGLE et al. (1979; 1980) avaliaram as distribuições das fases do ciclo menstrual de *S. apella*, relacionando as concentrações de 17 β -estradiol (E2) e de progesterona (P4) no plasma sanguíneo. Esses autores descreveram que a concentração plasmática de E2 aumenta gradativamente conforme o crescimento do folículo dominante, ocorrendo um pico deste hormônio ($503,3 \pm 30,6$ pg/mL) entre os dias 7-10 do ciclo (fase folicular). A concentração plasmática de P4 na fase folicular fica baixa durante este período (2,1-10 ng/mL). Na fase luteal subsequente, a qual possui 12-13 dias, os valores plasmáticos de E2 atingem a sua menor concentração ($53,6 \pm 5,1$ pg/mL) cinco dias após o seu pico e a concentração de P4 começa a aumentar 12 h após o pico de E2, atingindo valores entre 12-15 ng/mL dentro de 24 h e alcança o valor máximo de $66,9 \pm 5,6$ ng/mL seis dias após o pico de E2. Um dia antes de acontecer a menstruação (fase menstrual), ocorre um declínio abrupto das concentrações plasmáticas de P4 e E2, quando estes retornam para os seus valores basais.

A ovulação de um único folículo em *S. apella* ocorre dentro de 10-24 h ($18,1 \pm 0,9$ h) após o pico de E2 (NAGLE et al., 1980). Utilizando a US transabdominal 2D, foi descrito que a ovulação acontece quando o diâmetro médio do folículo ovulatório alcança 8-9 mm (variação de 6,4 a 9,6 mm) (ORTIZ et al., 2004, 2005; DOMINGUES, 2005), sendo que o folículo dominante de 5,0 mm leva de um a cinco dias para atingir o seu diâmetro máximo (ORTIZ et al., 2005). Este parâmetro é importante para se estimar o provável dia da ovulação em fêmeas de *S. apella*.

3.4.4 O que já foi realizado de moifopa em *Sapajus apella*

Pouco progresso sido observado em cultivos para crescimento de folículos primordiais ou primários (Ovelhas (CECCONI et al., 2004), cabras (RODRIGUES et al

2005; 2006) e em macaco rhesus (JIN et al., 2010)), mas foram obtido sucesso quando cultivado folículos secundários de macaca rhesus (RICHARD et al., 2005; XU et al., 2009; 2010)

NAYUDU; WU; MICHELMANN (2003) relataram pela primeira vez protocolos de cultivo de folículos pré-antrais em primatas neotropicais, a partir de fragmentos de córtex ovariano e folículos isolados de *C. jacchus*. Após o cultivo dos folículos pré-antrais, os que formaram antro *in vitro* foram puncionados, e os oócitos recuperados foram submetidos à MIV. Nos oócitos obtidos após o cultivo dos folículos pré-antrais isolados, ocorreu o rompimento da vesícula germinativa e extrusão do primeiro corpúsculo polar.

Em *Sapajus apella*, foi descrito o isolamento de folículos pré-antrais (FOPA) utilizando-se um *tissue chopper*. A partir desta técnica, foi possível obter 500.000 folículos pré-antrais com diâmetro variando de 11,6 a 27,8 μm . Estes folículos pré-antrais se forem devidamente cultivados *in vitro*, podem disponibilizar uma grande quantidade de oócitos para estudos de MIV e FIV (DOMINGUES et al., 2003), evitando-se o uso de técnicas invasivas como a laparotomia e laparoscopia. No entanto em *S. apella* não foi encontrado nenhum trabalho com cultivo de folículos pré-antrais.

4 VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA O TECIDO OVARIANO DE MACACAS-PREGO (*Sapajus apella*).

A.B. Brito^{1,2}, J.S. Lima^{1,2}, D.C. Brito¹, L.N. Santana^{1,2}, N.N. Costa³,
M.S. Miranda³, O.M. Ohashi³, R.R. Santos^{1,2,4*}, S.F.S. Domingues^{1,2}

¹Laboratório de Biologia de Animais Silvestres e Medicina, Universidade Federal do Pará, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Brasil

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil.

⁴Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht, Utrecht, Holanda

Resumo

Embora a criopreservação esteja ganhando aplicação rotineira, não há tradição em estudos que relatam o efeito da exposição a crioprotetores ou simplesmente hipoxia e hipotermia sobre a expressão gênica no tecido ovariano. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a estabilidade de três genes de referência no tecido ovariano de macacas-prego (*Sapajus apella*). Para este fim, biópsias ovarianas a fresco e tratadas foram usadas. Tecidos ovariano à fresco e expostos a crioprotetor foram submetidas à extração de RNA total e síntese de cDNA. Após a amplificação do cDNA por PCR em tempo real, o GeNorm, Bestkeeper e Normfinder software foram utilizados para avaliar a estabilidade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1) e proteína ligante TATA-box (TBP). Os resultados demonstraram que, no tecido ovariano de macacas-prego, HPRT1 e TBP foram os genes de referência mais adequado e, portanto, poderiam ser usados como parâmetros para normalizar os dados em estudos futuros. Em contraste, a GAPDH apareceu como o gene menos estável entre os genes de referência testadas. Em conclusão, HPRT1 e TBP são os genes de referência mais estáveis em tecido ovariano de macacas-prego à fresco ou exposto crioprotetor.

Palavras-chave: GAPDH, HPRT1, RIT, genes expressos de forma estável, qRT-PCR, tecido ovariano

Introdução

Embora a criopreservação esteja ganhando aplicação rotineira, não há tradição em estudos que relatam o efeito da exposição a crioprotetores ou simplesmente hipoxia e hipotermia sobre a expressão gênica no tecido ovariano. Com exceção de um estudo sobre a expressão de GAPDH em tecido ovariano vitrificados (Isachenko et al., 2009), não há outros estudos, que fazem referência a quantificação geninica, e comparações entre normóxia, hipóxia, hipotermia e com condições tóxicas.

Níveis de expressão gênica em tecidos e células podem ser medidos por transcrição reversa quantitativa PCR (qRT-PCR). Como meios para calcular a expressão relativa de genes-alvo, os genes de referência são usados como controles internos, porque eles são tidos como expressos de forma estável e não regulado por condições experimentais ou patológicas. No entanto, genes de referência podem variar em expressão genica, e a utilização de genes não suficientemente estável pode resultar em dados errados (Hugget et al., 2005).

O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é tradicionalmente usado como um gene de referência. No entanto, a transcrição de GAPDH em células-tronco adiposas sob hipóxia (Fink et al., 2008) e no tecido do ovário submetidos a vitrificação seja instável (Isachenko et al., 2009). Por outro lado, hipoxantina fosforribosil-transferase 1 (HPRT1) é um gene de referência adequados para estudos de isquemia em astrócitos (Gubern et al., 2009). Finalmente, proteína ligante TATA-box (TBP) foi indicado como um gene de referência adequado para estudos relacionados ao câncer de ovário (Li et al., 2009) e desenvolvimento gonadal (Svingen et al., 2009).

O objetivo do trabalho foi determinar genes de referência para qRT-PCR em tecido ovariano de macacas-prego (*Sapajus apella*) submetidos à hipóxia, hipotermia e a tóxicos. Os software GeNorm, BestKeeper e NormFinder foram usados para determinar os genes mais estáveis.

Material e Métodos

Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local em Pesquisa Animal (no.029/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS) e pelo Instituto Brasileiro de Vida Selvagem e Meio Ambiente (IBAMA). Oito ovários de fêmeas de macaco-prego saudáveis e sexualmente maduras (8 – 12 anos de idade, faixa de peso: 1.9 – 2.8 Kg) foram selecionados para nosso estudo. A dieta diária das fêmeas consistiu de frutas frescas e de ração comercial peletizada (FOXY Júnior Supremo, proteína bruta 28%; Provimi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Leite, vitaminas, minerais, e ovos foram fornecidas uma vez por semana. Água de torneira à vontade foi disponíveis. As fêmeas foram mantidas em ambientes fechados sob fotoperíodo natural e alojadas individualmente em gaiolas (80 x 90 x 80 cm) no Centro Nacional de primatas, Ananindeua, Pará, Brasil.

Coleta de tecido ovariano

Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia geral. Cada animal foi anestesiado com cloridrato de cetamina (10 mg / kg; IM; vetanarcol, Koning SA, Avellaneda, Argentina) e cloridrato de xilazina (1 mg / kg; IM; kensol, Koning SA). As fêmeas foram colocados em decúbito dorsal e biópsias dos ovários foram coletadas por laparoscopia exploratória. Para isso, uma incisão na pele na linha média ventral foi feita para ter acesso aos ovários, tal como descrito por Domingues et al. (2007). A partir de cada ovário, um fragmento (controle) foi imediatamente retirado armazenado em 40 µL de RNAlater® (AMBIOM, fabricado por Applied Biosystems) e estocado a -20°C até a extração de RNA. Outros dois fragmentos (tratamentos) foram submetidos à hipóxia e hipotermia (HH) por 20 min a 20 ° C, em meio de cultivo de tecido simples (HH) ou adicionados de 4M de etileno glicol (HHT).

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando o Trizol reagente (Invitrogen, Carlsbad, CA). A concentração de RNA foi estimada pela leitura da absorbância a 260 nm e foi verificada a pureza a 280 nm em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample, NanoDrop, Wilmington, DE). Para cada amostra, as concentrações de RNA foram ajustados para 45 ng / µL e usado para sintetizar o cDNA. A transcrição reversa foi

realizada num volume total de 20 μL , composto 10 μL de amostra de RNA, 2 μL tampão RT, 0,8 μL mistura de dNTP (100 mM), 2 μL Primers aleatórios RT, 1 μL MultiScribe™ transcriptase reversa, 1 μL inibidor de RNase e 3,2 μL de água ultra-pura (High Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). A mistura foi incubada a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 e 4 °C por 8 min, e finalmente, armazenada a -20 °C. O controle negativo foi preparado nas mesmas condições, mas sem a adição do ácido nucleico.

PCR e determinação da estabilidade gene

Para identificar os genes de referência mais estável nos tecidos ovariano de macacas-prego, as quantificação de mRNA para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1) e proteína ligante TATA-box (TBP) foram conduzidas com o uso de SYBR Green. As Reações do cDNA no PCR consistiram de desnaturação inicial e ativação da polimerase nos seguintes estágios: estágio 1 - 2 min a 50 °C, estágio 2 - 10 min a 95 °C, estágio 3 - 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 seg a 58 °C, 45 seg a 60 °C (extensão e Leitura dos dados), estágio 4 - 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e 15 s a 95 °C, realizadas em termociclador em tempo real (ABI PRISM 7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems). Os primers escolhidos para as amplificações dos possíveis genes de referência são apresentados na Tabela 1.

Análise dos dados e estatísticas

As análises dos dados foram realizadas utilizando o pacote de software GeNorm (Vandermompele et al., 2002), BestKeeper pacotes (Pfaffl et al., 2004) e NormFinder (Andersen et al., 2004). O algoritmo GeNorm baseia-se no princípio de que a relação de expressão de dois genes de referência ideal seja idêntica em todas as amostras, independentemente da condição experimental. O programa aplica um algoritmo estatístico para calcular o valor da estabilidade média (M) de cada gene candidato verificando a variação média de pares (V) para cada gene. Os genes de referência são então classificados por exclusão gradual do gene com a mais alta estabilidade média. Os genes com a menor estabilidade média são considerados mais estáveis. BestKeeper usa valores Ct, em vez de quantidades relativas e emprega medida diferente da estabilidade expressão. BestKeeper calcula um coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Todos os genes de referência altamente correlacionadas são então combinados

em um fator de normalização, através do cálculo da média geométrica. NormFinder gera uma medida similar de estabilidade, um valor mais baixo implica em uma maior estabilidade na expressão gênica como descrito por Andersen et al. (2004). valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Resultados e Discussão

A análise do cDNA, determinando estabilidade da expressão dos genes em tecido ovariano a fresco (normóxia) e tratado (hipóxia, hipotermia e a tóxicos) de macacas-prego. Hipóxia, hipotermia e toxicidade não afetaram a expressão de GAPDH, HPRT1 e TBP. No entanto, houve uma grande variabilidade na expressão relativa de GAPDH (Fig. 1).

Usando GeNorm, uma exclusão gradual dos genes instáveis e subsequente recálculo dos valores médios de M resultaram em uma classificação dos genes. Tendo como base valores médios de M foi determinado dois genes mais estáveis (HPRT e TBP; $M < 0,04$) e que lideram a classificação (Fig. 2A). Após a eliminação gradual do gene menos estável (GAPDH), recomendamos o uso de HPRT1 e TBP. A análise do GeNorm revelou que a variação (V) do valor para o par de matrizes V2 / 3 foi de 0,017, o que é muito abaixo do valor de corte de 0,15 (Fig. 2B). Portanto, a inclusão de um gene de referência adicional não é necessário (Vandermolen et al., 2002) e o uso de dois genes foi suficiente para uma referência estável e válida em qRT-PCR.

Em relação ao software BestKeeper, calcula-se o desvio padrão do gene de referência (SD) com base em valores brutos (CT), independentemente da eficiência da amostra. O gene com o menor SD é considerado o mais estável. Mais uma vez, temos observado que HPRT1 e TBP foram os genes expressos de forma mais estável, enquanto GAPDH apresentou um SD maior que 1 (Tabela 2), o que caracteriza um gene instável (Seul et al., 2011).

NormFinder é uma abordagem baseada em um modelo para estimar a variação de expressão (Andersen et al., 2004). A constatação mais evidente a partir da análise NormFinder foi que a expressão de GAPDH é instável em todas as condições experimentais, o que confirma a sua ineficácia como gene de referência. Os valores de estabilidade são apresentados na Tabela 2. Baseando-se em NormFinder, o valor de estabilidade para melhor combinação de HPRT1 e TBP foi 0,008. Embora os dados de classificação diferiram entre BestKeeper e NormFinder, em ambos os testes, os genes HPRT1 e TBP foram selecionados como mais estáveis. Variação na classificação quando

se usa diferentes programas foi mostrado anteriormente (Seul et al., 2011). Como a nossa intenção foi definir os dois genes mais estáveis, uma classificação usando a média das três análises foi desnecessária.

Embora muitas vezes o GAPDH tenha sido usado como um gene de referência em folículos ovarianos pré-antrais, sua falta de estabilidade tem sido descrita (Frota et al., 2011). Sob baixa tensão de oxigênio, a transcrição do GAPDH pode ser induzida pelo factor induzível por hipóxia (HIF-1), levando à sua expressão instável (Foldager et al., 2009). Li et al. (2009) também relataram a inadequação do GAPDH como gene de referência no estudo de câncer da serosa ovário humano. No presente estudo, não apenas o tratamento hipóxico afetou a expressão de GAPDH, mas também a exposição do tecido ovariano a uma solução de vitrificação. Na verdade, Isachenko et al. (2009) relataram que a vitrificação afeta a expressão de GAPDH no tecido ovariano.

Temos observado que HPRT1 foi expresso de forma estável, independentemente da hipóxia, hipotermia e toxicidade. Li et al. (2009) têm mostrado que a expressão do HPRT1 é mais estável do que o GAPDH no ovário humano. Além disso, Meldgaard et al. (2006) descobriram que HPRT1 é um gene de referência adequados para estudos de isquemia, que explicam a sua adequação em nosso estudo. TBP também tem sido descrito como um gene de referência apropriado para ovário humano (Li et al., 2009), placenta de ratos (Lucas et al., 2011) e condrócitos expostos à hipóxia (Foldager et al., 2009). TBP é um fator de iniciação basal de transcrição que é universalmente conservada nas espécies eucarióticas (Kopitz et al., 2009). Além disso, tanto o TBP quanto o HPRT1 têm uma diversificada gama de funções celulares, o que torna a ocorrência de uma alteração na expressão genica inesperada (Lucas et al., 2011).

Em conclusão, recomendamos o HPRT1 e o TBP como genes de referência para análises de qRT-PCR de tecido ovariano de macacas-prego. O GAPDH deve ser evitado como gene de referência para o tecido ovariano em hipóxia, hipotermia e toxicidade. Nas próximas análises de qRT-PCR de tecido ovariano criopreservado, o uso de HPRT1 e de TBP como genes de referência consiste na estratégia de normalização mais confiável.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo projeto n ° 483439/2009-6 do CNPq, Brasil.

Referências

- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245-50.
- Domingues, S.F., Caldas-Bussiere, M.C., Martins, N.D., Carvalho, R.A. (2007). Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Theriogenology* **68**, 1251-9.
- Fink, T., Lund, P., Pilgaard, L., Rasmussen, J.G., Duroux, M., Zachar, V. (2008). Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure. *BMC Mol. Biol.* **9**, 98.
- Foldager, C.B., Munir, S., Ulrik-Vinther, W., Soballe, K., Bunger, C., Lind, M. (2009). Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-culture human chondrocytes. *BMC Mol. Biol.* **10**, 94.
- Frota, I.M., Leitão, C.C., Costa, J.J., Brito, I.R., Van den Hurk, R., Silva, J.R. (2011). Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. *Zygote* **19**, 71-83.
- Gubern, C., Hurtado, O., Rodriguez, R., Morales, J.R., Romera, V.G., Moro, M.A., Lizasoain, I., Serena, J., Mallolas, J. (2009). Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol. Biol.* **10**: 57.
- Hugget, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**: 279-284.
- Isachenko, V., Lapidus, I., Isachenko, E., Krivokharchenko, A., Kreienberg, R., Woriedh, M., Bader, M., Weiss, J.M. (2009). Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* **138**: 319-27.
- Kopitz, A., Soppa, J., Kreitschi, C., Hauser, K. (2009). Differential stability of TATA box binding proteins from archaea with different optimal growth temperatures. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **73**, 799-804.
- Li, Y.L., Ye, F., Hu, Y., Lu, W.G., Xie, X. (2009). Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **394**, 110-6.

- Lucas, E.S., Watkins, A.J., Cox, A.L., Marfy-Smith, S.J., Smyth, N., Fleming, T.P. (2011). Tissue-specific selection of reference genes is required for expression studies in the mouse model of maternal protein undernutrition. *Theriogenology* **76**, 558-69.
- Meldgaard, M., Fenger, C., Lambertsen, K.L., Pedersen, M.D., Ladeby, R., Finsen, B. (2006). Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology. *J. Neurosci. Methods* **156**: 101–10.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509-15.
- Seoul, D., Choe, H., Zheng, H., Jang, K., Ramakrishnan, P.S., Lim, T.H., Martin, J.A. (2011). Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. *BMC Res. Notes.* **26**, 162.
- Svingen, T., Spilller, C.M., Kashimada, K., Harley, V.R., Koopman, P. (2009). Identification of suitable normalizing genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in fetal mouse gonads. *Sex. Dev.* **3**: 194-204.
- Vandermompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034.

Legendas das Figuras

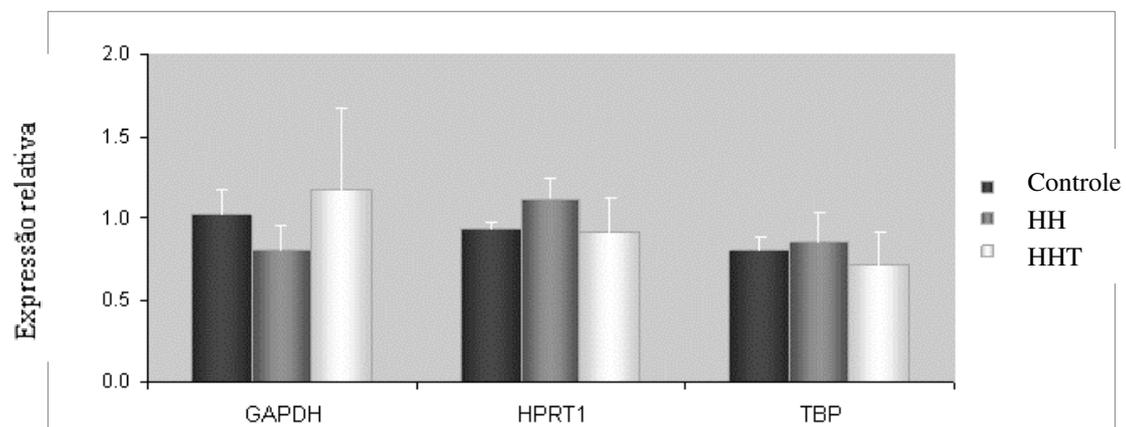


Figura 1. Níveis de expressão relativa dos genes de referência comparando o controle e os tratamentos (HH: hipóxia e hipotermia; HHT: hipóxia, hipotermia e toxicidade ao crioprotetor).

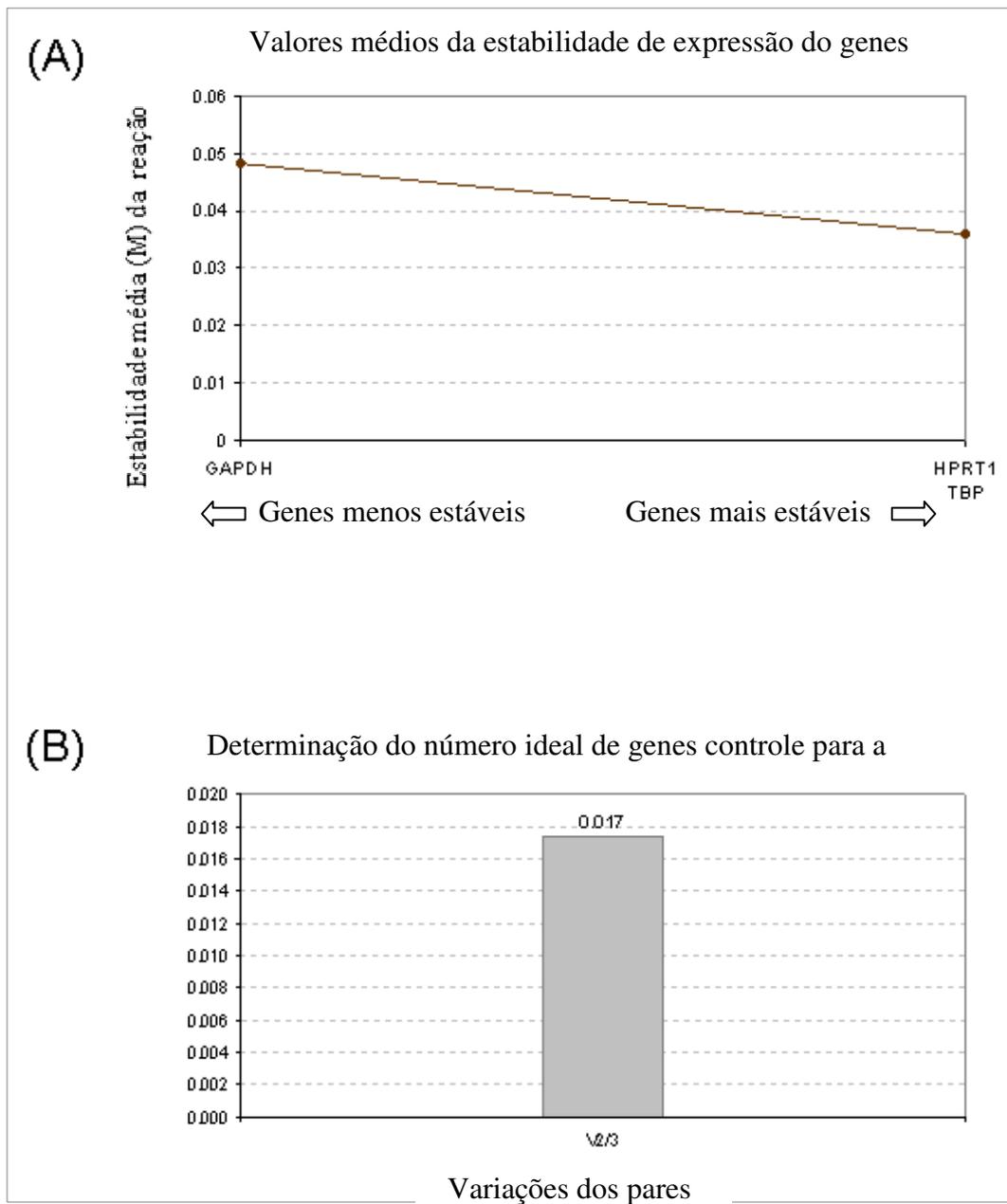


Figura 2. Valor da estabilidade média (M) da expressão dos possíveis genes referência (A) e variação (V) em pares entre os factores de normalização sequenciais(B).

Tabela 1. Pares de primers utilizados na PCR em tempo real para quantificação de genes de referência no tecido ovariano de maca-prego.

Gene	n°. de acesso	Primer iniciador	Primer reverso
GAPDH	NM_002046.3	5'-CCCATCACCATCTTCCAGG	3'-GAGCCCCAGCCTTCTCC
HPRT1	NM_000194.2	5'-TTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	3'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC
TBP	NM_003194.2	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	3'-CACATCACAGCTCCCCACCA

Tabela 2. Ordem de classificação dos genes candidatos a genes de referência em tecido ovariano de maca-prego.

	BestKeeper	NormFinder
1	TBP (0.88)	HPRT1 (0.005)
2	HPRT1 (0.90)	TBP (0.011)
3	GAPDH (1.24)	GAPDH (0.015)

5 DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE MACACAS-PREGO (*Sapajus apella*): ESTUDO MORFOLÓGICO, MOLECULAR E VIABILIDADE

Adriel Behn Brito, D.M.V.,^{a,b} Regiane Rodrigues Santos, Ph.D.,^{a,b,d} Rob van den Hurk, Ph.D.^d Julianne Silva Lima, D.M.V.,^{a,b} Moyses Santos Miranda, Ph.D.,^c Otavio Mitio Ohashi, Ph.D.,^c Sheyla Farhayldes Sousa Domingues, Ph.D.,^{a,b}

^aLaboratório de Biologia de Animais Silvestres e Medicina, Universidade Federal do Pará, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Brasil

^cInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil.

^dFaculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utrecht, Utrecht, Holanda

A.B.B. has nothing to disclose. J.S.L. has nothing to disclose. M.S.S. has nothing to disclose. O.M.O. has nothing to disclose. R.vd.H. has nothing to disclose. R.R.S. has nothing to disclose. S.F.S.D. has nothing to disclose.

Reprint requests: Regiane Rodrigues Santos, D.M.V., Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands (E-mail:regianers@hotmail.com).

Resumo

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um sistema de cultivo *in vitro*, em curto prazo para a ativação e crescimento de folículos pré-antrais de macaca-prego. Para isso, o tecido ovariano de quatro fêmeas foi coletado e dividido em nove pedaços de 1 mm³. Um fragmento ovariano (grupo controle) foi imediatamente dividido em dois pedaços, os quais foram destinados para análise da viabilidade por sonda de fluorescência (iodeto de propídio e Hoechst) ou por RT-PCR (AMH, BMP4, BMP15, CTGF, GDF9 e KL). Os 8 fragmentos restantes foram individualmente cultivados *in vitro* em um meio constituído de TCM suplementado com 100 ng/mL EGF (T1), com adição de 10 µM de BME (T2), 100 ng/mL de BMP4 (T3), 25 IU de PMSG (T4), 10 µM de BME e 100 ng/mL de BMP4 (T5), 10 µM de BME, 25 IU de PMSG (T6), 100 ng/mL de BMP4, 25 IU de PMSG (T7) ou 10 µM de BME, 100 ng/mL de BMP4, 25 IU de PMSG (T8). Depois do cultivo *in vitro*, todos os tratamentos resultaram em percentagens semelhantes de folículos pré-antrais viáveis. Após o cultivo *in vitro*, todos os tratamentos alcançaram percentuais similares da viabilidade de folículos pré-antrais. Os tecidos ovarianos cultivados na presença de EGF + BME + BMP4 + PMSG (T8) resultaram em um aumento da taxa de ativação e crescimento folicular quando comparado com outros tratamentos, bem como na regulação por AMH, BMP15 e GDF9, marcadores específicos do desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: folículos pré-antrais, macacos-prego, iodeto de propídio, qRT-PCR

1. Introdução

O avanço nas tecnologias reprodutivas tem sido focado na melhoria da qualidade de vida humana e da economia, melhorando a fertilidade masculina e feminina e aumentando da produção animal, respectivamente. Essas tecnologias incluem o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais, onde a grande maioria dos oócitos são encontrados. No entanto, essas tecnologias estão pouco desenvolvida em primatas não-humanos (Xu et al., 2011).

Uma das técnicas mais promissoras consiste no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (Figueiredo et al., 2011). Os folículos pré-antrais podem ser cultivados inclusos em tecido ovariano ou isolados. O primeiro tem a vantagem de manter os folículos dentro de uma estrutura tridimensional e em contato direto com as células do estroma. O desenvolvimento folicular *in vitro* pode ser avaliado por parâmetros morfológicos, caracterizando os folículos de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Portanto, os cálculos das taxas de folículo primordial, folículo primário e folículo secundário consistem em um método comumente utilizado para quantificar a ativação e o desenvolvimento folicular *in vitro*. No entanto, é importante salientar que não só a morfologia, mas também a funcionalidade dos folículos deve ser avaliada. Embora o uso de marcadores de viabilidade, como o iodeto de propídio, apareça como uma ferramenta para ajudar na avaliação folicular, apenas a análise molecular infere sobre a função dos folículos ovarianos pré-antrais (FOPAS). Como marcadores essenciais, fatores de crescimento, especificamente envolvidos no desenvolvimento folicular podem ser usados.

Ativação folicular, ou seja, a transição do estágio de folículo primordial para folículo primário é regulada por fatores de crescimento ovariano, entre eles o fator de célula-tronco ou c-Kit ligante (KL). O KL é expresso nas células da granulosa (Manova et al., 1993) e está envolvido no início do crescimento do oócito (Klinger e De Felici 2002). Tem sido demonstrado que KL é importante para a ativação de folículos primordiais (Nilsson et al., 2001). O hormônio Anti-Mülleriano (AMH) é expresso nas células da granulosa na transição de folículo secundário para folículo antral inicial e pode ser usado como um marcador do desenvolvimento folicular (Nilsson et al., 2011). O Fator de Diferenciação do Crescimento 9 (GDF9) e proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) são ambos expressos exclusivamente pelo oócito durante o desenvolvimento folicular (Paulini e Melo, 2011). BMP4, por sua vez, é expresso em células da teca, mas não em células da granulosa (Yamashita et al., 2011). Finalmente, o fator de Crescimento do Tecido

Conjuntivo (CTGF) é um regulador parácrino da mitose, expresso nas células do estroma e da granulosa (Harlow et al, 2002). Sua expressão pode informar a qualidade do estroma ovariano durante o cultivo *in vitro*.

Para desenvolver um sistema de cultivo *in vitro*, é importante definir a composição do meio. Para isso, um cultivo de folículo *in vitro* a curto prazo (24 horas) é adequado para uma primeira triagem. Entre todos os fatores que podem complementar um meio de cultivo de folículos pré-antrais, o fator de crescimento epidérmico (EGF) aparece como um composto necessário (Silva et al., 2004). Sobre os riscos de isquemia e estresse oxidativo subsequentes durante o cultivo, a suplementação do meio com um agente antioxidante pode melhorar a sobrevivência folicular. Em um estudo recente, o beta-mercaptoetanol (BME) foi utilizado com sucesso no cultivo de folículos pré-antrais de búfalo (Gupta e Nandi, 2010). A proteína morfogenética medular 4 (BMP-4) aumenta os níveis basais de estradiol (Yamashita et al., 2011), que afetam o desenvolvimento folicular pré-antrais *in vitro*. Uma fonte de gonadotrofina no meio de cultivo também é crucial. Portanto, o uso de gonadotrofina do soro de égua gestante (PMSG), que tem a função de FSH e LH pode melhorar o desenvolvimento folicular.

Nosso objetivo foi desenvolver um meio de cultivo para folículos pré-antrais de macacas-prego. A viabilidade folicular foi avaliada usando marcadores fluorescentes. O desenvolvimento folicular foi avaliado não apenas por alterações morfológicas, mas também pela expressão de genes que codificam AMH, BMP4, BMP15, CTGF, GDF9 e KL.

2. Material e Métodos

2.1 Produtos químicos

A não ser que seja mencionado, todos os produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, EUA).

2.2. Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local em Pesquisa Animal (nº.029/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS) e pelo Instituto Brasileiro de Vida Selvagem e Meio Ambiente (IBAMA). Oito ovários de fêmeas de macaca-prego saudáveis e sexualmente maduras (8 – 12 anos de idade, faixa de peso: 1.9 – 2.8 Kg) foram selecionados para nosso estudo. A dieta diária das fêmeas consistiu de frutas frescas e de ração comercial peletizada (FOXY Júnior Supremo, proteína bruta 28%; Provimi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Leite, vitaminas, minerais, e ovos foram fornecidos uma vez por semana. Água de torneira à vontade foi disponível. As fêmeas foram mantidas em ambientes fechados sob fotoperíodo natural e alojadas individualmente em gaiolas (80 x 90 x 80 cm) no Centro Nacional de primatas, Ananindeua, Pará, Brasil.

2.3. Coleta de tecido ovariano

Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia geral. Cada animal foi anestesiado com cloridrato de cetamina (10 mg / kg; IM; vetanarcol, Koning SA, Avellaneda, Argentina) e cloridrato de xilazina (1 mg / kg; IM; kensol, Koning SA) e mantidos sob anestesia inalatória (Halotano à 2%). As fêmeas foram colocadas em decúbito dorsal e biópsias dos ovários foram coletadas por laparoscopia exploratória. Para isso, uma incisão na pele na linha média ventral foi feita para ter acesso aos ovários, tal como descrito por Domingues et al. (2007). Para obter as amostras de tecido ovariano, usamos uma técnica “*trap door*” modificada (Santana et al., 2012). Resumidamente, foi realizado uma incisão circular de 1 mm de profundidade na superfície do tecido ovariano e um fragmento da cortical ovariana foi retirado utilizando uma lâmina Nº. 15 (Paramount Surgimed LTDA-New Delhi, Delhi, India). Não foi necessário realizar sutura na superfície do ovário, pois a hemostasia foi realizada pressionando suavemente uma gaze embebida com solução salina 0,9% (15 ° C) na área de incisão.

2.4. Delineamento experimental

Foi realizado biópsias em oito ovários, as biópsias do córtex ovariano foram divididas em nove fragmentos de 1 mm³. Após a conclusão do procedimento, um fragmento do ovário (controle) foi imediatamente dividido em duas partes iguais, uma parte foi submetida ao isolamento folicular e a análise de viabilidade, e a outra metade foi armazenado em 40 µl de RNAlater® (AMBIOM, fabricado por Applied Biosystems) e estocado a -20 °C até a extração de RNA. Os oito fragmentos restantes foram cultivados *in vitro* individualmente.

2.5. Cultivo *in vitro*

Os fragmentos do córtex ovariano foram colocados em placas de 24 poços contendo 1 ml de meio e cultivado por 24 horas. O meio de cultivo básico, também denominado de tratamento 1 (T1), foi constituído de TCM 199-Bicarbonato (pH 7,2-7,4) suplementado com 0,23 mM de piruvato, 100 ng/ml de Fator Crescimento Epidermal (EGF); 10% de Soro Fetal bovino; 50 µg/ml de Gentamicina, T2: meio de cultivo básico + 10 mM BME , T3: meio de cultivo básico + 100 ng / mL BMP4, T4: meio de cultivo básico + UI 25 de PMSG, T5: meio de cultivo básico +10 mM BME + 100 ng / ml BMP4, T6: meio de cultivo básico +10 mM BME + 25 UI PMSG, T7: meio de cultivo básico +100 ng / ml BMP4, 25 UI PMSG e T8: meio de cultivo básico + 10 mM BME + 100 ng / ml BMP4 + 25 UI PMSG (Figura 1). Depois do cultivo *in vitro*, todos os fragmentos foram divididos em duas partes iguais e submetidos ao isolamento folicular ou qRT-PCR.

2.6. Isolamento folicular

O isolamento folicular foi realizada de acordo com Santos et al. (2006a). Em resumo, depois de três lavagens em meio estéril, os fragmentos do ovário foram colocados em tubos de 2 ml, contendo 500 µl de TCM com Hepes, 200 UI / ml de penicilina, estreptomicina e 200 mg / ml, e foi completamente fragmentado com auxílio de uma tesoura. Os fragmentos foram homogeneizados 40 vezes em 3 ml de meio em um tubo de poliestireno utilizando um pipetado automático de 1000 µl, para separar os folículos. Este homogeneizado foi filtrado através de uma malha de nylon de 100 µm. Os folículos esféricas inferiores a 100 µm de diâmetro foram coletados sob um estereomicroscópio e transferidos para um novo tubo contendo TCM com tampão Hepes.

2.7. Avaliação da viabilidade dos folículos pré-antrais

Os folículos isolados foram incubados em TCM com tampão Hepes adicionado de 1% de albumina sérica bovina, iodeto de propídio e Hoechst 33342 por 10 min a 37 ° C para detectar a viabilidade folicular e permitir a contagem dos núcleos, respectivamente. Depois do período de incubação foram montadas lâminas de vidro com 30 µl da mistura e examinados em microscopia de epifluorescência equipado com uma câmera digital. Os oócitos e células da granulosa foram classificados como degenerados quando a cromatina foi corada positivamente por iodeto de propídio, e como viável quando cromatina não foi corada com iodeto de propídio. Os percentuais de células da granulosa viáveis foram calculados em relação ao número total de núcleos positivos ao Hoechst. Folículos com ovócitos viáveis e cercados por $\geq 90\%$ de células da granulosa viáveis foram considerados viáveis (Santos et al., 2006).

2.8. Ativação folicular e crescimento

Ativação folicular foi caracterizada de acordo com Silva et al. (2006). Resumidamente, o número de folículo primordial ou em desenvolvimento (primário e secundário) em cada fragmento foi calculado antes do cultivo (hora 0) e após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, a temperatura de 37 °C, em diferentes meios cultivo. Além disso, foi realizada a classificação e contagem dos folículos pré-antrais antes e depois do cultivo. Os estágios de desenvolvimento dos folículos viáveis foram classificados com base na morfologia das células da granulosa em torno do folículo: (1) Primordial: oócito rodeado por uma camada de células achatadas da pré-granulosa; (2) primário: oócito rodeado por uma camada de células da granulosa cuboídes; (3) secundário: oócito rodeado por duas ou mais camadas de células cuboídes da granulosa.

2.9. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando o Trizol reagente (Invitrogen, Carlsbad, CA). A concentração de RNA foi estimada pela leitura da absorbância a 260 nm e foi verificada a pureza a 280 nm em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample, NanoDrop, Wilmington, DE). Para cada amostra, as concentrações de RNA foram ajustados para 45 ng / µl e usado para sintetizar o cDNA. A transcrição reversa foi realizada num volume total de 20 µl, composto 10 µl de amostra de RNA, 2 µl tampão RT, 0,8 µl mistura de dNTP (100 mM), 2 µl primers aleatórios RT, 1 µl MultiScribe™

transcriptase reversa, 1 µl inibidor de RNase e 3,2 µl de água ultra-pura (High Capacity Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). A mistura foi incubada a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min e 4 °C por 8 min, e finalmente, armazenada a -20 °C. O controle negativo foi preparado nas mesmas condições, mas sem a adição do ácido nucleico.

2.10. PCR e determinação da estabilidade gene

A *qPCR* foi realizada utilizando um termociclador (ABI PRISM 7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems). Os primers escolhidos para realizar a amplificação dos diferentes genes são apresentados na Tabela 1. A eficiência da amplificação foi determinada utilizando o pacote de software LinRegPCR (Ruijter et al., 2010). Os dados foram analisados utilizando a eficiência corrigida do método Delta-Delta-Ct (Pfaffl, 2001). Os valores de amplificação dos genes que codificam AMH, BMP4, BMP15, CTGF, GDF-9, KL foram normalizados utilizando a média geométrica dos valores de amplificação dos dois genes de referência: HPRT1 e TBP (Brito et al, 2012). As reações de amplificação por PCR consistiu de desnaturação inicial e ativação da polimerase nos seguintes estágios: estágio 1 - 2 min a 50 °C, estágio 2 - 10 min a 95 °C, estágio 3 - 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 seg a 58 °C, 45 seg a 60 °C (extensão e Leitura dos dados), estágio 4 - 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e 15 s a 95 °C realizado em termociclador em tempo real (ABI PRISM 7500 Real Time PCR system, Applied Biosystems)

2.11. Análises de dados e estatística

A viabilidade dos oócitos e das células da granulosa foram analisadas pelo teste qui-quadrado, e os números totais de núcleos por folículo foram comparados por ANOVA one-way. Os dados moleculares foram calculados utilizando-se ANOVA e teste t não pareado. Em todos os casos, os testes estatísticos foram realizados usando o software Prism 4 (GraphPad). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todos os dados são apresentados em média \pm SEM, os erros padrões foram calculados a partir da variância entre as amostras.

3. Resultados

3.1. Viabilidade folicular, ativação e crescimento

No total, a viabilidade de 499 folículos pré-antrais (pelo menos 50 por tratamento) foram examinadas nos grupos dos folículos controles e nos vários grupos experimentais de folículos cultivados *in vitro*. A Figura 2 mostra imagens representativas de folículos pré-antrais viáveis e não viáveis. A porcentagem de folículos viáveis nos fragmentos de ovário controle (89,32%) não foi diferente ($P > 0,05$) daquelas observadas após o cultivo *in vitro*. Além disso, independente do tratamento, as porcentagens de folículos viáveis no cultivo *in vitro* de folículos não diferiram entre si (Figura 3). No entanto, as taxas de ativação folicular e subsequente crescimento foram significativamente aumentados quando PMSG foi adicionado ao meio de cultivo isoladamente ou em combinação com BME ou BME + BMP4 (Figura 4). A suplementação do meio com BMP4 + PMSG resultou em um aumento significativo nos percentuais de folículos secundários viável, mas não na ativação folicular significativa.

3.2. Expressão gênica

A Figura 5 mostra a expressão relativa dos genes que codificam marcadores do desenvolvimento folicular e qualidade estroma ovariano. A expressão gênica foi calculada com base no controle do cultivo *in vitro*, ou seja, o tratamento 1. A expressão dos genes que codificam CTGF e KL não foi afetada pela suplementação do meio de cultivo *in vitro*. A expressão do BMP4 foi significativamente aumentada apenas no tecido ovariano cultivado em meio suplementado com BMP4 sozinho ou quando o tecido ovariano foi cultivado em meio suplementado com BME + BMP4 + PMSG. Surpreendentemente, tanto o AMH quanto a o BMP15 tiveram suas expressões diminuídas significativamente quando o tecido ovariano foi cultivado em um meio suplementado apenas com BME, e suas expressões aumentada quando cultivados em meio suplementado com BME + BMP4 + PMSG. BMP15 teve a sua expressão diminuída em tecido ovariano cultivado em meio suplementado apenas com BMP4. O GDF9 teve sua expressão aumentada em tecido ovariano cultivado em meio suplementado com BME + BMP4 + PMSG.

4. Discussão

Este é o primeiro estudo relatando a ativação bem-sucedida e o crescimento de folículos pré-antrais de macacas-prego cultivado em curto período. Temos observado que, independentemente do meio de cultivo, a viabilidade folicular foi mantida semelhante aos valores do controle. Isso pode ser explicado pela presença de EGF no meio de cultivo. De acordo com Zhao e Zhang (2005), o EGF aumenta a taxa de sobrevivência de ovócitos cultivados *in vitro*, mas não a taxa de crescimento. O que apoia os nossos achados, em que a ativação folicular e desenvolvimento não foram observados quando o tecido ovariano foi cultivado na presença de EGF sozinho. Resultados semelhantes foram obtidos quando o tecido ovariano foi cultivado na presença de EGF + BME ou EGF + BMP4. Cultivo de tecido ovariano *in vitro*, na presença de EGF + BME + BMP4 não levou a ativação folicular, no entanto o crescimento folicular foi observado. Estes resultados já eram esperados por causa da função antioxidante do BME (Gupta e Nandi, 2010) que aumenta a atividade de estradiol pelo BMP4 (Yamashita et al., 2011) e o estradiol não está envolvido na ativação folicular. Suplementação no meio de cultivo com PMSG, no entanto, levou a uma diminuição significativa no percentual de folículos primordiais, seguido pelo aumento das taxas de folículos secundários. Gupta et al. (2002) demonstrando que o PMSG aumenta o desenvolvimento folicular *in vitro*.

Embora o uso de PMSG no meio de cultivo tenha resultado no aumento das percentagens de folículos pré-antrais morfológicamente desenvolvidos, a análise da expressão de mRNA refinou a avaliação dos folículos pré-antrais no presente estudo. Como a maioria dos genes alvos são especificamente expressos no oócito ou nas células da granulosa, avaliamos a expressão de genes que codificam AMH, BMP4, BMP15, CTGF, GDF9 e KL. O KL e o CTGF mantiveram-se inalterados nos diferentes meios de cultivos. Sendo explicadas por dois motivos: em primeiro lugar, o CTGF foi usado como um marcador da funcionalidade das células em geral. Sua expressão reduzida poderia implicar a morte de célula, enquanto a sua expressão aumentada poderia indicar mitose celular exagerada ou estaria relacionado com a formação de corpo lúteo (Wandji et al., 2000), o que não era esperado no presente estudo. Como a viabilidade folicular não foi alterada entre os tratamentos, a expressão de CTGF inalterada em todos os meios testados, consiste em um resultado lógico. Em segundo lugar, a expressão aumentada do KL está relacionada à ativação de folículos primordiais (Nilsson et al., 2001). No entanto, no presente estudo, a ativação de folículos primordiais foi acompanhada pelo crescimento de folículos primários

para o estágio de secundário, o que pode ter subestimado a expressão relativa do gene que codifica o KL. O aumento da regulação de BMP4 no tecido ovariano cultivado na presença de BMP4 só ou em combinação de BMP4 + BME + PMSG sugere duas explicações diferentes. A primeira é que a adição de BMP4 sozinho no meio de cultivo pode ter interferido na expressão de mRNA de BMP4. A segunda sugere que os folículos estavam se desenvolvendo e ativamente funcionais. Tal afirmação é confirmada pelo aumento da expressão de AMH, BMP15 e GDF9 quando o meio foi suplementado com BME + BMP4 + PMSG, resultado também encontrado por Gupta et al. (2002) na combinação de PMSG com antioxidantes (selênio). Embora a formação de folículos secundários tenha sido observada em outros tratamentos, a análise da expressão gênica mostrou que os sinais morfológicos do desenvolvimento, juntamente com testes de viabilidade não asseguram a função folicular normal. Uma assincronia no desenvolvimento do oócito e das células da granulosa (Nottola et al., 2008) pode ocorrer durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, podendo comprometer a qualidade folicular e seu desenvolvimento futuro.

5. Conclusões

Foi demonstrado neste trabalho que os folículos pré-antrais são capazes de desenvolver *in vitro* quando cultivados por 24 horas em um meio suplementado com PMSG + BME + BMP4. A viabilidade folicular, no entanto, foi mantida de forma independente do meio de cultivo. O uso de fatores de crescimento como marcadores de desenvolvimento folicular foi crucial para identificar o melhor meio de cultivo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo projeto n ° 483439/2009-6 do CNPq, Brasil. Os autores agradecem ao CENP pelo apoio logístico.

Referências

- Brito AB, Lima JS, Brito DC, Santana LN, Costa NN, Miranda MS, Ohashi OM, Santos RR, Domingues SFS. Validation of reference genes for ovarian tissue from capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Zygote* 2012 05:01-05,
- Domingues SF, Caldas-Bussiere MC, Martins ND, Carvalho RA. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). *Theriogenology* 2007 68:1251-9.
- Gupta PS, Nandi S. Viability and growth of buffalo preantral follicles and their corresponding oocytes in vitro: effect of growth factors and betamercaptoethanol. *Reprod Domest Anim.* 2010 45:147-54.
- Gupta PS, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV. In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology.* 2002 57:1839-54.
- Harlow CR, Davidson L, Burns KH, Yan C, Matzuk MM, Hillier SG. FSH and TGF-Superfamily Members Regulate Granulosa Cell Connective Tissue Growth Factor Gene Expression *in Vitro* and *in Vivo*. *Endocrinology* 2011 143:3316–3325
- Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P, Bachvarova RF. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 1993 157:85–99.
- Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001 175:123–30.
- Nilsson E, Schindler R, Savenkova MI, Sninner MK. Inhibitory Actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on Ovarian Primordial Follicle Assembly. 2011 6:01-10
- Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Correr S, Donnez J. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril.* 2008 90:23-32.
- Paulini F, Melo EO. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. *Reprod Dom Anim* 2011 46:354–61.
- Santana LN, Brito AB, Brito DC, Lima JS, Domingues SFS, Santos RR. Adaptation of a *trap door* technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey). *Zygote* 2012 32:09-15

Silva JR, van den Hurk R, de Matos MH, dos Santos RR, Pessoa C, de Moraes MO, de Figueiredo JR. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. 2004 61:1691-704.

Wandji SA, Gadsby JE, Barber JA, Hammond JM. Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. *Endocrinology*. 2000 141:2648-57.

Xu M, Fazleabas AT, Shikanov A, Jackson E, Barrett SL, Hirshfeld-Cytron J, Kiesewetter SE, Shea LD, Woodruff TK. In vitro oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. *Biol Reprod*. 2011 84:689-97.

Yamashita H, Murayama C, Takasugi R, Miyamoto A, Shimizu T. BMP-4 suppresses progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of StAR in bovine granulosa cells in vitro. *Mol Cell Biochem* 2011 348:183–90.

Zhou H, Zhang Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. *Anim Reprod Sci*. 2005 90:265-72

Legendas das figura

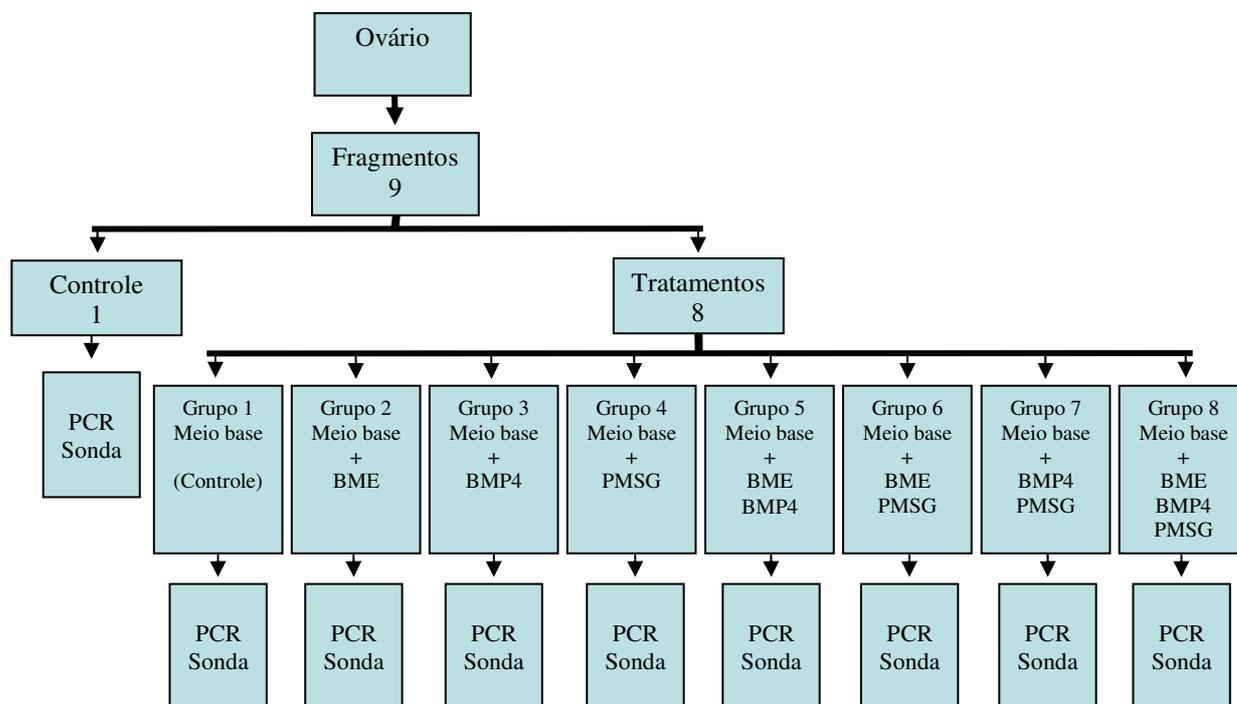


Figura 1. Delineamento da coleta dos fragmentos ovarianos, arranjos dos tratamentos e técnicas empregadas na avaliação dos tratamentos. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sonda de Fluorescência

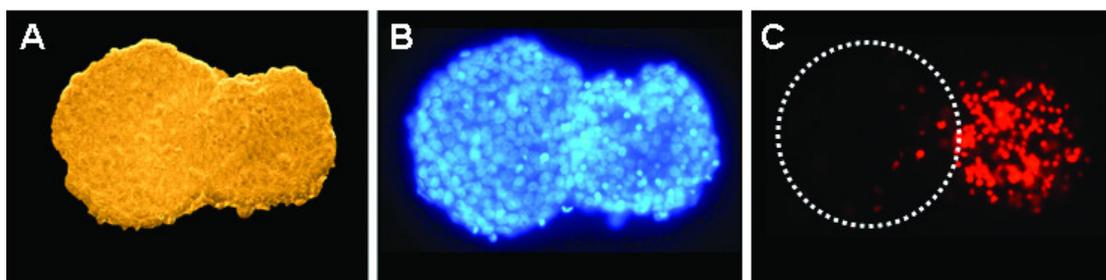


Figura 2. Imagens representativas dos folículos pré-antrais de maca-prego antes (A) e após (B, C) coloração com Hoechst (azul; coloração nuclear geral) e iodeto de propídio (vermelho, Cora células mortas). Ausência de coloração por iodeto propídio nos folículos indica sua viabilidade. × 400

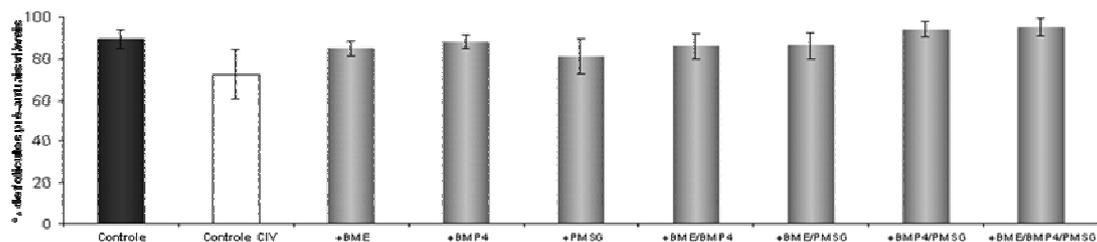


Figura 3. Porcentagens de folículos pré-antrais viáveis em fragmentos controle e nos fragmentos submetidos a cultivo *in vitro* no meio controle sozinho ou suplementado com BME, BMP4 ou PMSG sozinho ou em combinação. Não foram observadas diferenças significativas

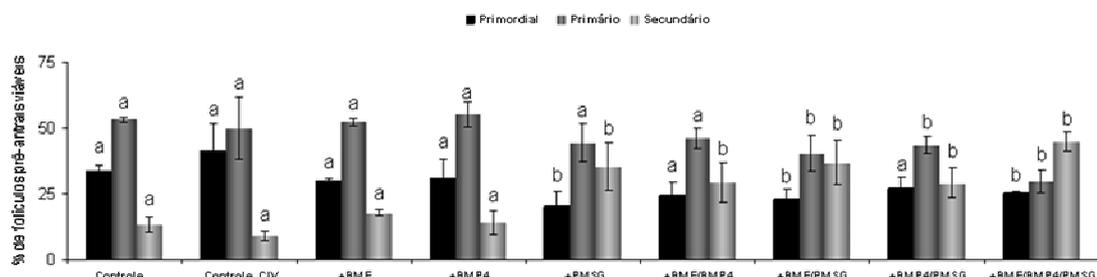


Figura 4. Taxas de folículos primordiais, primários e secundários viáveis, antes e após o cultivo *in vitro*. Folículos foram considerados viáveis quando um oócito viável estava cercado por $\geq 90\%$ de células da granulosa viáveis. Diferentes letras (^{a,b}) indicam diferenças significativas entre os grupos controle e os tratamentos ($P < 0,05$)

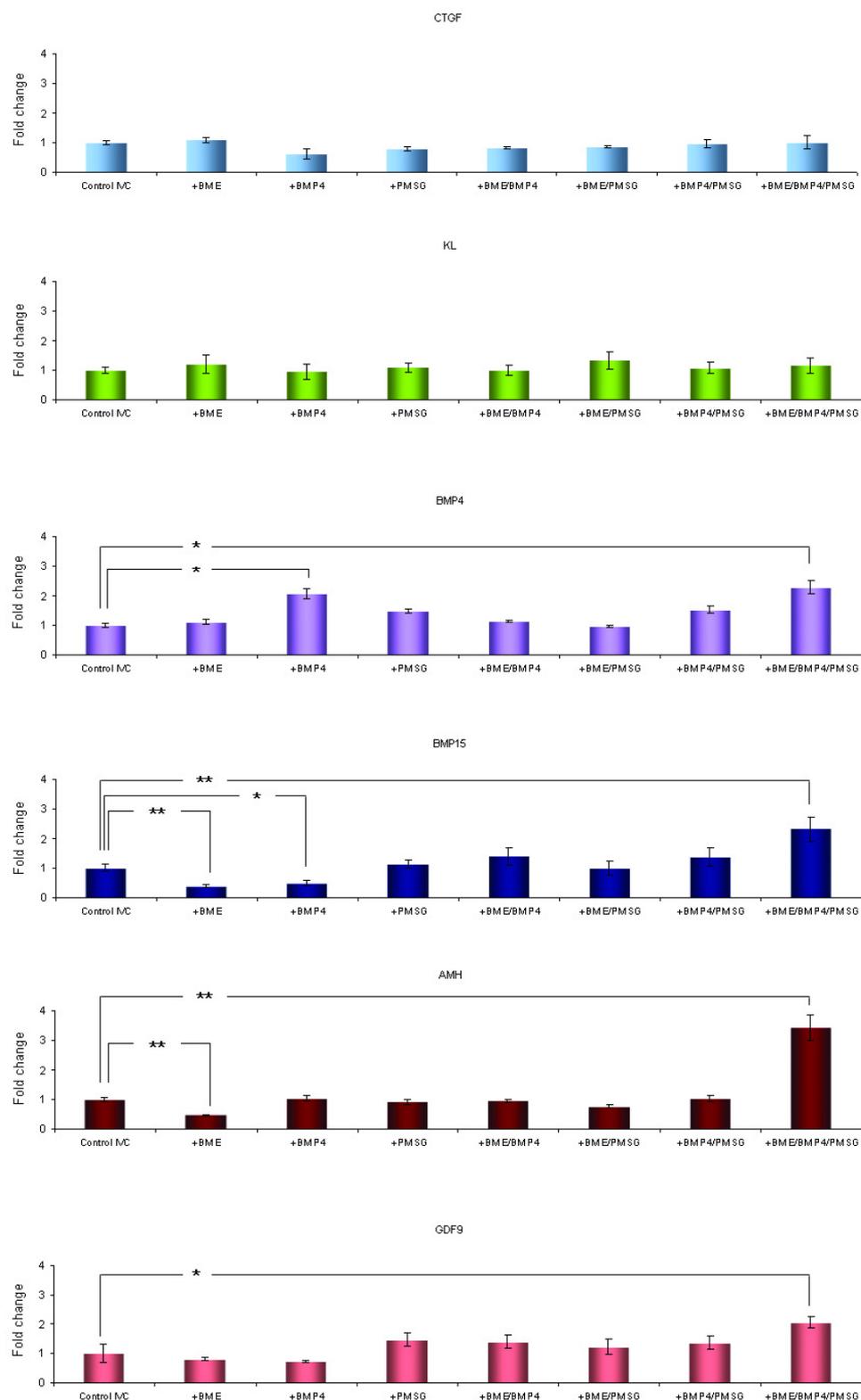


Figura 5. Comparação entre expressão relativa média de AMH, BMP4, BMP5, CTGF, GDF9 e KL em tecido ovariano do grupo controle e tecido ovariano cultivado *in vitro* na presença de BME, BMP4 ou PMSG, isoladamente ou em combinação. As variações foram quantificadas por análises de qRT-PCR. * P < 0,05; ** P < 0,01.

Table 1. Pares de primers utilizados em qRT-PCR para quantificação de referência e alvo genes no tecido ovariano de macacas-prego.

Gene	nº. de acesso	Sequência	Tamanho do fragmento (bp)	Posição do primer	Referência
HPRT1	S43335.1	5'- TTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT 3'- TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC	107	59	Brito et al., 2012
TBP	AB178959.1	5'- TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA 3'- CACATCACAGCTCCCCACCA	132	889	Brito et al., 2012
AMH	XM_002761553.1	5'- CTGCTGCGTGCCACCCGCTA 3'- CAGCCACACTCGGTGGCCAC	106	1575	This paper
BMP4	XM_002805069.1	5'- CGAGAGAGACGCAGACGCAGA 3'- AATGGCTCCATGTTCCCGAG	82	56	This paper
BMP15	XM_001083980.2	5'- GCCACTGTGGTTTACCGCCA 3'-GGGAAGGTTTTGAGGAATCTCCTTC	130	446	This paper
CTGF	NM_001901.2	5'- TGCATCTTCGGTGGCACG GT 3'- ATGCTGCACAGGGGCATGCA	110	513	This paper
GDF9	NM_001168763.1	5'- GCCTTCCCAGGGTCCTGACCA 3'- TGACCTCTGCGGTGACGGTGA	105	861	This paper
KL	NM_003994.5	5'- GCTCGGGCTACCCAATGCGTG 3'- CGCTGCGATCCAGCACAAACAG	112	72	This paper

6 CONCLUSÃO

Na exposição à crioprotetores, a fresco e no o cultivo de tecidos de córtex ovariano de *S. apella*, os genes de referencia HPRT1 e TBP, são mais estáveis. Os folículos pré-antrais são capazes de desenvolverem-se *in vitro* quando cultivados em meio suplementado com PMSG, BME e BMP4. A viabilidade folicular, entretanto, permaneceu independentemente do meio de cultivo *in vitro* e o uso de fatores de crescimento, como marcadores de desenvolvimento folicular, foi crucial para identificar o melhor meio de cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, C.R. Alternative New World Primate Models for Non-AIDS Research. **ILAR. J.**, v. 44, p.231-235, 2003.

ABEYDEERA, L.R. et al. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 50, p. 747–756. 1998.

ANDRADE, E.R. et al. Interactions of índole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, p.1104-1113, 2005.

ANDERSEN, C.L., JENSEN, J.L., ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer. Res.**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis. 1995. p. 168.

BAKER, T.G.; WAI, S.O. Developmental of the ovary and oogenesis. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 3, p. 23-26, 1976.

BENNETT, R.A.; OSATHANONDH, R.; YEH, J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β , epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in the human fetal ovary. **J. Clin. Endoc. Metab.**, v. 81, p. 3073–3076. 1996.

BEZERRA, M.B.; RONDINA, D; OLIVEIRA, L.C. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciênc. Anim.**, v. 8, p. 30-34, 1998.

BODART, J.F.L. et al. Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. **Dev. Biol.**, v. 245, p. 348-361, 2002.

BRITO, A.B. et al. Validation of reference genes for ovarian tissue from capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Zygote**, v. 05, p. 01-05, 2012.

CAIN, L.; CHATTERJEE, S.; COLLINS, T.J. *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. **Endocrinology**, v.136, p. 3369–3377, 1995.

CECCONI, S. et al. *In Vitro* Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian Tissue. **Biol. of Reprod.**, v. 70, p. 12–17, 2004.

CLARKSON, T.B. et al. Atherosclerosis in new world monkeys. **Primates. Med.**, v. 9, p. 90-144, 1976.

DELMAN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992. 629 p.

DE LUCA, R.R. et al. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Rothschild, 1990. 259 p.

DIERICH, A. et al. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.13612–13617, 1998.

DINIZ, L.S.M. **Primatas em cativeiro: manejo e problemas veterinários: enfoque para espécies neotropicais**. São Paulo: Ícone, 1997. p. 196.

DOMINGUES, S.F.S. **Isolamento mecânico e estudo histológico de folículos ovarianos em primatas não-humanos da espécie *Cebus apella* (macaco-prego)**. 2000. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2000.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Biologia reprodutiva da espécie *Cebus apella* (Macaco-prego). **Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.**, v. 5, p. 55–57, 2002.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v.55, p.301-308, 2003.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. **Acta Amazonica**, v.34, p.495-501, 2004.

DOMINGUES, S.F.S. **Estudo da oogênese e foliculogênese *in vivo* na fase antral em primatas neotropicais da espécie *Cebus apella*: aspectos bioquímicos e estruturais**. 2005. 135f. Tese (Doutorado em Produção animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ, 2005.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Ver. Bras. Reprod. Anim.**, v.30, p. 57-71, 2006.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys), **Theriogenology**, v. 68, p. 1251-1259, 2007.

DRIANCOURT, C.A.; THUEL, B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. **Reprod. Nut. Dev.**, v. 38, p. 345-362, 1998.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A.K.; MATZUK, M. M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endoc. Rev.**, v. 30, p. 624–712, 2009.

EDWARDS, S.J. et al. The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. **Endocrinology**, v. 149, p. 1026–1030, 2008.

ERIC, E.N.; MICHAEL, K.S. Bone Morphogenetic Protein-4 Acts as an Ovarian Follicle Survival Factor and Promotes Primordial Follicle Development. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 1265–1272, 2003.

ERICKSON, G.F. Na analysis of follicle development and ovum maturation. In: SEMINARS IN REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY, 1986, San Diego, Califórnia. **Anais...** San Diego, Reproductive Endocrinology, 1986, p. 233-254.

ERICKSON, G.F. Role of Growth Factors in Ovary Organogenesis. **J. Soc. Gynecol. Invest.**, v.8, p.13-16, 2001

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fert. Ster.**, v. 76, p. 943-949, 2001.

FIGUEIREDO, J.R. et al. In vitro development of isolated bovine preantral follicles. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. 25, 1: 93-106, 1997.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos – MOIFPA. In: GONSALVES, P.B.D, FIGUEIREDO, J.R.F.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 227-260.

FIGUEIREDO, J.R., et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo, SP: Roca, 2008. p. 303-327.

FINDLAY, J.K. et al. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-b superfamily. **Mol. Cell. Endo.**, v. 191, p. 35-43, 2002.

FINK, T. et al. Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure. **BMC Mol. Biol.**, v. 9, p. 98, 2008.

FLAWS, J.A. et al. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1233–1237, 1997.

FLEAGLE, J. G. **Primate adaptation and evolution**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press. 1999. 596 p.

FOLDAGER, C.B. et al. Validation of suitable house keeping genes for hypoxia-culture human chondrocytes. **BMC Mol. Biol.**, v. 10, p. 94, 2009.

FORTUNE, J.E. et al. Follicle selection in domestic ruminants. **J. Reprod. Fertil.**, v. 43, p. 187-198, 1991.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E. et al. The primordial to primary follicle transition. **Mol. Cell. Endo.**, v. 163, p. 53-60, 2000.

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

FRAGASZY, D.M.; ADAMS-CURTIS, L. Growth and reproduction in captive tufted capucins (*Cebus apella*). **Am. J. Primatol.**, v. 44, p. 197-203, 1998.

FROTA, I.M. et al. Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 71-83, 2011

FUNAHASHI, F. Effect of beta-mercaptoethanol during in vitro fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development in vitro. **Reproduction**, v. 130, p. 889–898. 2005.

GILCHRIST, R.B. et al. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset. **Biol. Reprod.** V. 64, p. 127-135, 2001.

GOUGEON, A; CHAINY, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **J. Reprod. Fert.**, v. 81, p. 433-442, 1987.

GOUGEON, A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. **Maturitas**, v. 30, p. 137–142, 1998.

GUBERN, C. et al. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. **BM C. Mol. Biol.**, v. 10, p. 57, 2009.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. **Human. Reprod. Update.**, v. 7, p. 175–189, 2001.

GUPTA, P.S.P. et al. In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology**, v. 57, p. 1839-1854, 2002.

GUPTA, P.S.P.; NANDI, S. Viability and Growth of Buffalo Preantral Follicles and their Corresponding Oocytes *In Vitro*: Effect of Growth Factors and b Mercaptoethanol. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 45, p. 147-154, 2010.

HARLOW, C.R. et al. FSH and TGF-Superfamily Members Regulate Granulosa Cell Connective Tissue Growth Factor Gene Expression *in Vitro* and *in Vivo*. **Endocrinology**. V. 143, p. 3316–3325, 2011.

HEARN, J. New word primates for research in human reproduction health. **Am. J. Primatol.**, v. 34, p. 11-17, 1994.

HENDERSON, C.J.; BRAUDE, P.; AITKEN, R.J. Polyclonal antibodies to a 32 kDa deglycosylated polypeptide from porcine zonae pellucidae will prevent human gamete interaction *in vitro*. **Gamete. Res.**, v. 18, p. 251–265, 1987.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Internat. Review. of cytology.**, v. 35, p. 43-101, 1991.

HUGGET, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes. Immun.**, v. 6, p. 279-284, 2005.

HULSHOF, S.C.J. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Veter. Quart.**, v. 2, p. 78-80, 1994.

ISACHENKO, V. et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, v. 138, p. 319-327, 2009.

JESSICA, W. et al. Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. **J. Biogeogr.**, v. 39, p. 272-288, 2012.

JIN, S. et al. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. **Fertil. Steril.**, v. 93, p. 2627-2632, 2010.

KOPITZ, A. et al. Differential stability of TATA box binding proteins from archaea with different optimal growth temperatures. **Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, p. 73, p. 799-804, 2009.

LI, Y.L. et al. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. **Anal. Biochem** v. 394, 110-116, 2009.

LINN, G.S. et al. Social and menstrual cycle phase influence on the behavior of group – housed *Cebus apella*. **Am. J. Primat**, v. 35, p. 41–57, 1995.

LINTERN-MOORE, S. et al. Follicular development in the infant human ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v. 39, p. 53- 64, 1974.

LINTERN-MOORE, S.; MOORE, G. P. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. **Biol. Reprod.**, v. 20, p. 773-778, 1979.

LUCAS, E.S. et al. Tissue-specific selection of reference genes is required for expression studies in the mouse model of maternal protein undernutrition. **Theriogenology**, v. 76, p. 558-569, 2011.

MACKLON, B.C; FAUSER J.M. Follicle development during the normal menstrual cycle. **Maturitas**, v.30, p. 181–188, 1998.

MANOVA, K. et al. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. **Dev. Biol.**, v. 157, p. 85–99, 1993.

MARTINS, N. D. **Análises preliminares do ciclo reprodutivo de fêmeas de macaco-prego (*Cebus apella*) criadas em cativeiro através do estudo colpocitológico diário utilizando dois métodos de coloração: panótico rápido e papanicolau.** 2004. 35 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal do Pará, 2004.

MARTINS, F.S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 32, p. 36-49, 2008.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. **Mol. Cel. Endo.**, v.161, p. 19-23, 2000.

McLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.163, p. 3–9, 2000.

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

Meldgaard, M. et al. Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology. **J. Neurosci. Methods**, v. 156, p. 101–110, 2006.

MEREDITH, S. et al. Unilateral ovariectomy increases loss of primordial follicles and is associated with increased metestrous concentration of follicle-stimulating hormone in old rats. **Biol. Reprod.**, v. 47, p. 162–168, 1992.

MONGET, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p.139–154, 2002.

MONNIAUX, D. *et al.* Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **J. Reprod. Fertil. Supplement.**, v. 51, p. 3 –23, 1997.

MOTTA, P.M.; MAKABE, S.; NOTTOLA, S.A. The Ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. **Hum. Reprod. Update.**, v. 3, p. 281-295, 1997.

MONTGOMERY, G.W. et al. Genes controlling ovulation rate in sheep. **Reproduction**, v. 121, p.843–852, 2001.

MORBECK, D.E.; FLOWERS, W.L.; BRITT, J.H. Response of Porcine Granulosa Cells Isolated from Primary and Secondary Follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and EGF *in vitro*. **J. Reprod Fertil.**, v.99, p.577-584, 1993.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, p. 5104–5109, 2001.

NAGLE, C.A. et al. The plasma pattern of ovarian steroids during the menstrual cycle in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Biol. Reprod.**, v. 21, p. 979-983. 1979.

NAGLE, C.A. et al. Temporal Relationship Between Follicular Development, Ovulation and Hormonal Profile in the Capuchin Monkey (*Cebus apella*). **Biol. Reprod.**, v. 23, p. 629-635. 1980.

NASHTA, A.A.F; WADDINGTON, D; CAMPBELL K.H.S. Maintenance of Bovine Oocytes in Meiotic Arrest and Subsequent Development *In Vitro*: A Comparative Evaluation of Antral Follicle Culture with Other Methods. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 255-262, 1998.

NAYUDU, P.L; WU, J; MICHELMANN, H.W. In vitro development of marmoset monkeys oocytes by pre-antral follicle culture. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 38, p. 90-96, 2003.

NILSSON, E.E.; PARROTT, J.A, SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.** v. 175, p. 123–130, 2001.

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

NILSSON, E.; ROGERS, N.; SKINNER, M.K. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. **Reproduction**, v. 134, p. 209–221, 2007.

NILSSON, E.E. et al. Inhibitory Actions of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on Ovarian Primordial Follicle Assembly. **FLoS. One.**, v. 6, p. 1-10, 2011.

NOTTOLA, S.A. et al. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. **Fertil. Steril.**, v. 90, p. 23-32, 2008.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University press., 1991. p. 454-457.

OETTING, J. et al. Individual differences in response of to a novel environment in *Cebus apella*. **Am. J. Primatol.**, v. 33, p. 231-232, 1994.

ORTIZ, M.E et al. Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with postfertilization events in the new world monkey *Cebus apella*. **Hum Reprod**, v. 19, p 1352-1356, 2004.

ORTIZ, R.E. et al. Cytologic, hormonal, and ultrasonographic correlates of the menstrual cycle of the new world monkey *Cebus apella*. **Am. J. Primatol.**, v. 66, p. 233-244. 2005.

PAULINI, F; MELO, E.O. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 46, p. 354–361, 2011.

PEREDA, J.; ZORN, T.; SOTO-SUAZO, M. Migration of Human and Mouse Primordial Germ Cells and Colonization of the Developing Ovary: An Ultrastructural and Cytochemical Study. **Microsc. Res. Tech.**, v. 69, p. 386–395, 2006.

PFAFFL, M.W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol. Lett**, v. 26, p. 509-515, 2004.

PHILLIPS, K. A. et al. Behavior estrus in *Cebus apella*. **Am. J. Primatol.**, v. 27: p. 51-55, 1992.

REDFORD, K.H. The empty forest. **Bioscience**, v. 42, p. 412-422, 1992.

RICHARD, R. et al. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertil. Steril.**, v. 83, 1248- 1254, 2005

RODRÍGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, v. 61, p. 1499-1511, 2004.

RODRIGUES, P. et al. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Res.**, v. 56, p. 103–11, 2005.

RODRIGUES, P. et al. *In Vitro* Culture of Cryopreserved Caprine Ovarian Tissue Pieces and Isolated Follicles. **Cell. Preserv. Technol.**, v. 4, p 290-298, 2006.

SANTANA, L.N. et al. Adaptation of a *trap door* technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey). **Zygote**, v. 5, p. 1-4, 2012.

SANTOS, R.R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 32, p. 9-15, 2008.

SAUMANDE, J. Ovogênese et Folliculogênese. **Rec. Méd. Vét.** v. 157, p. 29-38, 1981.

SAUMANDE, J. La Folliculogênese Chez les Ruminants. **Rec. Vet.**, v.167, p. 205-218, 1991.

SEOUL, D. et al. Selection of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in organ culture of the rat and rabbit intervertebral disc. **BMC Res. Notes**, v. 26, p. 162, 2011.

SHIMASAKI, S. et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, p. 7282–7287, 1999

SILVA JR, J.S. **Especiação nos macacos-prego e caiararas, gênero Cebus Erxleben, 1777 (Primates, Cebidade)**. 2001. 377 f, Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2001.

SILVA JR, J.S. Taxonomy of capuchin monkeys, *Cebus Erxleben, 1777*. **Neotropical Primates**, v. 10, p. 29, 2002.

SILVA, J.R.V. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691–1704, 2004.

SILVA, R.V.; VAN DEN HURK; R.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. **Zygote**, v.14, p. 107-117, 2006.

SONGSASEN, N.; APIMETEETUMRONG, M. Effects of betamercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** v. 71, p. 193–202, 2002.

SUN, R.Z. et al. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. **J. Mol. Histol.**, v. 41, p. 325-332, 2010.

SVINGEN, T. et al. Identification of suitable normalizing genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in fetal mouse gonads. **Sex. Dev.**, v. 3, p. 194-204, 2009.

TAKAHASHI, M. et al. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 562-567, 2002.

TANWAR, P.S.; O'SHEA, T.; MCFARLANE, J.R. *In vivo* evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 106, p. 232-240, 2008.

TAY, J.; HODGMAN, R.; RICHTER, D. The control of cyclin B1 mRNA translation during mouse oocyte maturation. **Dev. Biol.**, v. 221, p. 1-9, 2000.

TEILMANN, S.C. Differential expression and localization of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. **Mol. Cell. Endo.**, v. 234, p. 27-35, 2005.

VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. **Anim. Reprod.**, v. 6, p. 72-95, 2009.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1775, 2005.

VANDERSOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, RESEARCH0034, 2002.

VAUGHAN, T. A. Order primates. In: VAUGHAN, T.A. **Mammalogy**. Northern Arizona University: Flagstaff, 1985. p. 138-143.

WANDJI, S.A. et al. Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. **Endocrinology**, v. 141, p. 2648-2657, 2000.

WANDJI, S.A.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M.A. Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 46, p. 1034-1041, 1992a.

WANDJI, S.A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of 125 I-labeled basic fibroblast growth factor and 125 I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.**, v. 47, p. 807-813, 1992b.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP Kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 66, p. 175-184, 2001.

WRIGHT, E.M.; BUSH, D.E. The reproductive cycle of the Capuchin (*Cebus apella*). **Lab. Anim. Sci.**, v. 27, p. 651-654, 1977.

WRIGHT, P.C.; JERNVALL, J.; RAKOTONARINA, G. Ontogeny of tooth wear of *Propithecus diadema edwardsi* in relation to seed predation. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PRIMATOLOGICAL SOCIETY, 15, 1994, Bali - Indonesia. **handbook and abstracts**, 1994. p 364.

WOLF, D.P. et al. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1766–1771, 2004a.

WOLF, D.P. et al. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. **Biol. Reprod.**, v.71, p.486-493, 2004b.

XU, J. et al. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. **Reproduction**, v. 140, p. 685 – 697, 2010.

XU, M. et al. Encapsulated Three-Dimensional Culture Supports Development of Nonhuman Primate Secondary Follicles. **Biol. Reprod.**, v. 81, p. 587–594, 2009

XU, M. et al. In vitro oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 84, p. 689-697, 2011.

Yamashita, H. et al. BMP-4 suppresses progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of StAR in bovine granulosa cells in vitro. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 348, p. 183–90, 2011.

YI, S.E. et al. The type I BMP receptor *Bmpr1B* is essential for female reproductive function. **Proc. Natl .Acad. Sci. U S A**, v. 98, p. 7994–7999, 2001.

ZHAO, J. et al. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 967-977, 2001.

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