



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

HENRIQUE ALBANO NOGUEIRA GOMES

**EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP15) NO CULTIVO *IN*
SITU DE TECIDO OVARIANO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1958)**

MOSSORÓ

2019

HENRIQUE ALBANO NOGUEIRA GOMES

EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP15) NO CULTIVO *IN SITU* DE TECIDO OVARIANO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1958)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Márcia Viviane Alves Saraiva, Profa. Dra.

Coorientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2019

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

G633e Gomes, Henrique Albano Nogueira.
EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15
(BMP15) NO CULTIVO IN SITU DE TECIDO OVARIANO DE
CATETOS (Pecari Tajacu LINNAEUS, 1958) / Henrique
Albano Nogueira Gomes. - 2019.
74 f. : il.

Orientadora: Márcia Viviane Alves Saraiva.
Coorientador: Alexandre Rodrigues Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2019.

1. Tayassuidae. 2. Folículos Primordiais. 3.
Ativação Folicular. 4. Biobanco. 5. Vida Selvagem.
I. Saraiva, Márcia Viviane Alves, orient. II.
Silva, Alexandre Rodrigues, co-orient. III.
Título.

HENRIQUE ALBANO NOGUEIRA GOMES

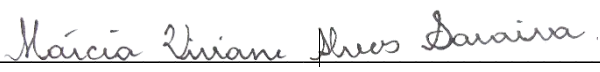
EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 15 (BMP15) NO CULTIVO *IN SITU* DE TECIDO OVARIANO DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNAEUS, 1958)

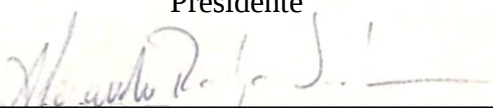
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

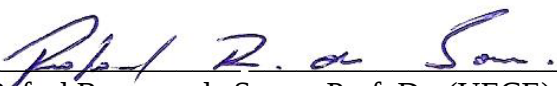
Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: 26 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA


Márcia Viviane Alves Saraiva, Profa. Dra. (UFERSA)
Presidente


Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador Interno


Rafael Rossetto de Sousa, Prof. Dr. (UECE)
Membro Examinador Externo

*A Henrique Ferreira Lima (In Memorian),
meu bisavô de quem herdei meu primeiro
nome e vontade de viver. Fonte de
inspiração e de garra ao trabalho contínuo.*

*A Maria Albaniza Nogueira Félix (In
Memorian), de quem herdei meu segundo
nome e a quem sou eternamente grato por
todas as lições ensinadas (mesmo sem falar
e andar) a toda família.*

A minha família: meu irmão Venilton
Gomes da Silva Júnior, a minha mãe Ana
Maria Nogueira da Silva, e ao meu pai
meu pai Venilton Gomes da Silva. Que
foram meu suporte, meus amigos. Que
tanto me apoiaram e almejaram o meu
crescimento.

Ao meu filho, Luan Félix Gomes, aquele
que é motivo de saudade diária e que me
dá forças pra lutar e ser cada vez melhor
que ontem.

AGRADECIMENTOS

A inteligência suprema, que nos acompanha nessa eterna caminhada em busca do autoconhecimento. Agradeço a todos os meus guias e aos amigos dessa e outras dimensões pelas mensagens, instruções e companhia.

Ao meu filho, Luan Félix Gomes, por toda responsabilidade que veio junto com seu nascimento e que só me fizeram crescer. Agradeço pelo sorriso, pelos abraços e por cada minuto que passo com você. Se eu tenho motivo para lutar e vencer, sem dúvidas você é o número um.

Aos meus pais, Venilton Gomes da Silva e Ana Maria Nogueira Félix, que sempre lutaram para me dar a oportunidade de ter a melhor educação possível. Por todo esforço e confiança no meu potencial, pelo amor incondicional, carinho e preocupações. Pais melhores não poderiam existir. Ao meu irmão, Venilton Gomes da Silva Júnior, pela amizade incondicional, pelas conversas, brincadeiras e todos os momentos juntos que só melhores irmãos/amigos sabem como funciona.

A Denilsa Pires Fernandes, minha namorada, amiga e companheira. Por todos os momentos felizes e pelo incentivo diário a sempre seguir em frente. Obrigado por acompanhar de perto todo o meu desenvolvimento desde a graduação, quando éramos colegas de trabalho.

A minha orientadora, Professora Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva. Por me acolher como aluno/orientado e confiar em mim. Por todos os ensinamentos tanto no âmbito acadêmico como moral. Pela enorme paciência que teve comigo em vários momentos e pelas broncas quando precisei. Pelo incentivo mesmo quando estávamos bastante desgastados com o trabalho. Obrigado por ser um exemplo a ser seguido como professora e pesquisadora.

A todos os meus familiares que sempre torceram por mim. Agradeço, Pelo orgulho e admiração que têm por mim mesmo sem entender direito o que eu faço na pesquisa. Muito obrigado as minhas tias, avós, primos e agregados. Em especial a minha tia Rita Welma Nogueira Félix Barbosa, minha tia madrinha Maria Vanilda da Silva Cavalcante e meus avós Maria Ferreira da Silva e Vital Gomes da Silva.

A todos os meus amigos tanto os presentes como aqueles que porventura das circunstâncias perdi o contato. Em especial, a meu amigo do peito Rodrigo Firmino Rodrigues, um irmão que tive a sorte de encontrar. E aqueles que conheci longe da minha cidade natal, meus agradecimentos a Paulo Henrique Gomes Santana, Herbet Filipe dos Santos Sousa, Sheila Tiemi Nagamatsu, Kamilla Karen Carvalho e Ysla Christine da Silva.

A todos os colegas de mestrado nas disciplinas e aos companheiros de trabalho na parte experimental do projeto, pelo aprendizado, dedicação e ajuda. Por todos os estresses e também pelos momentos alegres na rotina da pesquisa, todos serviram de aprendizado mútuo. O tempo foi curto, mas sem dúvidas, todos tiveram sua parcela fundamental de importância, tanto para esse trabalho como no meu crescimento pessoal. Muito obrigado a Lívia Batista Campos, por me ensinar e me orientar nos primeiros contatos com o cultivo e por estar sempre disponível. Érica Camila Gurgel Praxedes, por dividir algumas tarefas nos momentos em que não pude estar presente. A Fernanda Araujo dos Santos e Luã Barbalho de Macêdo companheiros de trabalho e amigos que me auxiliaram desde os experimentos da graduação.

A toda equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da UFERSA em especial ao professor Dr. Alexandre Rodrigues Silva, pelo tempo dedicado e por todo suporte oferecido na elaboração, financiamento e execução do projeto.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal, principalmente a professora Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, por nos ceder o espaço e equipamentos para realizar o cultivo. Agradeço também a toda equipe do laboratório de Histologia e Morfofisiologia Animal, em especial ao professor Dr. Moacir Franco de Oliveira pelo auxílio prestado com os animais experimentais e pelo espaço para realização do processamento histológico. Desejo a todos força e motivação para continuar exercendo a mais importante das profissões, mesmo quando o incentivo no nosso país seja tão pequeno.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e me ajudaram, mesmo que da menor forma possível, com uma palavra, um gesto ou uma atitude. As pequenas coisas, muitas vezes causam uma transformação gigantesca. Por isso, não poderia deixar de agradecer a vocês, desconhecidos ou conhecidos. Vocês fizeram diferença na minha vida e na minha formação.

Agradeço a UFERSA e ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade de executar esse projeto e pela formação de qualidade obtida. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa, fundamental para minha permanência e sustento em Mossoró.

Por fim e não menos importante, meu mais profundo agradecimento e respeito aos animais experimentais que foram utilizados. Que os conhecimentos gerados possam no futuro serem aplicados visando o seu bem estar e conservação em condições naturais.

“A verdadeira questão não é se há vida após a morte. A verdadeira questão é se estás vivo antes da morte.”

Osho

RESUMO

Os catetos são animais silvestres que possuem grande importância ecológica e potencial econômico. Assim, a fim de aumentar o potencial reprodutivo desta espécie, técnicas como cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais vem sendo estudadas. Sabe-se que a foliculogênese pré-antral é regulada por fatores autócrinos e parácrinos em um mecanismo orquestrado que define o curso de desenvolvimento ou morte folicular. Entre esses fatores está a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), que atua na ativação, sobrevivência e desenvolvimento folicular em diferentes espécies. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de BMP15 sobre a sobrevivência, ativação, crescimento e proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais de catetos cultivados *in vitro* por 6 dias. Para tanto, 5 pares de ovários foram coletados de fêmeas de cateto e de cada par foram retirados fragmentos do córtex, dos quais, um foi utilizado como controle fresco, e os demais foram cultivados *in vitro* por 1 ou 6 dias nos diferentes tratamentos: 0, 1, 25 e 50 ng/mL de BMP15. Os fragmentos do controle fresco e pós-cultivo foram fixados, processados para histologia clássica (hematoxilina/eosina e AgNOR) para a confecção das lâminas. Os folículos ovarianos foram avaliados quanto à morfologia, sendo classificados em normais ou degenerados e quanto ao grau de evolução, sendo classificados em primordiais ou em desenvolvimento (primários e secundários). Este último parâmetro foi utilizado para o estudo da ativação folicular, levando em consideração a razão entre o percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento ao longo do cultivo. Além disso, os folículos e oócitos foram mensurados antes e após o cultivo para registrar o crescimento folicular e oocitário. A proliferação celular dos folículos ovarianos durante o cultivo foi avaliada pela contagem das regiões organizadoras nucleolares (NORs) pela técnica de AgNOR. O controle fresco apresentou altas taxas de folículos com morfologia normal ($92,68\% \pm 1,09$) e, após o cultivo, a adição de BMP15 (25 ng/mL) ao meio resultou numa maior percentagem de folículos normais ($79,67\% \pm 0,69$) quando comparada aos demais tratamentos ($P < 0,05$), exceto 1 ng/mL BMP15 ($74,00\% \pm 1,90$) ($P > 0,05$). Além disso, as concentrações mais elevadas de BMP15 (25 ng/ml e 50 ng/ml) estimularam a ativação dos folículos primordiais em relação ao controle cultivado ($P < 0,05$). No entanto, esta substância não demonstrou efeitos no crescimento oocitário e folicular. Todas as concentrações de BMP15 utilizadas aumentaram o número de NORs após 1 dia de cultivo em relação ao controle fresco e cultivado ($P < 0,05$), e após 6 dias de cultivo, o número de NORs nos fragmentos cultivados em todos os tratamentos foi maior do que a observada no controle fresco ($P < 0,05$). Em conclusão, a adição de 25 ng/ml de BMP15 ao meio de cultivo de folículos pré-antrais de catetos mantém um elevado número de folículos morfologicamente saudáveis e estimula a ativação de folículos primordiais após 6 dias de cultivo.

Palavras-chave: Tayassuidae. Folículos Primordiais. Ativação Folicular. Biobanco. Vida Selvagem.

ABSTRACT

Collared peccaries are wild animals that have a great ecological importance and economic potential. Thus, in order to increase reproductive potential this species, biotechniques such as *in vitro* culture of preantral follicles have been studied. It is known preantral folliculogenesis is regulated by autocrine and paracrine factors in an orchestrated mechanism that defines the course of development or death. Among these factors is bone morphogenetic protein 15 (BMP15), which acts on activation, survival and follicular development in different species. Nevertheless, the roles of BMP15 in the regulation of primordial follicle development in collared peccaries remains unknown. The aims of present study were to investigate the effects of BMP15 on *in vitro* culture of collared peccaries preantral follicles using histological studies. To this end, fragments of collared peccaries (*Pecari tajacu*) ovarian cortex were cultured for 1 or 6 days, at 38.5 °C in an atmosphere containing 5% CO₂, in TCM199⁺ (control medium) supplemented with different concentrations of recombinant human BMP15 (rhBMP15, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (1, 25 and 50 ng/mL). The fresh control and cultured fragments were fixed, processed for classical histology (hematoxylin/eosin and AgNOR), and the ovarian follicles were evaluated for morphology, classified as normal or degenerate, and classified as primordial or developing (primary and secondary). The latter parameter was used for study of follicular activation, taking into account the ratio between percentage of primordial and developing follicles throughout the culture. In addition, follicles and oocytes were measured before and after culture to record follicular and oocyte growth. The cell proliferation of ovarian follicles during experiment was evaluated by counting the nucleolar organizing regions (NORs) by the AgNOR technique. The fresh control showed high rates of follicles with normal morphology (92.68% ± 1.09) and, after culturing, addition of BMP15 (25 ng/mL) to medium resulted in a higher percentage of normal follicles (79.67 ± 0.69) compared to the other treatments (P<0.05), except for 1 ng/mL BMP15 (74.00% ± 1.90) (P>0.05). In addition, higher concentrations of BMP15 (25 ng/ml and 50 ng/ml) stimulated the activation of primordial follicles in relation to cultured control (P<0.05). However, this substance did not demonstrate effects on oocyte and follicular growth. All concentrations of BMP15 used increased the number of NORs after 1 day of cultivation relative to fresh and cultivated control (P<0.05), and, after 6 days, number of NORs in fragments cultured in all treatments was higher than that observed in fresh control (P <0.05). In conclusion, the addition of 25 ng/ml of BMP15 to culture medium of preantral follicles of peccaries maintains a high number of morphologically healthy follicles and stimulates activation of primordial follicles after 6 days of culture.

Keywords: Tayassuidae. Primordial Follicles. Follicular Activation. Biobanking. Wild Life.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Histological sections of collared peccaries preantral follicles. Images shows morphological normal follicles on fresh control (a), after 1 (b) and 6 (c) days exhibited oocyte cytoplasm (Oc), oocyte nucleus (N) and intact and organized granulosa cells (GC). Degenerated follicle after 6 days of culture (d) showed cytoplasmic retraction (arrow) or disorganization of granulosa cells. Haematoxylin–eosin stain. Scale bar: 50 μ m..... 58
- Figura 2 – Percentages of primordial (a) and growing (b) follicles in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15. * differs significantly from control follicles ($p < 0.05$). a,b—indicates differences in the same treatment at different days of IVC. A–B— indicates differences in the same day of IVC among treatments..... 59
- Figura 3 – Photomicrograph of AgNOR of collared peccaries ovarian preantral follicles. (a,b)— NORs are the black spots present on the granulosa cells, arrows pointing. 1 (a) and after 6 (b) days of IVC, respectively. Scale bar: 50 μ m..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Percentages of normal follicles in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199 ⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15.....	57
Tabela 2	– The mean (Mean $\pm$ SE) diameter (μ m) of oocytes in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199 ⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15.....	60
Tabela 3	– The mean (Mean $\pm$ SE) surface diameter (μ m) of follicles in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199 ⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15.....	61
Tabela 4	– Mean values of the cell proliferation capacity quantified by number of AgNORs present in the granulosa cells of preantral follicles derived from collared peccaries considering the fresh control (uncultured) and the IVC for 1 or 6 days in TCM199 ⁺ medium containing different concentrations of BMP15.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α MEM	Meio Essencial Mínimo α
ACP®	Água de Coco em Pó
ActR-IIA	Receptor para Ativina tipo IIA
ActR-IIB	Receptor para Ativina tipo IIB
ALK2	Ativina Semelhante a Quinase 2
ALK3 ou BMPR1A	Ativina Semelhante a Quinase 3
ALK6 ou BMPR1B	Ativina Semelhante a Quinase 6
AMH	Hormônio Anti-Mulleriano
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMP15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BMPRII	Receptor para BMP tipo II
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CGs	Células da Granulosa
CTGF ou CCN2	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
Cyr61 ou CCN1	Proteína Angiogênica Rica em Cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Dr	Doutor
FOP	Falha Ovariana Prematura
FOPAs	Folículos Pré-Antrais
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF9	Fator de Crescimento e Diferenciação 9
GDF9B	Fator De Crescimento e Diferenciação 9B
ISABR	International Symposium on Animal Biology of Reproduction
KL	Kit Ligand
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
LH	Hormônio Luteinizante
MAPK	Proteínas-Quinases Ativadas por Mitógenos
MEM	Meio Essencial Mínimo
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais

MPF	Fator Promotor de Maturação
mRNA	RNA mensageiro
mTORC1	Proteína Alvo Da Rapamicina Em Mamíferos - Complexo 1
NCSU23	Meio 23 da Universidade do Estado da Carolina do Norte
NOBOX	Newborn Ovary Homebox
NORs	Regiões Organizadoras de Nucléolos
NOV ou CCN3	Nephroblastoma Overexpressed
PBS	Solução Salina Tamponada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinase
Prof	Professor
rBMP15	Proteína Morfogenética Óssea 15 Recombinante Humana
RNA	Ácido Ribonucléico
SE	Erro padrão
SMADs	Moléculas de Sinalização Intracelular
TCM199	Meio de Cultivo de Tecidos 199
TGF- β	Família dos Fatores de Crescimento Transformantes β
TSC2	Tuberin/Tuberous Sclerosis Complex 2
YAP	Proteínas Yes-Associated

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou Menos
g	Grama
®	Marca Registrada
mUI	Mili Unidades Internacionais
ml	Mililitro
ng	Nanograma
+	Suplementação
P	Nível Descritivo Ou Probabilidade De Significância
<	Menor que
>	Maior que
nº	Número
~	Aproximadamente
mm	Milímetro
°C	Graus Celsius
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
µg	Microgramas
mM	Milimolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.	A Importância dos Catetos.....	19
2.2.	Aspectos Reprodutivos nas Fêmeas de Catetos.....	20
2.3.	O Ovário dos Mamíferos e Particularidades do Ovário de Catetos.....	21
2.4.	Foliculogênese.....	22
2.4.1.	O folículo primordial e a formação do folículo primário.....	23
2.4.2.	Transição do folículo primário para secundário.....	25
2.4.3.	Transição do folículo secundário para terciário.....	26
2.5.	População folicular.....	27
2.6.	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais.....	28
2.6.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	29
2.7.	Proteína morfogenética óssea 15.....	31
3.	JUSTIFICATIVA.....	35
4.	HIPÓTESES.....	36
5.	OBJETIVOS.....	37
5.1.	Objetivo geral.....	37
5.2.	Objetivos específicos.....	37
6.	CAPÍTULO 2: BMP15 STIMULATES IN VITRO DEVELOPMENT OF PREANTRAL FOLLICLES OF COLLARED PECCARIES (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1958).....	38
7.	CONCLUSÕES.....	64
8.	PERSPECTIVAS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O cateto (*Pecari tajacu*) é um animal silvestre, ungulado pertencente à ordem Artiodactyla (com número par de dedos) que desempenha um importante papel ecológico como disseminador de sementes e como presa de grandes felinos. Este animal está presente desde o sul dos Estados Unidos até o nordeste do Peru e norte da Argentina, e no Brasil pode ser encontrado em todos os biomas. Apesar do cateto não está classificado como um animal ameaçado de extinção, a caça predatória e a redução das vegetações nativas têm diminuído consideravelmente sua população nos últimos anos, o que aumenta o interesse dos pesquisadores nesta espécie. Considerando a importância de sua conservação, o fato de os catetos serem bem adaptáveis à criação em cativeiro, possibilita a exploração comercial e consequentemente o uso desses animais de forma sustentável (NOGUEIRA; NOGUEIRA-FILHO, 2011). Assim, o desenvolvimento e o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas, que tem papel determinante na produção e na conservação de animais de valor zootécnico e ecológico (ANDRABI; MAXWELL, 2007; CHOUDHARY et al., 2016), poderá contribuir de forma significativa na conservação e exploração comercial desta espécie.

Dentre as biotécnicas reprodutivas que visam o aproveitamento dos gametas de fêmeas mamíferas está a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA), a qual permite a recuperação dos gametas femininos inclusos nos folículos pré-antrais (FOPAs) e sua posterior preservação ou desenvolvimento *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2007). Sabe-se que os FOPAs representam 90% do total de folículos presentes no ovário, podendo estes, crescerem naturalmente *in vivo* ou estarem aptos ao crescimento e maturação quando cultivados *in vitro* (FIGUEIREDO; RODRIGUES; CHRISTIANI, 2008; CADORET et al., 2017).

Recentemente, o cultivo *in vitro* de FOPAs foi realizado em catetos, sendo avaliado o efeito do meio essencial mínimo α (α MEM) e meio de cultivo de tecidos 199 (TCM199) associados ou não ao hormônio folículo estimulante (FSH) sobre o desenvolvimento de FOPAs cultivados *in vitro*. Nesse trabalho, os autores concluíram que o meio TCM199 associado ao FSH foi mais efetivo que o α MEM na manutenção da sobrevivência folicular, garantindo um percentual de 63,2% de FOPAs intactos após 7 dias de cultivo *in vitro* (LIMA et al., 2018). A partir de então ficou constatada a atuação positiva do FSH na manutenção da integridade folicular. Entretanto, faz-se importante testar o efeito de outras substâncias na estimulação do desenvolvimento dos FOPAs. Sabe-se que foliculogênese pré-antral é regulada por fatores autócrinos e parácrinos em um mecanismo orquestrado que define o curso de ativação e crescimento ou morte folicular (KIM et al., 2005). Dentre estes fatores destaca-se a

proteína morfogênica óssea 15 (BMP15), um fator de crescimento produzido pelo oócito que regula os mecanismos de ativação, sobrevivência e desenvolvimento dos folicular (LIMA et al., 2010).

Além de ser uma substância produzida no ovário de diferentes espécies, a BMP15 tem sido considerada um importante regulador do desenvolvimento folicular e da ovulação em mamíferos (JUENGEL et al., 2004; MCNATTY et al., 2005; SHIMASAKI; EPPIG, 2007). Inicialmente, estudos realizados em roedores caracterizaram a BMP15 como um potente estimulador da proliferação das células da granulosa (CGs), demonstrando intensa capacidade de aumentar o número de células foliculares *in vitro* (OTSUKA et al., 2000). Posteriormente, essa ação da BMP15 foi confirmada em estudos com CGs de humanos (DI PASQUALE; BECK-PECCOZ; PERSANI, 2004) e ruminantes (MCNATTY et al., 2005), nos quais também foi verificada sua intensa atividade mitótica nestas células e atividade anti-apoptótica em células do cumulus em ovários suínos (ZHAI et al., 2013). Nessa mesma espécie, já foram identificadas a expressão de mRNA e da proteína BMP15 em baixos níveis em oócitos de folículos antrais imaturos (LI et al., 2008), bem como a utilização desse fator na suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos suínos (LIN et al., 2014). Mais recentemente, foi relatado o efeito da BMP15 no cultivo de FOPAs em caprinos (CELESTINO et al., 2011; LIMA et al. 2012a), murinos (FENWICK et al., 2013; SALEHNIA; PAJOKH; GHORBANMEHR, 2016) e bovinos (PASSOS et al., 2013) no qual foi relatado efeito positivo desta substância sobre a sobrevivência e crescimento folicular e oocitário. Apesar do conhecimento estabelecido de que a BMP15 atua na foliculogênese de mamíferos, esta substância ainda não foi testada no cultivo *in vitro* de FOPAs de catetos. Diante disso, esse trabalho objetivou estudar o efeito da BMP15 no cultivo *in vitro* de FOPAs desta espécie. Para uma melhor compreensão do mesmo será feita uma revisão de literatura abordando os seguintes tópicos: A importância dos catetos, Aspectos reprodutivos nas fêmeas de catetos, O ovário dos mamíferos e particularidades do ovário de catetos, Foliculogênese, População folicular, Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais e Proteína morfogenética óssea 15.

2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância dos catetos

O *Pecari tajacu* é um mamífero artiodátilo, pertencente à família Tayassuidae e gênero *Pecari* (GRUBB, 1993), e é conhecido popularmente como cateto, caititu, caitatu, taititu, tateto, pecari e porco-do-mato. Dada sua ampla distribuição geográfica, os catetos são considerados animais altamente adaptáveis a diversos ambientes, sendo encontrados exemplares dessa espécie desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. De acordo com a Gongora et al. (2011), o estado de conservação da espécie é classificado como pouco preocupante.

Os catetos alimentam-se de frutos de 128 espécies diferentes de plantas, participando da disseminação de sementes de espécies vegetais através das fezes (FONTANA; BENCKE; REIS, 2003; BECK, 2006), apresentando grande importância ecológica como disseminadores. Além desta, os catetos desempenham outra importante função ecológica no equilíbrio e na composição de cadeias alimentares, visto que são predados por grandes felinos (dos quais todas as espécies silvestres encontram-se ameaçados ou em risco de extinção), auxiliando na manutenção destas espécies (IUCN 2017). Entretanto, o fato da carne dos catetos ser saborosa ao paladar humano e apreciada como iguaria na culinária exótica, e sua pele ter alto valor no mercado, o que configura um excelente potencial econômico a ser explorado, vem estimulando a caça desses animais (SILVA et al., 2010a). Com isso, a caça predatória associada a destruição do habitat desses animais vem ocorrendo de forma intensa em todo continente americano, e tem reduzido drasticamente a população de catetos em diversas áreas. No Brasil, a ação antrópica das últimas décadas promoveu o declínio populacional dos catetos em alguns biomas, como por exemplo na Mata Atlântica e Caatinga, onde a espécie é considerada como vulnerável à extinção, e na Argentina, a espécie já está extinta nas regiões leste e sul do país (GONGORA et al., 2011). Tal declínio, pode por sua vez, alterar de forma significativa a biodiversidade dos biomas em que estão inseridos (FONSECA et al., 1994). Entretanto, a boa adaptabilidade destes animais em cativeiros permite sua exploração comercial de maneira controlada, resultando na diminuição da caça e na possibilidade de estabilização populacional (NOGUEIRA; NOGUEIRA-FILHO, 2011).

Além disso, o cateto pode ser um excelente modelo experimental para espécies da mesma família que já se encontram ameaçadas de extinção, como o queixada (*Tayassu pecari*) (KEUROGHLIAN, 2013) e o taguá (*Catagonus wagneri*) (ALTRICHTER et al., 2015). Nesse contexto, com o intuito de melhorar o potencial de exploração reprodutiva do cateto faz-se

necessário conhecer melhor a fisiologia reprodutiva destes animais. Este trabalho destaca apenas os aspectos reprodutivos relacionados à fêmea do cateto.

2.2. Aspectos reprodutivos nas fêmeas de catetos

Os estudos relacionados a fisiologia reprodutiva das fêmeas de cateto são relativamente recentes, tendo início em 2006. Desde então os avanços nesta área do conhecimento foram significativos, porém, ainda há muito a se desvendar. A idade reprodutiva das fêmeas de catetos inicia-se quando esta atinge de oito a dez meses (MAYOR; FENECH; LÓPEZ-BÉJAR, 2006) e, embora os nascimentos tenham sido registrados durante todo o ano, em regiões de clima temperado, como no sul dos Estados Unidos, há um pico de nascimento durante a estação chuvosa de verão. Na Amazônia peruana, a fêmea do cateto é considerada poliéstrica não sazonal (MAYOR; FENECH; LÓPEZ-BÉJAR, 2006), com um ciclo estral de $28,45 \pm 5,45$ dias (GUIMARÃES et al., 2011).

Inicialmente, o ciclo estral de fêmeas de catetos na natureza foi determinado por citologia obtida de esfregaços vaginais (MAYOR et al., 2007). Posteriormente, fêmeas criadas em cativeiro sob condições semiáridas foram estudadas com o intuito de descrever e correlacionar as modificações verificadas no padrão ultrassonográfico ovariano com o perfil hormonal, a aparência vulvar e a citologia vaginal durante o ciclo estral. Nesse estudo, as fêmeas apresentaram ciclo estral de $21,0 \pm 5,7$ dias (MAIA et al., 2014a). Durante a fase estrogênica (com duração média de 6 dias), o pico de estrógeno foi responsável por promover mudanças externas na genitália feminina, como edema de lábios vulvares e hiperemia da mucosa vaginal, e dar início ao desenvolvimento dos folículos ovarianos. A fase luteal (com duração média de 15 dias) foi caracterizada por picos de progesterona e presença de corpos lúteos com tamanhos médios de $0,4 \pm 0,2$ cm (MAIA et al., 2014a).

A gestação dos catetos dura, em média, 138 dias (MAYOR; FENECH; LÓPEZ-BÉJAR, 2006). A taxa reprodutiva da espécie na natureza foi estimada em 1,12 nascimentos/ano e 1,98 filhotes por fêmea gestante (MAYOR; BODMER; LÓPEZ-BÉJAR, 2010). Com relação à taxa de ovulação e desenvolvimento embrionário, as fêmeas apresentaram, em média, $2,25 \pm 0,58$ corpos lúteos, $1,77 \pm 0,48$ embriões fecundados, e uma perda reprodutiva de $0,45 \pm 0,65$ (21,3%) oócitos ou embriões por fêmea gestante (MAYOR; BODMER; LÓPEZ-BÉJAR, 2010). No estudo de SOWLS (1984), entre 163 leitões nascidos, 78 foram do sexo feminino (47,85%) e 85 do sexo masculino (52,15%) e os filhotes tinham características precociais, seguindo suas mães após uma hora do parto e mamando em intervalos frequentes, sendo a

amamentação interrompida com aproximadamente 6 semanas de vida dos filhotes (SOWLS, 1984).

A primeira biotécnica reprodutiva aplicada à reprodução dos catetos, foi a estimativa da população folicular ovariana, sendo contabilizados cerca de 33.000 folículos por ovário. Mais de 90% dos FOPAs foram caracterizados como folículos primordiais, seguidos pelas classes de folículos primários e secundários, representando 7% e 3% da população, respectivamente. Dentre esses, 94% apresentavam morfologia normal quando avaliada a integridade das CGs, presença de oócitos com morfologia nuclear normal e ausência de retrações citoplasmáticas. Ademais, semelhante ao observado em suínos, foi observado através de imagens de microscopia eletrônica, grandes quantidades de gotas lipídicas no citoplasma oocitário (LIMA et al., 2013).

Em seguida, foi realizada a sincronização do estro, sendo analisada a eficiência de um protocolo utilizando o D-cloprostenol, um análogo da prostaglandina F2 α . Nesse estudo, as fêmeas foram monitoradas de acordo com as modificações na genitália externa, ultrassonografia do ovário, citologia vaginal e dosagens hormonais, e os autores concluíram que a aplicação do D-cloprostenol foi eficaz na sincronização do estro para a espécie (MAIA et al., 2014b). A partir de então, outros trabalhos visando a conservação, a criopreservação e o cultivo *in vitro* de FOPAs foram realizados com o intuito de manter a viabilidade dos folículos ovarianos *ex vivo* por tempo mais prolongado. Esses estudos serão detalhados no item 2.6 desta revisão.

Embora tenha sido observado um grande avanço nos estudos da fisiologia reprodutiva bem como na utilização de biotécnicas reprodutivas em fêmeas de cateto na última década, maiores esforços devem ser concentrados no desenvolvimento e/ou aprimoramento de biotécnicas já estabelecidas *in vivo* como a sincronização de estro, e *in vitro*, como cultivo de folículos ovarianos e criopreservação dos mesmos, com o intuito de aumentar a eficiência dos resultados existentes e, futuramente, alcançar a obtenção de oócitos aptos a serem utilizados em outras biotécnicas, melhorando o aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas desta espécie.

2.3. O ovário dos mamíferos e particularidades do ovário de catetos

Assim como nas demais espécies mamíferas, o ovário de fêmeas de cateto é um importante órgão do sistema reprodutor feminino que possui dupla função: gametogênica e endócrina. A primeira, está relacionada com a produção, armazenamento, maturação e liberação das células germinativa femininas, os oócitos (McGEE; HSUEH, 2000; MATSUDA et al., 2012). Já a função endócrina está relacionada com a produção de hormônios e fatores de

crescimento que atuam nos mecanismos que regulam o desenvolvimento reprodutivo como, por exemplo, os ciclos reprodutivos, o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária (HIRSHFIELD, 1991).

O par de ovário dos catetos pesa em média 3g (mínimo 2,12 e máximo 3,64 g), e o comprimento, largura e espessura do ovário medem, em média, $1,26 \pm 0,22$, $1,04 \pm 0,1$ e $0,98 \pm 0,11$ cm, respectivamente (LIMA et al., 2013). Anatomicamente, seguem a mesma estrutura mural do ovário da maioria das espécies já estudadas, possuindo formato ovoide e apresentando uma camada externa de células que caracteriza o epitélio germinativo. Em seguida, pode ser observada a túnica albugínea, região formada por tecido conjuntivo denso, com alguns vasos sanguíneos. Os folículos ovarianos estão incluídos em uma camada do tecido conjuntivo menos denso que compõe o estroma, ou a parte funcional do órgão, denominada de região cortical, iniciando-se logo abaixo da túnica albugínea. A região medular está localizada mais internamente e é responsável pela irrigação, drenagem e inervação do órgão, sendo composta de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo (MAYOR; FENECH; LÓPEZ-BÉJAR, 2006; LIMA et al., 2013).

O folículo ovariano é a unidade estrutural e morfológica básica dos ovários, e é composto por um oócito circundado por uma ou mais camadas de CGs e/ou células da teca de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Os folículos podem ser classificados seguindo o grau de evolução em primordiais, primários, secundários, constituindo os folículos pré-antrais ou não cavitários e terciários e pré-ovulatórios, constituindo os folículos antrais ou cavitários (SILVA, 2005; GUIMARÃES et al., 2012). Em catetos, apesar da morfologia folicular também ser similar ao observado nas demais espécies, uma particularidade interessante foi descrita: o citoplasma de seus oócitos apresentam grandes quantidades de gotas lipídicas, semelhante ao observado em suínos (LIMA et al., 2013). Durante seu desenvolvimento, o folículo ovariano passa por inúmeras mudanças morfológicas e funcionais, e a esse processo é dado o nome de foliculogênese. As biotécnicas reprodutivas como o cultivo *in vitro* de FOPAs podem ser realizadas e posteriormente otimizadas através da compreensão dos mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular.

2.4. Foliculogênese

A foliculogênese consiste em uma série de eventos que compreendem o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que tem início com a formação do folículo primordial ainda na vida fetal, e culmina com a ovulação do folículo pré-ovulatório a partir da puberdade (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O folículo ovariano é uma estrutura composta

por um oócito circundado por CGs e células da teca, e tem como funções básicas produzir hormônios e assegurar a maturação oocitária (RIMON-DAHARI et al., 2016).

2.4.1. O folículo primordial e a formação do folículo primário

A formação do folículo ovariano ocorre simultaneamente a formação do ovário, ainda na vida fetal (ZUCKERMAN, 1951). No primeiro estágio de desenvolvimento o folículo ovariano é denominado de primordial, e é composto por um oócito circundado por uma única camada de células pavimentosas da pré-granulosa (McNATTY et al., 1999; FORTUNE, 2003; FIGUEIREDO; RODRIGUES; CHRISTIANI, 2008). Esse folículo não secreta hormônios esteroides, bem como, não responde aos hormônios gonadotróficos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Os folículos primordiais consistem no estoque de gametas femininos, e podem permanecer em estágio de quiescência por longos períodos. A manutenção da quiescência é um dos principais eventos que regulam a foliculogênese nos mamíferos e é de fundamental importância para manutenção da fertilidade feminina durante sua vida reprodutiva, visto que a ativação desordenada levaria a uma perda gradativa da população folicular existente (WANG; ZOU; XIA; 2017).

Os processos que dirigem a quiescência e a ativação do folículo primordial são bastante complexos e ainda não foram totalmente elucidados. Nos últimos anos, os mecanismos moleculares referentes à esses processos (quiescência e ativação) tornaram-se mais evidentes, principalmente através do uso de modelos de camundongos geneticamente modificados (ELVIN; MATZUK, 1998; ADHIKARI; LIU, 2009). Estes estudos revelaram que existe um grande número de moléculas que podem atuar tanto para manter os folículos primordiais em estágio de dormência (fatores inibitórios da ativação) como promover a ativação (fatores estimulatórios da ativação) (REDDY; ZHENG; LIU, 2010).

O crescimento dos folículos primordiais é iniciado por ações coordenadas e sinérgicas de fatores de crescimento e hormônios provenientes de diferentes compartimentos, tais como oócitos, células somáticas e do estroma, os quais desencadeiam sinalizações moleculares que ativam diferentes vias de manutenção da quiescência ou estímulo à ativação. Assim, a diminuição dos níveis de fatores inibitórios ou o aumento dos níveis de fatores estimulatórios é o ponto de partida para o início do desenvolvimento dos folículos primordiais (FORTUNE, 2003). Em 2002, foi sugerido que um inibidor de origem medular, poderia regular a ativação folicular *in vivo* e que a separação do córtex da medula provocaria a ativação espontânea dos folículos primordiais *in vitro* (CUSHMAN; WAHL; FORTUNE, 2002). Mais de dez anos depois Kawamura et al. (2013) demonstraram que a fragmentação do ovário aumentou a

polimerização de actina e interrompeu uma via de sinalização, denominada via Hippo, o que levou ao aumento da expressão de fatores de crescimento CCN. CCN denomina os principais membros da família desses fatores, incluindo a proteína angiogênica rica em cisteína (Cyr61 ou CCN1), o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF ou CCN2) e “nephroblastoma overexpressed” (NOV ou CCN3). A secreção de CCN2 e fatores relacionados promoveu o crescimento de folículos primordiais *in vitro* (HSUEH et al., 2015).

A via Hippo é essencial para a manutenção ótima do tamanho dos órgãos e é conservada em todos os animais metazoários (HERGOVITCH, 2012; BERTOLDO et al., 2018). A sinalização Hippo consiste de vários reguladores de crescimento negativos que agem em uma cascata de quinases que, em última análise, fosforila e inativa efetores-chave desta via, as proteínas Yes-Associated (YAP). Quando a sinalização Hippo é interrompida, diminui a fosforilação de YAP e aumenta os níveis de YAP nucleares, bem como aumenta a expressão de fatores de crescimento CNN (HOLBOURN; ACHARYA; PERBAL, 2008).

Uma outra via de sinalização que atua na ativação folicular é a PI3K/PTEN/Akt (Fosfatidilinositol 3-kinase/PTEN/AKT), importante na determinação do curso do desenvolvimento do folículo primordial, incluindo sua ativação, sobrevivência e morte (KIM, 2012). A supressão do gene PTEN em ratas causou a ativação prematura de todos os folículos primordiais do ovário, seguido do seu esgotamento no início da idade adulta, resultando em falha ovariana prematura (FOP). Contudo, quando o gene PTEN foi excluído de folículos primários formados, seu desenvolvimento não foi alterado, e os folículos atingiram a maturação e geraram crias normais (JAGARLAMUDI et al., 2009). Isso sugere que a PTEN/PI3K regula o crescimento folicular apenas no folículo primordial. Além disso, estudos tem demonstrado que a proteína alvo da rapamicina em mamíferos - complexo 1 (mTORC1), uma serina treonina quinase, membro da via PI3K/Akt, é um dos reguladores da manutenção da quiescência, ativação e sobrevivência de folículos primordiais (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014). A proteína TSC1 é parte de um heterodímero (TSC1/TSC2) que inibe a ativação de um complexo de proteínas quinase (mTORC), que por sua vez, atua no crescimento celular (ADHIKARI et al., 2010). A supressão da atividade do complexo mTORC pelo gene TSC1-TSC2 nos oócitos é essencial para a manutenção da quiescência, enquanto a elevada atividade do mTORC1 no oócito é necessária para a ativação folicular em camundongos fêmeas (ADHIKARI et al., 2009; ADHIKARI et al., 2010). Já o NOBOX (Newborn ovary homebox) é expresso em células germinativas e tem papel na indução da ativação folicular. Um estudo utilizando ratas nocaute para o gene NOBOX indicou a importância desse gene na ativação, uma vez que sua ausência

interrompeu a transição dos folículos primordiais para o estágio primário (RAJKOVIC et al., 2004).

Independente da via utilizada, a ativação dos folículos primordiais reestabelece a capacidade de desenvolvimento desta estrutura através de alterações bioquímicas e funcionais nas células foliculares que levam ao aumento da atividade metabólica e transcricional, culminando com o aumento do volume oocitário e mudança na morfologia das células achatadas da pré-granulosa, que tornam-se cuboides, adquirem atividade mitogênica, e passam a ser chamadas de células da granulosa (SALHA; ABUSHEIKA; SHARMA, 1998). A partir do momento em que o oócito é circundado por uma camada completa de CGs de formato cúbico, os folículos são classificados como primários (McNATTY et al., 1999; BARNETT et al., 2006).

Já se sabe que a ativação é independente de gonadotrofinas. Apesar disso, o FSH exerce um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Várias outras substâncias incluindo hormônios e fatores de crescimento estão direta ou indiretamente associados aos mecanismos que dirigem a ativação folicular. Dentre essas substâncias merecem destaque o hormônio anti-Mulleriano (AMH), o kit ligand (KL), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) e a BMP15 (KIM, 2012).

2.4.2. Transição do folículo primário para secundário

O crescimento do folículo primário é iniciado com um aumento da multiplicação das CGs para formar multicamadas, aumento do oócito e de seu conteúdo protéico, formação da zona pelúcida, formação de uma lâmina basal e formação da camada da teca interna, a partir de células do estroma intersticial (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998; KNIGHT; GLISTER, 2003). Durante esta fase, ocorre uma intensa atividade mitótica nas CGs, que pode ser avaliada através de marcadores biológicos de proliferação celular, como o método histoquímico pela técnica de AgNOR. Esta técnica marca as regiões organizadoras de nucléolo (NORs), que são segmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) que transcrevem o ácido ribonucleico (RNA) ribossômico e que, por sua vez, é posteriormente traduzido para proteína, formando os ribossomos. Os ribossomos, quando ligados ao RNA mensageiro, formam os polirribossomos, que são responsáveis pela síntese de todas as proteínas nos seres humanos, inclusive as proteínas que formarão novas células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Os NORs, por esse motivo, estão relacionadas diretamente com a atividade proliferativa celular (RIVERO; AGUIAR, 2002).

Quando duas ou mais camadas de CGs se desenvolvem formam-se os folículos secundários. Nesse estágio, os oócitos entram em extensiva fase de crescimento, resultando em uma complexa organização citoplasmática dependente da síntese de novos produtos gênicos e organelas, bem como da modificação e redistribuição das organelas já existentes (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). Além do expressivo aumento no número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas, os oócitos em crescimento acumulam grânulos glicogênicos, proteínas e lipídios, e sofrem ainda um incremento na síntese de RNA e proteínas, considerados importantes para garantir a futura competência meiótica (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Com o desenvolvimento folicular, as células da teca se estratificam em duas camadas: uma externa, denominada teca externa, composta por células indiferenciadas; e outra interna, conhecida como teca interna, na qual algumas células diferenciam-se e passam a secretar esteróides (GOUGEON, 2010). Esse processo parece não ser mediado pela ação das gonadotrofinas, mas existe uma grande divergência sobre este fato. Embora folículos primários e secundários já expressem os receptores para FSH nas CGs (OKTAY; BRIGGS; GOSDEN, 1997), essa gonadotrofina desempenha apenas um papel responsivo, ao invés de essencial, ao desenvolvimento desses folículos. Entretanto, estudos já mostraram que o FSH promove o crescimento de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* (PASSOS et al., 2013). Outras substâncias ainda têm se mostrado importantes para essa fase. Na espécie caprina, estudos em FOPAs confirmaram a importância da atuação tanto da BMP15 (CELESTINO et al., 2011) como do GDF9 (MARTINS et al., 2008) na progressão de folículos primários até o estágio secundário *in vitro*, destacando ainda os efeitos positivos destes dois fatores de crescimento sobre a manutenção da viabilidade folicular durante essa fase. No estágio de folículo secundário, células somáticas diferenciadas se evidenciam do estroma circundante e são chamadas de células da teca, as quais iniciam a síntese dos hormônios esteroides, estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH) (HASEGAWA et al., 2017).

2.4.3. Transição de folículo secundário para terciário

O crescimento dos folículos secundários é primariamente controlado pelos reguladores intraovarianos (fatores de crescimento, citocinas e esteroides gonadais) e, embora estes folículos já sejam responsivos às gonadotrofinas, não são dependentes (HALPIN et al., 1986). À medida que crescem, os folículos secretam água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides, formando uma cavidade cheia de líquido entre as camadas de CGs, chamada cavidade antral ou antro, dando início a foliculogênese antral pela formação dos folículos terciários (BARNETT et al., 2006). O folículo terciário desenvolve a

sua própria rede vascular dentro da camada tecal circundante (FRASER; DUNCAN, 2009). Esta rede vascular é importante para o desenvolvimento dos folículos terciários, pois permite que a produção de fluido antral seja intensificada pelo aumento no número e na permeabilidade dos vasos sanguíneos foliculares. As CGs que ficam próximas ao oócito sofrem diferenciação para formar as células do cumulus, enquanto que as demais formam as CGs murais. Os folículos antrais podem ser classificados como pequenos ou grandes folículos antrais. Os pequenos folículos antrais apresentam crescimento rápido em diâmetro e decorrente acúmulo de fluido folicular (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

Com a progressão do desenvolvimento dos folículos antrais, o FSH torna-se criticamente determinante para o crescimento e a sobrevivência dos folículos, os quais passam a ser dependentes desta gonadotrofina. A partir deste ponto, será a concentração de FSH circulante disponível que determinará se o folículo sofrerá atresia ou continuará o seu desenvolvimento até os estágios antrais tardios. O desenvolvimento desses folículos pode ser subdividido nas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular. Ao iniciar uma nova onda folicular, um determinado grupo de folículos é recrutado, apresentando crescimento simultâneo, sobre estímulo do FSH, mas somente um deles será selecionado (GINTHER et al., 2003). A partir de então, este folículo passará a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo assim o desenvolvimento e levando à inibição do recrutamento de um novo grupo de folículos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Quando atingem o estágio de pré-ovulatórios apresentam o oócito circundando por várias camadas de células do cumulus. O conjunto de todos os folículos ovarianos nos distintos estágios, constituem a população folicular, e estão distribuídos em diferentes proporções pelo órgão.

2.5. População folicular

Na maioria das espécies, a população folicular é determinada durante a vida fetal. A quantidade de folículos existente difere entre as espécies, e varia consideravelmente entre indivíduos de uma mesma espécie (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006). Os FOPAs representam 90% do total de folículos presentes no ovário e constituem o estoque de gametas femininos podendo estes, crescer naturalmente *in vivo* ou estarem aptos ao crescimento e maturação quando cultivados *in vitro* (FIGUEIREDO; RODRIGUES; CHRISTIANI, 2008). A população folicular varia muito entre as espécies sendo de aproximadamente 1.500 folículos em murinos (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000), 35.000 em caprinos (LUCCI

et al., 1999), 160.000 em ovinos (DRIANCOURT, 2001), 2.000.000 em humanos (ERICKSON, 1986) e 600.000 em suínos (ALVES, 2010). Em catetos, estima-se uma população por volta de 33.000 folículos por ovário (LIMA et al, 2013).

Na última década, estudos tem sugerido que é possível a renovação da população folicular após o seu estabelecimento. Estes estudos deram origem à teoria de neo-foliculogênese, na qual se discute sobre a existência de células tronco ovarianas serem capazes de se diferenciar em oócitos (JOHNSON et al., 2004; JOHNSON et al., 2005; WOODS et al., 2013; WOODS; TILLY, 2013). Partindo desse princípio, pesquisadores já conseguiram gerar camundongos a partir de células tronco germinativas ovarianas (ZOU et al., 2009). Em humanos, o cultivo de células do epitélio germinativo ovariano permitiu o desenvolvimento de células da granulosa e oócitos (BUKOVSKY; SVETLIKOVA; CAUDLE, 2005). Em bovinos, o cultivo de células do epitélio germinativo gerou células que foram posteriormente diferenciadas em células semelhantes à oócitos (SOUZA et al., 2017). Apesar de ser uma teoria bastante debatida nos últimos anos, ainda não existe um consenso se as células tronco do epitélio germinativo são capazes de originar oócitos *in vivo*, nem como poderia ocorrer a formação da estrutura folicular, permanecendo esse debate inconclusivo até hoje.

Embora a população folicular do ovário seja numericamente elevada, apenas um número muito pequeno (em média 0,01%) chega à ovulação, a quase totalidade dos folículos morre por um processo fisiológico denominado atresia durante seu crescimento e maturação (FIGUEIREDO; RODRIGUES; CHRISTIANI, 2008). A atresia pode ocorrer por via apoptótica (STALDEMANN; LASSMANN, 2000) ou pelo processo degenerativo de necrose (FIGUEIREDO; RODRIGUES; CHRISTIANI, 2008). A elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial e a atresia é o pré-requisito básico para o uso de FOPAs no melhoramento da eficiência reprodutiva em humanos e em animais de valor zootécnico e ecológico.

Levando em consideração a população folicular ovariana e o potencial reprodutivo *in vivo* dos oócitos que são ovulados, vem sendo desenvolvida a MOIFOPA com o intuito de maximizar *in vitro* o número de gametas femininos viáveis por animal (FIGUEIREDO et al., 2007).

2.6. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais

A MOIFOPA é uma biotécnica que permite a recuperação de uma grande quantidade de FOPAs, resgatando-os da atresia e maximizando o potencial reprodutivo das fêmeas mamíferas (FIGUEIREDO et al., 2007). Tal biotécnica está fundamentada em 3 princípios básicos: 1)

isolamento de FOPAs a partir de ovários: 2) conservação dos FOPAs, visando a estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período a baixas temperaturas; e 3) no cultivo folicular que tem como finalidade promover o crescimento e a maturação *in vitro* de um grande número de oócitos, previamente incluídos em FOPAs, que poderão ser utilizados em outras biotécnicas (FIGUEIREDO et al., 2007). Assim, a utilização da MOIFOPA pode trazer uma série de vantagens, como aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico ou em risco de extinção, uso de animais que não respondem a tratamentos de superovulação, obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte e otimização e padronização de outras biotécnicas como a fertilização *in vitro*, tecnologia de embriões, clonagem e transgenia. Adicionalmente, contribui para a elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese na fase pré-antral (FIGUEIREDO et al., 2011).

A equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, foi pioneira na aplicação da biotécnica de MOIFOPA em catetos. Inicialmente foi realizado a tentativa da criopreservação do tecido ovariano utilizando a vitrificação em superfície sólida, na qual foram testadas diferentes concentrações (3 e 6 M) de etilenoglicol e dimetilsufóxido como agentes crioprotetores. Os autores concluíram que independente das concentrações ambos os crioprotetores são eficientes na preservação da morfologia dos FOPAs (LIMA et al., 2012b). Em seguida, foi realizada a estimativa e a caracterização da população folicular ovariana (LIMA et al., 2013) seguida da preservação do tecido ovariano (LIMA et al., 2014). Neste último, foram testadas a solução salina tamponada (PBS) e água de coco em pó (ACP®) como meios para a conservação do tecido ovariano por diferentes períodos. Nesse estudo, a ACP® apresentou melhores resultados mantendo a integridade folicular em um período de 4 horas com valores semelhantes ao do grupo controle fresco, e superior ao PBS em períodos mais prolongados (LIMA et al., 2014). Além destes, um trabalho foi realizado a fim de se estabelecer um protocolo para o isolamento dos folículos pré-antrais do córtex ovariano. Resultados preliminares desse estudo mostraram que a colagenase tipo IV foi eficiente no isolamento de FOPAs de catetos, proporcionando a recuperação de um elevado número de folículos viáveis (CAMPOS et al., 2017). Mais recentemente, Silva et al. (2017) e Lima et al. (2018) realizaram o cultivo *in vitro* de tecido ovariano nesta espécie, tema que será abordado com mais detalhes no tópico seguinte.

2.6.1. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* de FOPAs possibilita o aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas e o entendimento dos eventos que controlam a foliculogênese inicial. Esse

conhecimento vem sendo explorado através de estudos que avaliam o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações no desenvolvimento folicular, a fim de otimizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* nos folículos que são ovulados, permitindo assim a obtenção de oócitos aptos a serem maturados e utilizados em outras biotécnicas (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016).

Existem duas abordagens para o cultivo *in vitro* de FOPAs, nas quais os folículos podem ser cultivados “*in situ*”, ou seja, inseridos em fragmentos do córtex ovariano ou isolados (GREEN; SHIKANOV, 2016). Além de ser mais prático, o cultivo dos folículos inclusos no tecido ovariano tem como vantagem possibilitar a manutenção do contato entre os folículos e as células do estroma adjacente (ABIR et al., 2006), bem como assegurar a manutenção da integridade tridimensional folicular (ROSSETTO et al., 2011). Muitos dos mecanismos que levam a ativação dos folículos primordiais estão intimamente associados a fatores parácrinos produzidos pelas células adjacentes aos folículos, que permanecem ativas durante o cultivo *in situ*. Isto explica porquê folículos primordiais isolados não se desenvolvem em cultivo, mas crescem *in situ* inclusos em tecido ovariano (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003). Apesar disso, esse tipo de cultivo apresenta alguns desafios, como a impossibilidade do monitoramento individual dos folículos e a possibilidade de cultivo de fragmentos que não possuem folículos (ABIR et al., 2006).

Em suínos, o meio de cultivo de FOPAs já foi estudado por Mao et al. (2002). Os autores compararam o meio base NCSU23 (Meio 23 da Universidade do Estado da Carolina do Norte) com o TCM199, e posteriormente, a suplementação do meio de base com diferentes tipos de soro (soro fetal bovino X soro de porca pré-púbere) e diferentes concentrações de FSH (0, 5, 1 e 2 mUI/ml) sobre o desenvolvimento de folículos secundários. O TCM199 promoveu um maior crescimento folicular, no entanto, o NCSU23 foi mais efetivo na formação do antro. Por esse motivo, a NCSU23 foi escolhido como meio base para o teste do tipo de soro e das concentrações de FSH. O soro fetal bovino aumentou a percentagem de folículos que se desenvolveram até o estágio antral, bem como, a taxa de recuperação de complexos cúmulus-oócitos. Com relação ao FSH, foi obtida uma maior taxa de crescimento folicular quando utilizada a concentração de 2 mUI/ml deste hormônio (MAO et al., 2002).

Em catetos, inicialmente foi estudado o melhor meio de base (α MEM ou TCM199) para o cultivo *in vitro* de FOPAs e a necessidade ou não de suplementar este meio FSH. Considerando a avaliação criteriosa dos diferentes parâmetros, como morfologia, ultraestrutura e ativação de FOPAs, os autores concluíram que o melhor meio de base para o cultivo de FOPAs desta espécie é o TCM199 suplementado com FSH, uma vez que este meio garantiu a

manutenção da morfologia folicular pós cultivo e estimulou a proliferação de CGs e a preservação da matriz extracelular ao longo dos 7 dias de cultivo (LIMA et al., 2018).

O trabalho inicial de cultivo *in vitro* e FOPAs de catetos realizado por Lima et al. (2018) estabeleceu o meio adequado para o desenvolvimento *in vitro* de FOPAs nesta espécie. A partir de então, outros aspectos do cultivo considerados importantes para o sucesso do desenvolvimento folicular *in vitro* deverão ser estudados. Esses aspectos incluem a avaliação do tempo de cultivo e a atmosfera gasosa utilizada (SILVA et al., 2010b), que irão proporcionar o ambiente ideal para o desenvolvimento folicular (TELFER et al., 2000), bem como o regime de troca de meio (MAGALHÃES et al., 2012) e sua suplementação com diferentes hormônios e fatores de crescimento, os quais proporcionarão o estímulo adequado ao crescimento dos folículos em suas diferentes fases. Estes fatores têm sido exaustivamente investigados devido seus efeitos positivos sobre o desenvolvimento dos FOPAs *in vitro*, principalmente aqueles fatores que podem estar relacionados aos mecanismos de ativação do folículo primordial (BERTOLDO et al., 2018). Dentre as substâncias utilizadas com sucesso no cultivo *in situ* pode-se destacar a BMP15, que atua positivamente no desenvolvimento *in vitro* de FOPAs em diferentes espécies (CELESTINO et al., 2011; LIMA et al. 2012a; FENWICK et al., 2013; PASSOS et al., 2013; SALEHNIA; PAJOKH; GHORBANMEHR, 2016).

2.7 Proteína morfogenética óssea 15 (BMP15)

A BMP15 ou fator de crescimento e diferenciação 9B (GDF9B) faz parte do grande grupo de polipeptídeos multifuncionais pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento transformantes β (TGF- β) com funções fisiológicas essenciais na morfogênese e organogênese de vertebrados e invertebrados (GRANJEIRO et al., 2005; PANGAS, 2012; CASTRO; CRUZ; LEAL, 2016). Atualmente, o papel das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) no sistema reprodutivo de qualquer espécie é pouco compreendido. A primeira associação dessas moléculas com a reprodução foi a descoberta de um sistema BMP funcional no ovário de camundongos, repleto de ligantes e receptores, o que denotou que essas moléculas poderiam atuar diretamente nesse sistema (SHIMAZAKI et al., 1999). A taxa da expressão de mRNA da BMP15 em ovários, é espécie-específica, e já foi determinada em um amplo espectro de animais domésticos e silvestres (CRAWFORD; McNATTY, 2012). Ainda no ovário, a BMP15 desempenha papéis fundamentais na foliculogênese e oogênese, desde a formação e função das células germinativas, estereoidogênese, até os mecanismos de apoptose e proliferação celular (JUENGEL; McNATTY, 2005; ROSSI et al., 2016). Além disso, as mutações genéticas que ocorrem naturalmente dos ligantes e a sinalização desregulada da BMP15 estão associadas a

patologias da reprodução humana (PERSANI et al., 2014; QIN et al., 2015) o que reforça o interesse em elucidar os mecanismos de atuação deste fator e seus efeitos no cultivo *in vitro*.

Diversos autores estudaram, recentemente, o efeito de diferentes concentrações da BMP15 no cultivo de folículos ovarianos de diferentes espécies. Em caprinos, Celestino et al. (2011) avaliaram o cultivo *in situ* de 7 dias, utilizando diferentes concentrações, e constataram que as concentrações de 50 e 100 ng/ml mantiveram morfologia folicular normal e promoveram o crescimento folicular e oocitário. Nessa mesma espécie, Lima et al. (2012a) observaram que a concentração de 50 ng/ml foi mais eficiente em manter a sobrevivência folicular e estimular a formação do antro após 18 dias de cultivo de folículos secundários isolados. Em murinos, Fenwick et al. (2013) e Salehnia; Pajokh; Ghorbanmehr (2016) testaram a associação da BMP15 com GDF9 e FSH, respectivamente. Esses autores observaram que a associação da BMP15 com ambos os fatores estimulou um desenvolvimento folicular significativo. Em bovinos, Passos et al. (2013), avaliaram o efeito da BMP15 sozinha ou associada ao FSH, e observaram que a associação dessas substâncias promove um maior crescimento dos folículos secundários cultivados isolados, no entanto, o maior crescimento obtido resultou em alterações ultraestruturais nos folículos e maior taxa de apoptose das CGs. Desta forma, os autores não recomendam a associação da BMP15 ao FSH para o cultivo de folículos secundários, e sim o uso individual das mesmas.

Em suínos, espécie doméstica mais próxima do cateto, ainda não existe relatos do papel da BMP15 na foliculogênese pré-antral. No entanto, já foram identificadas a expressão de mRNA e da proteína BMP15 em baixos níveis em oócitos de folículos antrais imaturos, e níveis mais elevados a partir de 18 horas de MIV, o que coincide com o tempo de expansão das células do cumulus, sugerindo que esse fator pode atuar durante a maturação oocitária *in vitro* (LI et al., 2008). Posteriormente, confirmando os achados anteriores nesta espécie, a suplementação do meio de MIV com BMP15 promoveu a expansão das células do cumulus e estimulou a atividade do fator promotor de maturação (MPF) e da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK) (LIN et al., 2014). Ainda em suínos, foi constatado que os níveis de apoptose nas células do cúmulo cultivadas *in vitro* diminuem de maneira dose-dependente na presença da BMP15 (ZHAI et al., 2013).

Assim como a maior parte das moléculas da sua família, a BMP15 exerce seus efeitos sobre as células por meio da ligação com dois receptores serina/treonina quinase presentes na superfície celular, denominados de receptores Tipo I e Tipo II (CHANG; BROWN; MATZUK, 2002). Até o presente momento, sete receptores Tipo I e cinco receptores Tipo II já foram identificados em mamíferos. As BMPs podem se ligar a três tipos de receptores I: receptor de

ativina semelhante a quinase 2 (Alk2), receptor de ativina semelhante a quinase 3 (Alk3 ou BMPR1A) e receptor de ativina semelhante a quinase 6 (Alk6 ou BMPR1B). Além dos receptores tipo I, existem também três tipos de receptores II: receptor para BMP tipo II (BMPRII), receptor para ativina tipo IIA (ActR-IIA) e receptor para ativina tipo IIB (ActR-IIB) (BLANCO CALVO et al., 2009). Dentre estes, o ALK-6 e o BMPR-II têm sido caracterizados como os receptores de maior afinidade para a BMP15 (MOORE; SHIMASAKI, 2005; KNIGHT; GLISTER, 2006). A especificidade de sinalização das BMPs é largamente mediada por receptores tipo I (HSU; HSUEH, 2005; KIM et al., 2005).

A atuação da BMP15 se dá através da ligação primária ao receptor ALK-6 que, em seguida, recruta o receptor BMPR-II que se liga ao complexo BMP15:ALK-6 pré-formado (MOORE; OTSUKA; SHIMASAKI, 2003; SHIMASAKI et al., 2004). O receptor BMPR-II induz à fosforilação do ALK-6 previamente ligado à BMP15. Essa fosforilação desencadeia a fosforilação de moléculas de sinalização intracelular denominadas SMADs. Essas moléculas, classificadas como SMADS 1, 5 e 8, interagem com outra molécula (SMAD 4), resultando na formação de um complexo sinalizador. Os complexos de SMADs são enviados para o núcleo da célula-alvo, onde atuam na regulação da transcrição de genes específicos (MOORE; SHIMASAKI, 2005; CASTRO; CRUZ; LEAL, 2016). Além da via de sinalização celular mediada pelas SMADS, evidências indicam que outras vias sinalizadoras também estão envolvidas na ação da BMP15, como por exemplo, a modulação dos sinais das BMPs promovidos pelas MAPK. Estas, atuam em pontos comuns com a via SMAD ativadas e podem transduzir positivamente os sinais de proteínas BMPs (SU et al., 2002) ou atuar como inibidores da sinalização SMAD (VON BUBNOFF; CHO, 2001).

A presença dos receptores de BMPs já foi identificada em oócitos e CGs de diferentes espécies, sugerindo assim, um importante papel da BMP15 na regulação da função destes dois tipos celulares durante o desenvolvimento folicular (LIMA et al., 2010). Segundo Moore, Otsuka e Shimasaki (2003), os efeitos positivos da BMP15 sobre a proliferação e diferenciação das CGs são dependentes da atuação de moléculas específicas da família MAPK, o que reforça a existência de uma via alternativa para regulação da ação da BMP15. Adicionalmente, verificou-se que a folistatina, importante proteína de ligação expressa nas CGs, pode bloquear a bioatividade da BMP15 (OTSUKA et al., 2001), consistindo em uma via complementar de regulação da proteína. Além disso, diversas outras substâncias da mesma família, como por exemplo, o GDF9, podem atuar em sinergismo, potencializando a ação da BMP15 (YAN et al., 2001).

Apesar de todo esse conhecimento, até o momento da elaboração do projeto que deu origem ao presente trabalho ainda não era conhecido o efeito da BMP15 sobre o desenvolvimento de FOPAs de catetos. A partir da constatação dos efeitos benéficos dessa substância no cultivo *in vitro* de FOPAs de outras espécies, faz-se necessário o estudo de diferentes concentrações da BMP15 no cultivo *in situ* de FOPAs de catetos visando avaliar a ativação e o desenvolvimento folicular no tecido ovariano destes animais. Isso contribuirá para maior aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas e posteriormente na obtenção de oócitos competentes para serem utilizados em outras biotécnicas reprodutivas, tais como a produção *in vitro* de embriões, clonagem e transgenia.

3. JUSTIFICATIVA

Os catetos são animais que desenvolvem funções primordiais no ecossistema em que vive, atuando na disseminação de sementes de diversas espécies de plantas e na composição da cadeia alimentar, sendo predados pelos grandes felinos. Além disso, é a única espécie da família Tayassuidae que não apresenta risco de extinção, podendo assim ser utilizada como modelo de estudos para outras espécies que já se encontram em risco, como o queixada e o taguá. Ademais, o cateto representa uma atrativa fonte de renda através da criação comercial, que possibilita a comercialização de sua carne e pele, vendidas como produtos exóticos.

Logo, a utilização de biotécnicas reprodutivas nesta espécie vem sendo desenvolvidas nos últimos anos com o intuito de otimizar o aproveitamento do potencial reprodutivo destes animais. Nesse sentido, o emprego do cultivo *in vitro* de FOPAs surge como uma ferramenta importante para aproveitar a reserva folicular ovariana das fêmeas, que no futuro, poderá ser utilizada para gerar um grande número de oócitos que poderão armazenados em bancos de germoplasma, garantindo conservação dos recursos genéticos destes animais, ou serem utilizados em outras biotécnicas, como a produção *in vitro* de embriões, clonagem e transgenia, por exemplo.

Dentre as substâncias utilizadas com sucesso do cultivo *in vitro* de FOPAs, está a BMP15, que já foi testada em diferentes espécies como caprinos, murinos e bovinos. Este fator de crescimento tem sido associado ao estímulo da ativação dos folículos primordiais, a proliferação das CGs e da teca, e ao controle da atresia e esteroidogênese, sendo portanto, de grande importância para a foliculogênese destas espécies. Mesmo diante do grande potencial de atuação nas espécies supracitadas, incluindo ainda os seres humanos, a BMP15 ainda não havia sido testada no cultivo *in vitro* de FOPAs de catetos.

Assim, a realização deste estudo auxiliará a elucidação dos fatores que regulam a foliculogênese inicial de catetos bem como contribuirá para o desenvolvimento posterior de um meio de cultivo ideal para o crescimento de folículos primordiais nesta espécie.

4. HIPÓTESES

- A BMP15 influencia, de forma dose resposta, a viabilidade, a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais de catetos cultivados *in situ* por 6 dias.
- A BMP15 influencia, de forma dose resposta, o potencial de proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais cultivados *in situ*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

- Estudar o efeito da BMP15 sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de catetos cultivados *in situ* por 6 dias.

5.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da BMP15 sobre a morfologia dos folículos de catetos cultivados *in situ* por 6 dias;
- Verificar o efeito de diferentes concentrações da BMP15 sobre a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais após 6 dias de cultivo;
- Analisar o potencial de proliferação das células da granulosa durante o cultivo *in vitro* dos folículos pré-antrais de catetos em diferentes concentrações de BMP15.

6. CAPÍTULO II

Artigo técnico submetido ao periódico *Reproduction in Domestic Animals* que possui qualis CAPES A2 na área de Medicina Veterinária, referente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA. Além disso o referido periódico possui fator de impacto pontuado em 1.422.

BMP15 STIMULATES *IN VITRO* DEVELOPMENT OF PREANTRAL FOLLICLES OF COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1958)

**Henrique Albano Nogueira Gomes¹, Livia Batista Campos¹, Érica Camila Gurgel
Praxedes¹, Moacir Franco de Oliveira³, Alexsandra Fernandes Pereira², Alexandre
Rodrigues Silva¹, Márcia Viviane Alves Saraiva¹.**

1 Laboratory of Animal Germoplasm Conservation, Federal Rural University of the Semi-arid Region, Mossoró, Brasil

2 Laboratory of Animal Biotechnology, Federal Rural University of the Semi-arid Region, Mossoró, Brasil

3 Laboratory of Animal Morphophysiology, Federal Rural University of the Semi-arid Region, Mossoró, Brasil

Corresponding Author: Henrique Albano Nogueira Gomes

Institutional address: Laboratory of Animal Germoplasm Conservation, Federal Rural University of the Semi-arid Region, Avenida Francisco Mota, 572 – Bairro: Presidente Costa e Silva, Mossoró - RN, 59625-900 Mossoró, Brasil

Email for corresponding author: henrique-guns@hotmail.com

Contents:

This study investigates the effects of BMP-15 on in vitro development of preantral follicles of collared peccaries. Ovarian fragments were cultured for one or six days in Tissue Culture Medium-199 (TCM199⁺) supplemented with BMP-15 (0, 1, 25 or 50 ng/mL), and further analyzed by histology, evaluating follicular morphology, activation and growth, as well as the potential for proliferation of granulosa cells. After culture, addition of BMP15 (25 ng/ml) in medium supplemented had the highest percentage of normal follicles ($79.67 \pm 0.69\%$) when compared to other treatments ($P < 0.05$), but was similar to treatment 1 ng/mL BMP15 ($74.00 \pm 1.90\%$) ($P > 0.05$). In addition, concentrations of 25 ng/ml and 50 ng/ml were able to promote follicular activation. However, this substance did not demonstrate effects on oocyte and follicular growth. All the concentrations of BMP15 evaluated increased the number of NORs after 1 day of culture in relation to fresh and cultured control ($P < 0.05$), but, at the end of culture, number of NORs in follicles cultured in all treatments was higher than that observed in the fresh control. ($P > 0.05$). In conclusion, addition of 25 ng/ml of BMP15 to culture medium of peccaries preantral follicles maintains a high number of morphologically healthy follicles and stimulates activation of primordial follicles after 6 days of culture.

Keywords: Tayassuidae. Follicular activation. Wild life. Biobank.

Introduction

The collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) are important wild animals, in aspect economic and ecological. Use of reproductive potential of captive peccaries contributes to reduction of predatory hunting, favoring the maintenance of this species and its predators, providing an economical alternative for breeders through the marketing of meat and skin of these animal (Nogueira & Nogueira-Filho, 2011). At the same time, being the only species of

Tayassuidae family that is not threatened with extinction (Gongora et al., 2011), it may serve as an excellent experimental model for the development of reproductive biotechniques of species that present this risk, such as white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) (Keuroghlian et al., 2013) and the chacoan peccary (*Catagonus wagneri*) (Altrichter et al., 2015).

In order, to increase the utilization of reproductive potential of wild animals, several studies have been developed to elucidate the reproductive physiology and to develop efficient protocols for different reproductive biotechnologies of these species. In the last decade, in peccaries, great advances have been achieved in development and/or improvement of biotechnology already established in production animals, such as estrus synchronization (Maia et al., 2014), artificial insemination (Peixoto et al., 2017), and in handling of preantral follicles with development of protocols of cryopreservation (Lima et al., 2012a) and in vitro culture (Lima et al., 2018).

The preantral follicles enclosed in ovarian cortex represent about 95% of the entire follicular population, representing the female reserve pool that remain dormant until follicular activation. Follicular activation is characterized by the ability of follicle to initiate growth and development, in which the primordial follicle leaves the pool of quiescent follicles and enters the pool of developing follicles (van den Hurk & Zhao, 2005; Kim, 2012; Bertoldo et al., 2018). The maintenance of quiescence or activation and development of primordial follicles are controlled by coordinated actions of suppressor and/or activator with close communications among somatic cells and oocytes through several signaling pathways (Kim, 2012). Similarly, in developing preantral follicles after activation, the regulation of cell proliferation and differentiation is also tightly coordinated. Recent observations have suggested that molecules produced by the oocyte may be involved in the process, such as bone morphogenetic protein-15 (BMP15), a member of superfamily of transforming growth factor beta (TGF β) (Castro et al., 2016; Rossi et al., 2016).

The first association of these molecules with reproduction was the discovery of a functional BMP system in the ovary of mice, filled with ligands and receptors, which denoted that these molecules could act directly in this reproductive system (Shimazaki et al., 1999). Since then, it has been studied BMP-15 action mechanism, rate of mRNA expression of BMP15 ligands and its receptors (Li et al., 2008; Crawford et al., 2012), supplementation of in vitro culture media of preantral follicles in caprine (Celestino et al., 2011; Lima et al., 2012b), bovine (Passos et al., 2013), murine (Fenwick et al., 2013; Salehnia et al., 2016) and in vitro maturation of oocytes in porcine with BMP15 (Lin et al., 2014). The results of these studies confirm that BMP-15 is expressed at all stages of follicular development, and therefore exerts important effects on the in vivo and in vitro follicle development and ovulation. Moreover, it is important to note that mutations and deletions in the BMP15 gene and its unregulated signaling have lead altered reproductive function (Persani et al., 2014; Qin et al., 2015; Kumar, et al., 2017).

Despite all this knowledge, and, although the use of this substance in the culture of preantral follicles have already been reported successfully, to date, the effects of BMP15 on preantral folliculogenesis of peccaries are still unknown. Thus, the present work aimed to study the effect of different concentrations of BMP15 on activation and development of peccaries preantral follicles cultured in vitro.

Materials and Methods

Bioethics and Experimental Animals

The ethics committee of the UFERSA approved the experimental protocols as well as animal care procedures used (Process no. nº 23091.006525 / 2016-82) and was authorized by the Chico Mendes Institute of Biodiversity (SISBio nº 37329). All chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

Initially 10 ovaries from 5 peccaries were collected and rinsed in 70% alcohol and then two times in minimum essential medium (MEM). The ovaries was derived from five sexually mature females (~3 years old). Animals belonged to Center of Wild Animal Multiplication (CEMAS), UFERSA, Mossoró, RN, where happens a programmed slaughter conducted every year for population control, and carcasses are destined to various studies in the fields of morphology, histology, physiology, pathology and others. Pairs of ovaries were transported within 1 h to laboratory in MEM at 4°C.

In vitro culture of ovarian fragments

The cortical tissue from each ovarian pair was cut into slices ($3 \times 3 \times 1$ mm) using a needle and scalpel under sterile conditions. One fragment was directly fixed for histological analysis (non-cultured/fresh control), and others fragments were cultured for 1 or 6 days (Matos et al., 2007). Briefly, fragments were placed into 24-well culture dishes containing 1 ml of culture media. Culturing was conducted at 38,5°C in 5% CO₂ in a humidified incubator, and the media were incubated for 1 h prior to the use. The basic culture medium (cultured control) consisted of TCM199 (pH 7.2–7.4) supplemented (+) with ITS (insulin 10 µg/ml, transferrin 5.5 µg/ml and selenium 5.0 ng/ml), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/ml bovine serum albumin (BSA) (Lima et al., 2018). For experimental conditions, the medium was supplemented or not by recombinant human BMP15 (rBMP15 – 1, 25 and 50 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Each treatment was replicated five times, and culture media were replaced every 48h. Before or after 1 or 6 days in culture, part of the tissues were fixed in paraformaldehyde solution for 12h and subjected to histological processing to morphological analysis, assessment of in vitro follicular growth and AgNOR evaluation.

Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

After fixation in Carnoy solution, ovarian fragments were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, embedded in paraffin (Synth, São Paulo, Brazil) and cut into 7- μ m sections. Every 5th section was mounted on glass slides that were stained by hematoxylin-eosin. Follicular stage and survival were assessed microscopically ($\times 400$) on serial sections. These follicles were classified as morphologically normal or degenerated and also by the developmental stages of follicles were classified as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened to cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells; and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte) (Silva et al., 2004).

To evaluate follicular activation, percentages of healthy primordial and growing follicles were calculated before (fresh control) and after culturing in each medium. In addition, follicle and oocyte diameters were measured ($400\times$) only in healthy follicles (Matos et al., 2007). Each follicle was examined in every section in which the nucleus appeared and matched with same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once, regardless of its size.

Assessment of Cell Proliferation

The proliferation rate of follicular cells in all treatments was evaluated by quantifying the number of argyrophilic (Ag) nucleolus organizer regions (NORs). The ovarian fragments were fixed in 4% paraformaldehyde overnight (4°C) and subjected to histological processing described above. For NORs marking, slides containing tissue sections were stained with 50% silver nitrate solution in a colloid solution (2:1) in a darkroom and counterstained with potassium metabisulfite and sodium thiosulphate. To quantify the NORs, 30 growing follicles were visualized under a light microscope ($1000\times$) and NORs of all nuclei of visible granulosa cells were counted (Matos et al., 2003).

Statistical Analysis

Data were initially analyzed by Smirnov-Kolmogorov and Bartlett tests to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. The two-way analysis of variance (two-way ANOVA) test was then carried using the GraphPad Prism (6.0), and the Tukey test was applied for the comparison of each treatment. In all cases, differences were considered statistically significant when $p < 0.05$, and the results were expressed as the mean $\pm$ standard error (SE).

Results

Morphology and Follicular Activation

Table 1 shows the percentage of morphologically normal preantral follicles, before and after 1 and 6 days of culture. Morphological normal follicles exhibited oocyte with central nucleus and intact and organized granulosa cells, while degenerated follicles showed nuclear pyknosis and/or, cytoplasmic retraction or disorganization of granulosa cells (Figure 1). After 1 day of culture, all treatments maintained percentage of normal follicles similar to control ($P > 0.05$). On the other hand, after 6 days, a significant reduction in follicular survival was observed in all treatments tested ($P < 0.05$) in relation to the fresh control and to respective treatments on day 1. The fragments cultured in medium supplemented with 25 ng/mL of BMP15 had the highest percentage of normal follicles ($79.67 \pm 0.69\%$) when compared to other treatments ($P < 0.05$), but was similar to treatment 1 ng/mL of BMP15 ($74.00 \pm 1.90\%$) ($P > 0.05$) (Table 1).

Prior to culture, ovarian tissue predominantly contained primordial follicles ($86.50 \pm 2.20\%$), and, after 6 days, was observed a significant reduction of percentage of primordial and

concomitant increasing of growing follicles in all tested treatments, denoting follicular activation (Figure 2). Moreover, addition of 25 and 50 ng/mL of BMP15 to medium increased the percentage of activated follicles in relation to cultured control ($P<0.05$).

Follicle and Oocyte Morphometry

Oocyte diameter was not affected by treatments ($P>0.05$) on the first day of culture (Table 2). However, after 6 days, was observed oocyte growth in all treatments in relation to fresh control ($P<0.05$). Furthermore, BMP15 at 25 and 50 ng/ml stimulated an increase in oocyte diameter from day 1 to day 6 ($P<0.05$) (Table 2). In parallel, follicular diameter was not also affected during the first day of culture in relation to fresh control ($P>0.05$), except at the concentration of 1 ng/ml ($P<0.05$) (Table 3). However, addition of 1 ng/ml of BMP15 stimulated a higher follicular growth than other treatments ($P<0.05$). After 6 days, follicle diameter increased in all treatments ($P<0.05$) when compared to fresh control, but, no significant difference among treatments was observed ($P>0.05$) (Table 3).

AgNOR: Cell Proliferation

Table 4 shows the mean number of NORs counted in granulosa cells of morphologically normal preantral follicles of peccaries. NORs counted in the granulosa cells are represented in figure 3 by black arrows. After one day, all the concentrations of BMP15 used showed higher number of NORs than fresh and cultured control ($P<0.05$). Moreover, after 6 days, all treatments showed higher number of NORs than control fresh ($P<0.05$), and only the cultured control increased number of NORs when compared to day 1 ($P<0.05$). However, at the end of culture no differences were observed between the treatments tested ($P>0.05$).

Discussion

To our knowledge, this is the first study to report the effect of BMP15 on preantral in vitro culture in peccaries, in order to evaluate survival, activation, follicular growth, and proliferation of granulosa cells.

After 6 days of culture, it was obtained a large number of follicles with normal morphology in all treatments (>57.33%), probably due to excellent base medium used (TCM199⁺). The use of TCM199⁺ as base medium for IVC of preantral follicles in peccaries was established previously (Lima et al., 2018), which obtained a percentage of morphologically normal follicles of 63.2% after 7 days of culture, similar to found in the present study ($64.67 \pm 2.49\%$). However, addition of 25 ng/mL of BMP15 made it possible to maintain a higher percentage of morphologically normal follicles ($79.67 \pm 0.69\%$) in comparison to cultured control. Similar to our results, BMP15 has maintaining the survival of preantral follicles cultured in vitro in different species, such as goat (Celestino et al., 2011; Lima et al., 2012b), cattle (Passos et al., 2013), and mouse (Fenwick et al., 2013; Salehnia et al., 2016). BMP15 has been linked to maintenance the follicle survival, and the occurrence of genetic mutations of ligands and unregulated signaling of BMP15 are associated with pathologies of human reproduction (Persani et al., 2014; Qin et al., 2015; Kumar et al., 2017). Multiple mutations in gene encoding BMP15 were identified in women with premature ovarian failure (Kumar et al., 2017; Mayer et al., 2017; Patiño et al., 2017), supporting a role of this protein in follicular survival.

In present study, although the follicular activation has been observed after 6 days of culture in all treatments, including cultured control, the addition of BMP15 at 25 or 50 ng/mL significantly increased the percentage of activated follicles compared to cultured control. Similarly, in goats, after 7 days of culture, BMP15 promoted activation of primordial follicles when used in concentrations higher than 10 ng/ml (Celestino et al., 2011). Expression of BMP15 genes is higher in primordial follicles compared to others preantral follicles or even

antral follicles (Kona et al., 2016), which suggests that its expression may be required to recruitment or activation of primordial follicles (Choi & Rajkovic, 2006). However, mechanisms that regulate activation of primordial follicles can be influenced by several growth factors acting alone or in synergism (Chang et al., 2017), and the understanding of these mechanisms is one of the main challenge for fertility preservation strategies (Bertoldo et al., 2018).

After 6 days of IVC, morphometric analysis evidenced oocyte and follicular growth in all cultured treatments, there being no difference between it. This result was extremely encouraging, since that, so far, preantral follicles of peccaries cultured in vitro have not grown and also, decreased in size after 7 days of culture (Lima et al., 2018). This difference may be due some protocol modification and period of the year in which both experiments was performed. Thus, although BMP15 did not influenced the oocyte and follicle diameter in the present study, it was demonstrated for the first time the possibility of growth of preantral follicles peccaries in vitro. In contrast, it is known that BMP15 stimulates follicle in vitro development by activating primordial follicles (Castro et al., 2016; Cunha et al., 2017) or developing secondary follicles (Passos et al., 2013). Probably, concentrations of BMP15 and/or culture system conditions and time used in the present study may have been insufficient to make follicular growth evident.

Concurrently, in the present study, quantification of the NORs was performed by AgNOR technique. This quantification of AgNORs has been made to characterize and differentiate the proliferative potential of pathological conditions as neoplasms (Gossler et al., 2017) and as appropriate parameter for differentiation of proliferative potential of non-neoplastic granulosa cells (Silva et al., 2003; Lima et al., 2018; Lopes et al., 2018). NORs are segments of chromosomal DNA that are associated with potential cell proliferation. Specifically, a higher proliferative activity of cell, increase the amount of NORs observed.

NORs are selectively marked by silver and are; therefore, called AgNORs, which are identified as brownish or black spots within the cells present in histological sections.

It was demonstrated that addition of BMP15 to base medium promoted an increase in NORs number, indicating a superior potential for granulosa cell proliferation in initial phase (day 1) of culture. On the other hand, at the end (day 6) of the culture, potential for cell proliferation became equivalent among all treatments tested and higher than fresh control. However, the increase in the cell proliferation potential at day 1 of culture was not accompanied by subsequent follicular growth, as was indeed expected. Probably, other growth factors and/or hormones are needed to continue the proliferation of newly activated granulosa cells after the initial stimulation triggered by BMP15. Recently, was performed the AgNOR technique to evaluate the proliferation of healthy granulosa cells in peccaries obtaining a rate of 1.98 ± 0.07 in uncultured fresh tissue and of 2.46 ± 0.13 in culture using TCM199 for 7 days (Lima et al., 2018).

In summary, the use of BMP15 at 25 ng/ml provided conditions to maintenance normal morphology and stimulated primordial activation after 6 days of IVC of ovarian tissue of peccaries. It is worth mentioning that this is the first study demonstrating the growth of preantral follicles of peccaries during in vitro culture, and one of the first experiments to evaluate a growth factor in development in vitro of preantral follicles in this specie. Although more studies are required to investigate other substances and, possibly, the culture of isolated follicles in order to improve IVC protocols, this study represents an important step allowing the comprehension of elements influencing in vitro peccaries preantral follicles development.

Acknowledgments

This work was supported by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

Altrichter, M., Taber, A., Noss, A., Maffei, L., & Campos, J. 2015. *Catagonus wagneri*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T4015A72587993

Bertoldo, M. J., Walters, K. A., Ledger, W. L., Gilchrist, R. B., Mermillod, P., & Locatelli, Y. 2018. *In-vitro* regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. *Reproductive Biomedicine Online*, 36, 491-499. doi:10.1016/j.rbmo.2018.01.014

Castro, F. C., Cruz, M. H. C., & Leal, C. L. V. 2016. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29, 1065-1074. doi:10.5713/ajas.15.0797

Celestino, J. J. H., Lima-Verde, I. B., Bruno, J. B., Matos, M. H., Chaves, R. N., Saraiva, M. V. A., Silva, C. M., Faustino, L. R., Rossetto, R., Lopes, C. A., Donato, M. A., Peixoto, C. A., Campello, C. C., Silva, J. R., & Figueiredo, J. R. 2011. Steady-state level of bone

morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 338 (1-2), 1–9. doi:10.1016/j.mce.2011.02.007

Chang, H., Qiao, J., & Leung, P. C. K. 2017. Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*, 23(1), 1–18. doi:10.1093/humupd/dmw039

Choi, Y., & Rajkovic, A. 2006. Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 579–590. doi:10.1007/s00018-005-5394-7

Crawford, J. L., & McNatty, K. P. 2012. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348, 339–343. doi:10.1016/j.mce.2011.09.033

Cunha, E. V., Souza, G. B., Passos, J. R. S., Silva, A. W. B., Dau, A. M., Saraiva, M. V. A., Lobo, R. N. B., & Silva, J. R. V. 2017. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on *in vitro* development and survival of bovine preantral follicles enclosed in fragments ovarian tissue. *Zygote*, 25, 256–264. doi:10.1017/S0967199417000089

Fenwick, M. A., Mora, J. M., Mansour, Y. T., Baithun, C., Franks, S., & Hardy, K. 2013. Investigations of TGF- β Signaling in Preantral Follicles of Female Mice Reveal Differential Roles for Bone Morphogenetic Protein 15. *Endocrinology*, 154, 3423–3436. doi:10.1210/en.2012-2251

Gongora, J., Reyna-Hurtado, R., Beck, H., Taber, A., Altrichter, M., & Keuroghlian, A. 2011. *Pecari tajacu*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T41777A10562361

Gossler, V. S. A., Santos, F. A. G., Azevedo, A. R. D., Gonçalves, P. C., Rigolo, H. A., Trevisan, C., Masseno, A. P. B., Cardoso, A. P. M. M., Papa, P. C., Castilho, C., & Giometti, I. C. 2017. Evaluation of cell proliferation and endometrial thickness of bitches in different periods of diestrus. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 1719–1727. doi:10.1590/0001-3765201720150611

Keuroghlian, A., Desbiez, A., Reyna-Hurtado, R., Altrichter, M., Beck, H., Taber, A. & Fragoso, J. M. V. 2013. *Tayassu pecari*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T41778A44051115

Kim, J. Y. 2012. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39, 10-14. doi:10.5653/cerm.2012.39.1.10

Kona, S. S. R., Chakravarthi, V. P., Kumar, A. V. N. S., Srividya, D., Padmaja, K., & Rao, V. H. 2016. Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology*, 85, 315-22. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.022

Kumar, R., Alwani, M., Kosta, S., Kaur, R., & Agarwal, S. 2017. BMP15 and GDF9 gene mutations in premature ovarian failure. *Journal of Reproduction & Infertility*, 18, 185-189.

Li, H., Kuo, T., Yang, H., Chen, L., Li, S. S., & Huang, H. 2008. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Animal Reproduction Science*, 103, 312–322. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.12.017

Lima, G. L., Luz, V. B., Alves, A. M. C. V., Lunardi, F. O., Souza, A. L. P., Peixoto, G. C. X., Rodrigues, A. P. R., Oliveira, M. F., Silva, A. R. 2012a. Vitrification of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) ovarian tissue using various cryoprotectants? Preliminary results. In: IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Campinas. *Animal Reproduction*, 9, 957.

Lima, G. L., Luz, V. B., Lima, L. F., Rocha, R. M. P., Castro, S. V., Castelo, T. S., Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. R., & Silva, A. R. 2018. Interactions between different media and follicle-stimulating hormone supplementation on in vitro culture of preantral follicles enclosed in ovarian tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Reproduction in Domestic Animals*. 53, 880-888. doi:10.1111/rda.13179

Lima, I. M., Brito, I. R., Rossetto, R., Duarte, A. B., Rodrigues, G. Q., Saraiva, M. V., Costa, J. J., Donato, M. A., Peixoto, C. A., Silva, J. R., Figueiredo, J. R., & Rodrigues, A. P. 2012b. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. *Cell and Tissue Research*, 348, 225–238. doi:10.1007/s00441-012-1361-4

Lin, Z., Li, Y., Xu, Y., Wang, Q., Namgoong, S., Cui, X., & Kim, N. 2014. Effects of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 on the in vitro Maturation of Porcine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 219–227. doi:10.1111/rda.12254

Lopes, K. R. F, Praxedes, E. C. G., Campos, L. B., Bezerra, M. B., Lima, G. L., Saraiva, M. V. A., & Silva, A. R. 2018. Vitrification of ovarian tissue of Brazilian North-eastern donkeys (*Equus asinus*) using different cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 1060-1067. doi: 10.1111/rda.13203

Maia, K. M., Peixoto, G. C. X., Campos, L. B., Silva, A. M.; Castelo, T. S., Ricarte, A. R., & Silva, A. R. 2014. Estrous synchronization in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*) Using a Prostaglandin F2 α Analog. *Zoological Science*, 31, 836-839. doi:10.2108/zs140112

Matos, M. H. T., Lima-Verde, I. B., Luque, M. C. A., Maia Júnior, J. E., Silva, J. R. V., Celestino, J. J. H., Martins, F. S., Bão, S. N., Lucci, C. M., & Figueiredo, J. R. 2007. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, 15, 173–182. doi:10.1017/S0967199407004169

Mayer, A., Fouquet, B., Pugeat, M., & Misrahi, M. 2017. BMP15 "knockout-like" effect in familial premature ovarian insufficiency with persistent ovarian reserve. *Clinical Genetics*, 92, 208-212. doi:10.1111/cge.12970

Nogueira, S. S. C, Nogueira-Filho, S. L. G. 2011. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests. *Biodiversity and Conservation*, 20, 1385–1397. doi.org/10.1007/s10531-011-0047-7

Passos, M. J., Vasconcelos, G. L., Silva, A.W., Brito, I. R., Saraiva, M. V., Magalhães, D. M., Costa, J. J., Donato, M. A., Ribeiro, R. P., Cunha, E. V., Peixoto, C. A., Campello, C. C., Figueiredo, J. R., van den Hurk, R., & Silva, J. R. 2013. Accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. *Theriogenology*, 79, 1269–1277. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.02.023

Patiño, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., Agapiou, D., Gilchrist, R. B., Laissue, P., & Harrison, C. A. 2017. BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102, 1009-1019. doi:10.1210/jc.2016-3503

Peixoto, G. C. X., Praxedes, E. C. G., Silva, A. M., Campos, L. B., Lago, A. E. A., Bezerra, L. G. P., Moreira, S. S. J., Apolinario, C. A. C., Brito, A. B., Domingues, S. F. S., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. 2017. Estrous Synchronization Followed by Artificial Insemination in Collared Peccaries (*Pecari tajacu*) - The First Attempt. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Campos do Jordão. *Animal Reproduction*, 14, 147.

Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatore, C., Fabre, S. 2014. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human Reproduction Update*, 20, 869–883. doi:10.1093/humupd/dmu036

Qin, Y., Jiao, X., Simpson, J. L., & Chen, Z. J. 2015. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Human Reproduction Update*, 21, 787–808. doi:10.1093/humupd/dmv036

Rossi, R. O., Costa, J. J., Silva, A. W., Saraiva, M. V., van den Hurk, R., & Silva, J. R. 2016. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. *Zygote*, 24, 1–17. doi:10.1017/S096719941400077X

Salehnia, M., Pajokh, M., & Ghorbanmehr, N. 2016. Short Term Organ Culture of Mouse Ovary in the Medium Supplemented with Bone Morphogenetic Protein 15 and Follicle Stimulating Hormone: A Morphological, Hormonal and Molecular Study. *Journal Reproduction and Infertility*, 17, 199-207.

Shimasaki, S., Zachow, R. J., Li, D., Kim, H., Iemura, S. I., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R. J., & Erickson, G. F. 1999. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Cell Biology*, 96, 7282–7287.

Silva, C. M., Serakides, R., Nascimento, E. F., Nunes, V. A., & Ribeiro, A. F. C. 2003. Quantification of the nucleolar organizer regions (NORs) as a parameter to measure proliferation of granulosa cells. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55, 551–556. doi.org/10.1590/S0102-09352003000100019

Silva, J. R. V., van den Hurk, R., Costa, S. H. F., Andrade, E. R., Nunes, A. P. A., Ferreira, F. V. A., Lobo, R. N., & Figueiredo, J. R. 2004. Survival and growth of goat primordial follicles

after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81, 273–286. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.09.006

van den Hurk, R., & Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717-1751. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.08.005

TABLE 1. Percentages of normal follicles in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15.

% Normal Follicles ($\pm$ S.E.)		
Treatments	Fresh Control: 92.68 ± 1.09	
	Day 1	Day 6
Cultured		
Control	88.67 ± 0.82 a	64.67 ± 2.49 bB*
1 ng/ml	90.00 ± 1.83 a	74.00 ± 1.90 bAB*
25 ng/ml	92.67 ± 1.25 a	79.67 ± 0.69 bA*
50 ng/ml	86.67 ± 1.43 a	57.33 ± 2.08 bB*

* Differs significantly from control follicles ($P < 0.05$);

a,b – at the same row indicates differences in the same treatment at different days of IVC;

A,B – at the same column indicates differences at the same day of IVC among treatments.

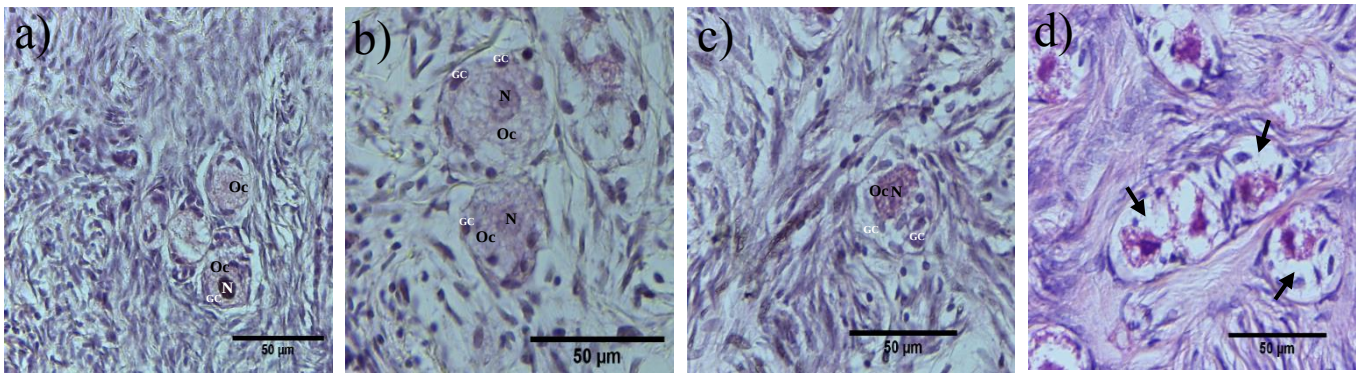


FIGURE 1. Histological sections of collared peccaries preantral follicles. Images shows morphological normal follicles on fresh control (a), after 1 (b) and 6 (c) day sexhibited oocyte cytoplasm (Oc), oocyte nucleus (N) and intact and organized granulosa cells (GC). Degenerated follicle after 6 days of culture (d) showed cytoplasmic retraction (arrow) or disorganization of granulosa cells. Haematoxylin–eosin stain. Scale bar: 50 µm.

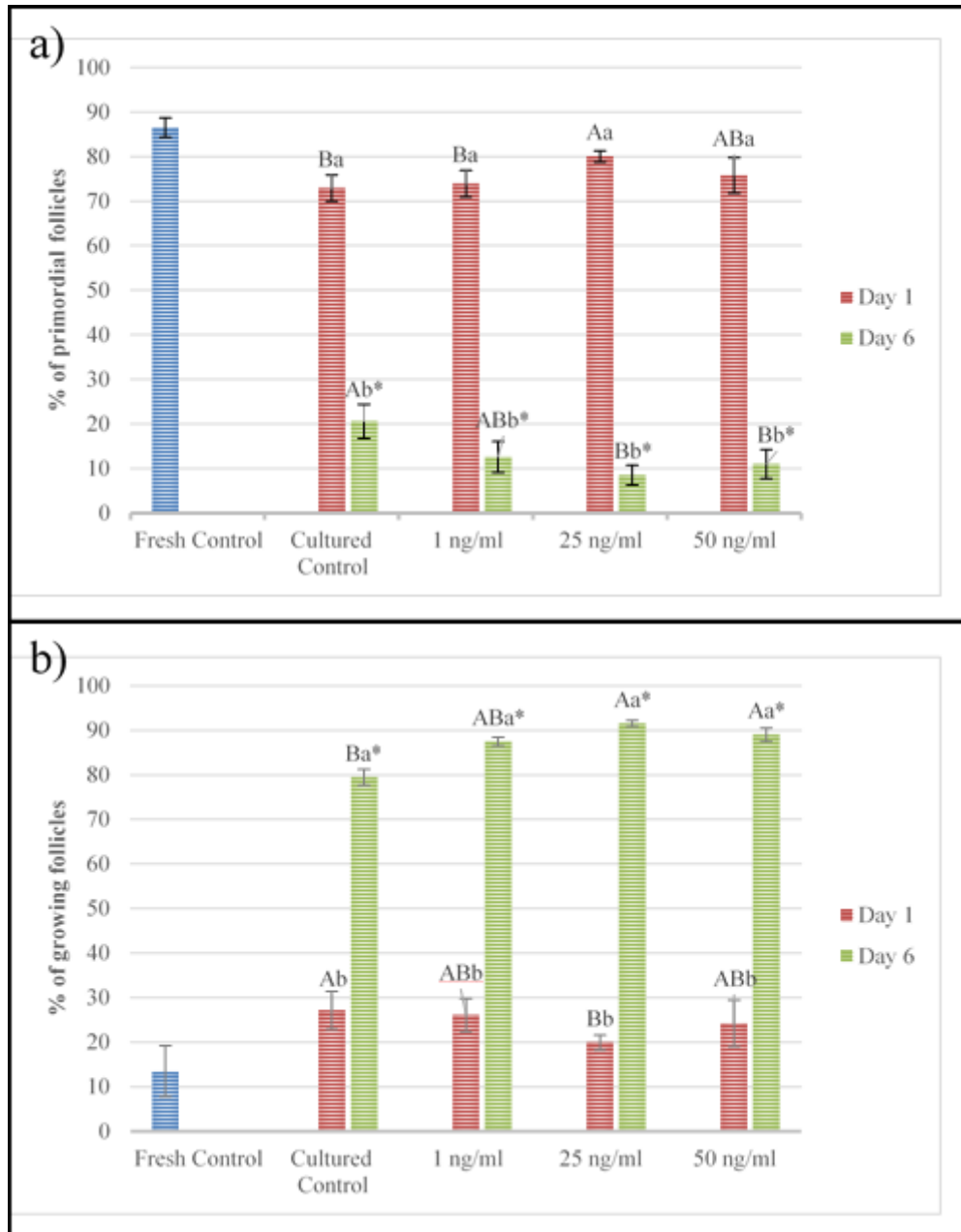


FIGURE 2. Percentages of primordial (a) and growing (b) follicles in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15. * differs significantly from control follicles ($p < 0.05$). a,b— indicates differences in the same treatment at different days of IVC. A–C— indicates differences in the same day of in vitro culture (IVC) among treatments.

TABLE 2. The mean (Mean $\pm$ SE) diameters (μm) of oocytes in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15.

Treatments	Day 1	Day 6
Fresh Control	23.95 $\pm$ 0.08	
Cultured Control	23.43 $\pm$ 1.77 a	25.45 $\pm$ 0.53 a*
1 ng/ml	24.75 $\pm$ 2.44 a	26.39 $\pm$ 0.32 a*
25 ng/ml	23.41 $\pm$ 0.12 b	25.71 $\pm$ 0.72 a*
50 ng/ml	24.34 $\pm$ 1.74 b	26.66 $\pm$ 1.29 a*

* differs significantly from control follicles (P<0.05);

a,b – at the same row indicates differences in the same treatment at different days of IVC;

TABLE 3. The mean (Mean $\pm$ SE) diameters (μm) of follicles in uncultured tissue (fresh control) and in tissues cultured for 6 days in TCM199⁺ alone or supplemented with various concentrations of BMP15.

Treatments	Day 1	Day 6
Fresh Control	32.14 $\pm$ 0.78	
Cultured Control	33.36 $\pm$ 0.18 Bb	39.28 $\pm$ 0.17 Aa*
1 ng/ml	36.48 $\pm$ 1.24 Ab*	38.43 $\pm$ 2.13 Aa*
25 ng/ml	33.43 $\pm$ 2.80 Bb	39.18 $\pm$ 2.38 Aa*
50 ng/ml	33.16 $\pm$ 1.18 Bb	38.62 $\pm$ 0.67 Aa*

* differs significantly from control follicles (P<0.05);

a,b – at the same row indicates differences in the same treatment at different days of IVC;

A,B – at the same column indicates differences at the same day of IVC among treatments.

TABLE 4. Mean values of the cell proliferation capacity quantified by number of AgNORs present in the granulosa cells of preantral follicles derived from collared peccaries considering the fresh control (uncultured) and the *in vitro* culture for 1 or 6 days in TCM199⁺ medium containing different concentrations of BMP15.

Treatments	Day 1	Day 6
Fresh Control	2.36 ± 0.04	
Cultured Control	2.33 ± 0.04 Bb	2.70 ± 0.07 Aa*
1 ng/ml	2.66 ± 0.03 Aa*	2.72 ± 0.09 Aa*
25 ng/ml	2.77 ± 0.07 Aa*	2.69 ± 0.10 Aa*
50 ng/ml	2.68 ± 0.07 Aa*	2.66 ± 0.13 Aa*

* differs significantly from control follicles (P<0.05);

a,b – at the same row indicates differences in the same treatment at different days of IVC;

A,B – at the same column indicates differences at the same day of IVC among treatments.

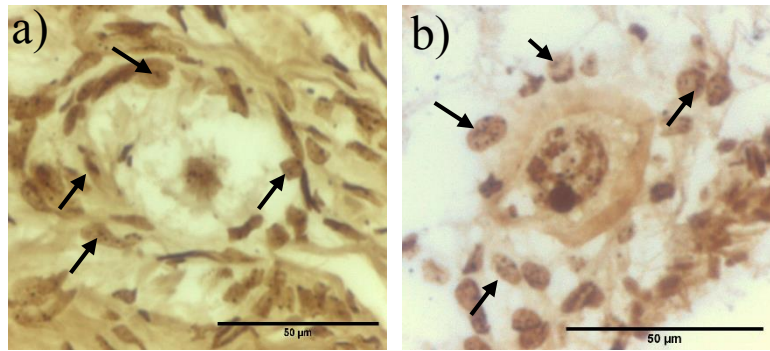


FIGURE 3. Photomicrograph of Ag-NOR of collared peccaries ovarian preantral follicles. (a,b)— NORs are the black spots present on the granulosa cells, arrows pointing. (a) and after 6 (b) days of in vitro culture (IVC), respectively. Scale bar: 50 μm .

7. CONCLUSÕES

- A BMP15 na concentração de 25 ng/ml possibilitou a manutenção de um elevado percentual de folículos pré-antrais morfológicamente normais após 6 dias de cultivo;
- As maiores concentrações testadas da BMP15 (25 ng/ml e 50 ng/ml), estimularam a ativação dos folículos primordiais no cultivo *in situ*;
- Os folículos pré-antrais de catetos foram capazes de crescer durante o cultivo *in vitro*, porém nas presentes condições experimentais, a BMP15 não influenciou o crescimento folicular e oocitário após 6 dias;
- Após um dia de cultivo, a BMP15 promoveu um aumento no potencial proliferativo em todas as concentrações utilizadas.

8. PERSPECTIVAS

Ao nosso conhecimento, até o presente momento, este é o primeiro trabalho a relatar o efeito da BMP15 na foliculogênese pré-antral de catetos. A presente dissertação gerou informações relevantes no que diz respeito às melhores concentrações de BMP15 utilizadas no cultivo para promover o crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais de catetos. Entretanto, a compreensão dos fenômenos fisiológicos associados ao desenvolvimento folicular é fundamental para aperfeiçoar os sistemas de cultivo de folículos pré-antrais e, conseqüentemente, ter impactos positivos para as biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Dessa forma, a utilização de técnicas mais sofisticadas para a análise da expressão dos receptores de BMP15 nos diferentes estágios de desenvolvimento poderá contribuir para a definição do melhor momento e da adição de BMP15 ao meio de cultivo, possibilitando a obtenção de melhores resultados. Paralelamente, estudos complementares poderão ser realizados a fim de avaliar o efeito sinérgico da BMP15 com outras substâncias como hormônios e/ou fatores de crescimento em meio de cultivo dinâmico, com a finalidade de gerar um grande número de oócitos competentes para utilização em outras biotécnicas. O estabelecimento de um sistema de cultivo *in vitro* adequado para o crescimento de FOPAs de catetos possibilitará, no futuro, o aumento do potencial prolífico e produtivo destes animais e poderá ser de grande utilidade para a manutenção da estabilidade populacional desta espécie e de outras já ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS

- Abir, R.; Nitke, S.; Ben-Haroush, A.; Fisch, B. *In vitro* maturation of primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 21, n. 8, p. 887-898, 2006.
- Adhikari, D.; Flohr, G.; Gorre, N.; Shen, Y.; Yang, H.; Lundin, E.; Lan, Z.; Gambello, M.J.; Liu, K. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 12, p. 765–770, 2009.
- Adhikari, D.; Liu, K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 5, p. 438 – 464, 2009.
- Adhikari, D.; Zheng, W.; Shen, Y.; Gorre, N.; Hamalainen, T.; Cooney, A. J.; Huhtaniemi, I.; Lan, Z. H.; Liu, K. T. sc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 3, p. 397– 410, 2010.
- Alves, B. G. **Isolamento, quantificação e classificação dos folículos pré-antrais de suínos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Altrichter, M.; Taber, A.; Noss, A.; Maffei, L.; Campos, J. *Catagonus wagneri*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T4015A72587993.
- Andrabi, S. M.; Maxwell, W. M. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 4, p. 223-243, 2007.
- Barnett, K. R.; Schilling, C.; Greenfeld, C. R.; Tomic, D.; Flaws, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5 p. 537-555, 2006.
- Beck, H. A review of peccary-palm interactions and their ecological ramifications across the Neotropics. **Journal of Mammalogy**, v. 87, n. 3, p. 519-530, 2006.
- Bertoldo, M. J.; Walters, K. A.; Ledger, W. L.; Gilchrist, R. B.; Mermillod, P.; Locatelli, Y. *In-vitro* regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 36, n. 5, p. 491-499, 2018.
- Blanco Calvo, M; Bolós Fernández, V.; Medina Villaamil, V.; Aparicio Gallego, G.; Díaz Prado, S.; Grande Pulido, E. Biology of BMP signalling and cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 11, n. 3, p. 126-137, 2009.
- Bristol-Gould, S., Woodruff, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 5-13, 2006.
- Bukovsky, A.; Svetlikova, M.; Caudle, M. R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 17, 2005.

Campos, L. B.; Praxedes, E. C. G.; Santos, C. S.; Moreira, S. S. J.; Silva, A. M.; Silva, A. R. Isolamento enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de catetos (*Pecari tajacu*). In: **Congresso Renorbio 2017, 2017, Natal. Anais do Encontro de Biotecnologia do Nordeste**, v. 1. p. 83, 2017.

Cadoret, V.; Frapsauce, C.; Jarrier, P.; Maillard, V.; Bonnet, A.; Locatelli, Y.; Royère, D.; Monniaux, D.; Guérif, F.; Monget, P. Molecular evidence that follicle development is accelerated *in vitro* compared to *in vivo*. **Reproduction**, v. 153, n. 5, p. 493–508, 2017.

Castro, F. C.; Cruz, M. H. C.; Leal, C. L. V. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 8, p. 1065-1074, 2016.

Celestino, J. J. H.; Lima-Verde, I. B.; Bruno, J. B.; Matos, M. H.; Chaves, R. N.; Saraiva, M. V. A.; Silva, C. M.; Faustino, L. R.; Rossetto, R.; Lopes, C. A.; Donato, M. A.; Peixoto, C. A.; Campello, C. C.; Silva, J. R.; Figueiredo, J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 338, n. 1-2, p. 1–9, 2011.

Chang, H.; Brown, C. W.; Matzuk, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 6, p. 787-823, 2002.

Choudhary, K. K.; Kavya, K. M.; Jerome, A.; Sharma, R. K. Advances in reproductive biotechnologies. **Veterinary World**, v. 9, n. 4, p. 388–395, 2016.

Crawford, J. L.; McNatty, K. P. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 339–343, 2012.

Cushman, R. A.; Wahl, C. M.; Fortune, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Hum. Reprod*, v.17, n. 1, p. 48-54, 2002.

Di Pasquale, E.; Beck-Peccoz P.; Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. **The American Journal of Human Genetics**, v.75, n. 1, p.106-111, 2004.

Driancourt, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

Elvin, J. A.; Matzuk, M. M. Mouse models of ovarian failure. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 183–195, 1998.

Erickson, G. F. An analysis of follicles development and ovum maturation. In: **Seminars in Reproductive Endocrinology**, san Diego-California, p.233-254, 1986.

- Fenwick, M. A.; Mora, J. M.; Mansour, Y. T.; Baithun, C.; Franks, S.; Hardy, K. Investigations of TGF- Signaling in Preantral Follicles of Female Mice Reveal Differential Roles for Bone Morphogenetic Protein 15. **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 3423–3436, 2013.
- Figueiredo, J. R.; Celestino, J. J. H.; Faustino, L. R.; Rodrigues, A. P. R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 192-195, 2011.
- Figueiredo, J. R.; Celestino, J. J. H.; Rodrigues, A. P. R.; Silva, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.
- Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. R.; Christiani, A. A. 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**. 2ª ed. São Paulo, SP: Roca, 2008. p. 303-327.
- Fonseca, A. B. et al. **Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p.459, 1994.
- Fontana, C. S.; Bencke, G. A.; Reis, R. E. **Livro vermelho de fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.632, 2003.
- Fortune, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 135–163, 2003.
- Fraser, H. M.; Duncan, W. C. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 2, p. 377–392, 2009.
- Ginther, O. J.; Beg, M. A.; Donadeu, F. X.; Bergfelt, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.
- Gougeon, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales d'Endocrinologie**, v. 71, n. 3, p. 132–143, 2010.
- Granjeiro, M. J.; Oliveira, R. C.; Bustos-Valenzuela, J. C.; Sogayar, M. C.; Taga, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 10, p. 1463-73, 2005.
- Green, L. J; Shikanov, A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016.
- Gongora, J.; Reyna-Hurtado, R.; Beck, H.; Taber, A.; Altrichter, M.; Keuroghlian, A. *Pecari tajacu*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2011**: e.T41777A10562361.
- Grubb, P. 1993. Order Artiodactyla. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (eds), **Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA. p. 377-414.

Guimarães, D. A. A.; Garcia, S. C. G.; Ferreira, M. A.; Silva, S. S.; Albuquerque, N. I.; Le Pendu Y. Ovarian folliculogenesis in collared peccary, *Pecari tajacu* (Artiodactyla: Tayassuidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 60, n. 1, p. 437-445, 2012.

Guimarães, D. A. A.; Garcia, S. C. G.; Pendu, Y. L.; Albuquerque, N. I. Determinação do ciclo estral em catetos *Pecari tajacu*: aspectos colpocitológicos e clínicos. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 4, p. 583 – 588, 2011.

Halpin, D. M.; Charlton, H. M.; Faddy, M. J. Effects of gonadotrophin deficiency on follicular development in hypogonadal (hpg) mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 1, p. 119-125, 1986.

Hasegawa, T.; Kamada, Y.; Hosoya, T.; Fujita, S.; Nishiyama, Y.; Iwata, N.; Hiramatsu, Y.; Otsuka, F. A regulatory role of androgen in ovarian steroidogenesis by rat granulosa cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 172, p. 160-165, 2017.

Hergovich, A. Mammalian Hippo signalling: A kinase network regulated by protein-protein interactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 1, p. 124–128, 2012.

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

Holbourn, K. P.; Acharya, K. R.; Perbal, B. The CCN family of proteins: Structure function relationships. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 10, p. 461–473, 2008.

Hsu, S. Y.; Hsueh, A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 593-614, 2005.

Hsueh, A. J.; Kawamura, K.; Cheng, Y.; Fauser, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 1, p. 1-24, 2015.

IUCN 2017. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: **21 de Junho de 2018**.

Jagarlamudi, K.; Liu, L.; Adhikari, D.; Reddy, P.; Idahl, A.; Ottander, U.; Lundin, E.; Liu, K. Deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 6186, 2009.

Johnson, J.; Canning, J.; Kaneko, T.; Pru, J. K.; Tilly, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, p. 145-150, 2004.

Johnson, J.; Bagley, J.; Skaznik-Wikiel, M.; Lee, H. J.; Adams, G. B.; Niikura, Y.; Tschudy, K. S.; Tilly, J. C.; Cortes, M. L.; Forkert, R.; Spitzer, T.; Iacomini, J.; Scadden, D. T.; Tilly, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 303-315, 2005.

Juengel, J. L.; Bodensteiner, K. J.; Heath, D. A.; Hudson, N. L.; Moeller, C. L.; Smith, P.; Galloway, S. M.; Davis, G. H.; Sawyer, H. R.; McNatty, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Science**, v.82/83, p.447-460, 2004.

Juengel, J. L.; McNatty, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 143–160, 2005.

Junqueira, L. C. U.; Carneiro, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Katska-Ksiazkiewicz, L. Recent achievements in culture and preservation of ovarian follicles in mammals. **Reproductive Biology**, v. 6, n. 1, p. 3-16, 2006.

Kawamura, K.; Cheng, Y.; Suzuki, N.; Deguchi, M.; Sato, Y.; Takae, S.; Ho, C. H.; Kawamura, N.; Tamura, M.; Hashimoto, S.; Sugishita, Y.; Morimoto, Y.; Hosoi, Y.; Yoshioka, N.; Ishizuka, B.; Hsueh, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 110, n. 43, p. 17474-17479, 2013.

Keuroghlian, A.; Desbiez, A.; Reyna-Hurtado, R.; Altrichter, M.; Beck, H.; Taber, A.; Fragoso, J. M. V. 2013. *Tayassu pecari*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2013**: e.T41778A44051115.

Kim, J. Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 39, n. 1, p. 10-14, 2012.

Kim, M. K.; Fibrianto, Y. H.; Oh, H. J.; Jang, G.; Kim, H. J.; Lee, K. S.; Kang, S. K.; Lee, B. C.; Hwang, W. S. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1342-1353, 2005.

Knight, P. G.; Glister, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 165- 183, 2003.

Knight, P. G.; Glister, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, n. 2, p.191-206, 2006.

Li, H.; Kuo, T.; Yang, H.; Chen, L.; Li, S. S.; Huang, H. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3-4, p. 312–322, 2008.

Lima, G. L.; Luz, V. B.; Alves, A. M. C. V.; Lunardi, F. O.; Souza, A. L. P.; Peixoto, G. C. X.; Rodrigues, A. P. R.; Oliveira, M. F.; Silva, A. R. Vitrication of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) ovarian tissue using various cryoprotectants ? **Preliminary results. In: IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2012, Campinas. Animal Reproduction**, v. 9, p. 957, 2012b.

Lima, G. L.; Luz, V. B.; Lima, L. F.; Rocha, R. M. P.; Castro, S. V.; Castelo, T. S.; Rodrigues, A. P. R.; Figueiredo, J. R.; Silva, A. R. Interactions between different media and follicle-stimulating hormone supplementation on *in vitro* culture of preantral follicles enclosed in ovarian tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linneaus, 1758). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 4, p. 880–888, 2018.

Lima, G. L.; Santos, E. A.; Lima, L. F.; Luz, V. B.; Rodrigues, A. P.; Silva, A. R. Short-term preservation of *Pecari tajacu* ovarian preantral follicles using phosphate buffered saline (PBS) or powdered coconut water (ACP®) media. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.66, n.6, p.1623-1630, 2014.

Lima, G. L.; Santos, E. A.; Luz, V. B.; Rodrigues, A. P.; Silva, A. R. Morphological Characterization of the Ovarian Preantral Follicle Population of Collared Peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Anatomia Histologia e Embryologia**, v. 42, n. 4, p. 304–311, 2013.

Lima, I. M.; Brito, I. R.; Rossetto, R.; Duarte, A. B.; Rodrigues, G. Q.; Saraiva, M. V.; Costa, J. J.; Donato, M. A.; Peixoto, C. A.; Silva, J. R.; Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. Lima, I.M.T. et al. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the *in vitro* effects of BMP-15 on preantral follicle development. **Cell and Tissue Research**, v. 348, n. 1, p. 225–238, 2012a.

Lima, I. M. T.; Celestino, J. J. H.; Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. R. Papel da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p. 3-20, 2010.

Lin, Z.; Li, Y.; Xu, Y.; Wang, Q.; Namgoong, S.; Cui, X.; Kim, N. Effects of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 on the *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 2, p. 219–227, 2014.

Lucci, C. M.; Amorim, C. A.; Bão, S. N.; Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P.; Silva, J. R.; Gonçalves, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 1, p. 39-49, 1999.

Magalhães, D. M.; Andrade, P. M.; Sales, E. T.; Araujo, V. R.; Lima, I. M.; Castro, S. V.; Faustino, L. R.; Lopes, C. A.; Campello, C. C.; Bão, S. N.; Gastal, M. O.; Gastal, E. L.; Figueiredo, J. R. Effect of sequential medium on *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue. **Animal Reproduction Science (Print)**, v.132, n. 3-4, p.159 - 168, 2012.

Maia, K. M.; Peixoto, G. C. X.; Campos, L. B.; Bezerra, J. A. B.; Ricarte, A. R. F.; Moreira, N.; Oliveira, M. F.; Silva, A. R. Estrus cycle monitoring of captive collared peccaries (*Pecari tajacu*) in semiarid conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 1115-1120, 2014a.

Maia, K.M.; Peixoto, G. C. X.; Campos, L. B.; Silva, A. M.; Castelo, T. S.; Ricarte, A. R.; Silva, A. R. Estrous synchronization in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*) Using a Prostaglandin F2 α Analog. **Zoological Science**, v. 31, n. 12, p. 836-839, 2014b.

Makker, A.; Goel, M. M.; Mahdi, A. A. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.53, n. 3, p.103-118, 2014.

Mao, J.; Wu, G.; Smith, M. F.; McCauley, T. C.; Cantley, T. C.; Prather, R. S.; Didion, B. A.; Day, B. N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-

stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1197-1203, 2002.

Martins, F. S.; Silva, J. R. V.; Rodrigues, A. P. R.; Figueiredo, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.

Matsuda, F.; Inoue, N.; Manabe, N.; Ohkura, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 44-50, 2012.

Mayor, P.; Bodmer, R.; Lopez-Bejar, M. Reproductive performance of the wild Collared Peccary (*Tayassu tajacu*) female in the Peruvian Amazon. **European Journal of Wildlife Research**, v. 56, n. 4, p. 681-684, 2010.

Mayor, P.; Fenech, M.; López-Béjar, M. Ovarian features of the wild collared peccary (*Tayassu tajacu*) from Peruvian Northeastern Amazon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 268-275, 2006.

Mayor, P.; Galvez, H.; Guimarães, D.A.; Lopez-Gatius, F.; Lopez-Bejar, M. Serum estradiol-17 beta, vaginal cytology and vulval appearance as predictors of estrus cyclicity in the female collared peccary (*Tayassu tajacu*) from the eastern Amazon region. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 1-2, p.165–174, 2007.

McGee, E. A.; Hsueh, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Review**, v. 21, n. 2, p. 200-214, 2000.

McNatty, K. P.; Heath, D. A.; Lundy, T.; Fidler, A. E.; Quirke, L.; O'Connell, A.; Smith, P.; Groome, N.; Tisdall, D. J. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 3-16, 1999.

McNatty, K. P.; Juengel, J. L.; Reader, K. L.; Lun, S.; Myllymaa, S.; Lawrence, S.B.; Western, A.; Meerasahib, M. F.; Mottershead, D. G.; Groome, N.; Ritvos, O.; Laitinen, M. P. E. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v.129, n. 4, p.481-487, 2005.

Moore, R. K.; Otsuka, F.; Shimasaki, S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 304-310, 2003.

Moore, R. K.; Shimasaki, S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, n. 1-22, p.67-73, 2005.

Nogueira, S. S. C; Nogueira-Filho, S. L. G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 7, p. 1385–1397, 2011.

O'Brien, M. J.; Pendola, J. K.; Eppig, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682-1686, 2003.

Oktaý, K.; Briggs, D.; Gosden, R. G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 11, p. 3748–3751, 1997.

Otsuka, F.; Moore, R. K.; Iemura, S.; Ueno, N.; Shimasaki, S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 5, p. 961-966, 2001.

Otsuka, F.; Yao, Z.; Lee, T. H.; Yamamoto, S.; Erickson, G. F.; Shimasaki, S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

Pangas, S. A. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 10, p. 666-679, 2012.

Passos, M. J.; Vasconcelos, G. L.; Silva, A. W.; Brito, I. R.; Saraiva, M. V.; Magalhães, D. M.; Costa, J. J.; Donato, M. A.; Ribeiro, R. P.; Cunha, E. V.; Peixoto, C. A.; Campello, C. C.; Figueiredo, J. R.; Van Den Hurk, R.; Silva, J. R. Accelerated growth of bovine preantral follicles *in vitro* after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1269–1277, 2013.

Persani, L.; Rossetti, R.; Di Pasquale, E.; Cacciatore, C.; Fabre, S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 6, p. 869–883, 2014.

Picton, H.; Briggs, D.; Gosden, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, 1998.

Qin, Y.; Jiao, X.; Simpson, J. L.; Chen, Z. J. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 6, p. 787–808, 2015.

Rajkovic, A.; Pangas, S. A.; Ballow, D.; Suzumori, N.; Matzuk, M. M. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. **Science**, v. 305, n. 5687, p. 1157-1159, 2004.

Reddy, P.; Zheng, W.; Liu, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 96-103, 2010.

Rimon-Dahari, N.; Yerushalmi-Heinemann, L.; Alyagor, L.; Dekel, N. Ovarian Folliculogenesis. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 58, p. 167-190, 2016.

Rivero, E. R. C.; Aguiar, M. C. F. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 39- 44, 2002.

Rossetto, R.; Lima, I. M. T.; Saraiva, M. V. A.; Lima-Verde, I. B.; Sales, E. T.; Figueiredo, J. R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 15-23, 2011.

Rossi, R. O.; Costa, J. J.; Silva, A. W.; Saraiva, M. V.; Van den Hurk, R.; Silva, J. R. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. **Zygote**, v. 24, n. 1, p. 1–17, 2016.

Salehnia, M.; Pajokh, M.; Ghorbanmehr, N. Short Term Organ Culture of Mouse Ovary in the Medium Supplemented with Bone Morphogenetic Protein 15 and Follicle Stimulating Hormone: A Morphological, Hormonal and Molecular Study. **Journal Reproduction and Infertility**, v.17, n. 4, p. 199-207, 2016.

Salha, O.; Abusheika, N.; Sharma, V. Dynamics of human follicular growth and *in vitro* oocyte maturation. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 6, p. 816-832, 1998.

Shaw, J. M.; Oranratnachai, A.; Trounson, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 59–72, 2000.

Shimasaki, S.; Eppig, J. J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v. 134, n. 14, p. 2593-2603, 2007.

Shimasaki, S.; Moore, R. K.; Otsuka, F.; Erickson, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 1, p. 72–101, 2004.

Shimasaki, S.; Zachow, R. J.; Li, D.; Kim, H.; Iemura, S. I.; Ueno, N.; Sampath, K.; Chang, R. J.; Erickson, G. F. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. **Cell Biology**, v. 96, n. 13, p. 7282–7287, 1999.

Silva, A. R.; Campos, L. B.; Silva, A. M.; Praxedes, E. C. G.; Moreira, S. S. J.; Bezerra, L. G. P.; Pereira, A. F. Evaluation of Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) on the *In Vitro* Culture of Ovarian Preantral Follicles Derived from Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). In: **50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2017, Washington DC. Online proceedings of the SSR 2017**, v. 1. p. 1-2, 2017.

Silva, A. R.; Castelo, T. S.; Lima, G. L.; Peixoto, G. C. X. Conservation of germplasm from wild animals of the Caatinga biome. **Acta Science Veterinary**, v. 38, n. 2, p. 373-389, 2010a.

Silva, C. M. G.; Faustino, L. R.; Saraiva, M. V. A.; Rossetto, R.; Figueiredo, J. R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 233-242, 2010b.

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

Silva, J. R. V.; Van den Hurk, R.; Figueiredo, J. R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123–135, 2016.

Souza, G. B.; Costa, J.; Cunha, E. V.; Passos, J.; Ribeiro, R. P.; Saraiva, M. V. A.; Van Der Hurk, R.; Silva, J. Bovine ovarian stem cells differentiate into germ cells and oocyte-like structures after culture *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2, p. 243-250, 2017.

Sowls, L. K. 1984. **The Peccaries**. The University of Arizona Press, Tuscon, Arizona, USA.

Staldemann, C.; Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. **Cell and Tissue Research**, v. 301, n. 1, p.19-31, 2000.

Su, Y.; Wigglesworth, K.; Pendola, F. L.; O'Brien, M. J.; Eppig, J. J. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2221-2232, 2002.

Telfer, E. E.; Binnie, J. P.; McCaffery, F. H.; Campbell, B. K. *In vitro* development of oocyte from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 117-123, 2000.

Van den Hurk, R.; Zhao, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

Von Bubnoff, A.; Cho, K. W. Y. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? **Developmental Biology**, v. 239, n. 1, p. 1-14, 2001.

Wang, C.; Zhou, B.; Xia, G. Mechanisms controlling germline cyst breakdown and primordial follicle formation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 14, p.2547-2566, 2017.

Woods, D. C.; Tilly, J. L. Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. **Nature Protocols**, v. 8, n. 5, p. 966-988, 2013.

Woods, D. C.; White, Y. A.; Niikura, Y.; Kiatpongsan, S.; Lee, H. J.; Tilly, J. L. Embryonic stem cell-derived granulosa cells participate in ovarian follicle formation *in vitro* and *in vivo*. **Reproduction Science**, v. 20, n. 5, p. 524-535, 2013.

Yan, C.; Wang, P.; DeMayo, J.; DeMayo, F. J.; Elvin, J. A.; Carino, C.; Prasad, S. V.; Skinner, S. S.; Dunbar, B. S.; Dube, J. L.; Celeste, A. J.; Matzuk, M. M. Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854-866, 2001.

Zhai, B.; Liu, H.; Li, X.; Dai, L.; Gao, Y.; Li, C.; Zhang, L.; Ding, Y.; Yu, X.; Zhang, J. BMP15 Prevents Cumulus Cell Apoptosis Through CCL2 and FBN1 in Porcine Ovaries. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 264-278, 2013.

Zou, K.; Yuan, Z.; Yang, Z.; Luo, H.; Sun, K.; Zhou, L.; Xiang, J.; Shi, L.; Yu, Q.; Zhang, Y.; Hou, R.; Wu, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 631-636, 2009.

Zuckerman, S. The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 6, p. 63-109, 1951.