



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

IVINA ROCHA BRITO

**INFLUÊNCIA DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO
DE PLAQUETAS (PDGF) SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS
ISOLADOS**

**FORTALEZA - CEARÁ
2010**

IVINA ROCHA BRITO

INFLUÊNCIA DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE
PLAQUETAS (PDGF) SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

FORTALEZA - CEARÁ
2010

B862i

Brito, Ivina Rocha

Influência do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados / Ivina Rocha Brito . – Fortaleza, 2010.

129 p.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Folículos ovarianos. 3. PCR. 4. PDGFR. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.0824

IVINA ROCHA BRITO

INFLUÊNCIA DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE
PLAQUETAS (PDGF) SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 08/12/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Claudio Cabral Campelo
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Aos meus pais, Stivelberg e Marta, cuja fé em mim me ensinou a ter fé em mim mesma e em Deus.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionaram e à CAPES pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo e ao CNPq, Renorbio, FINEP e FUNCAP pelo auxílio financeiro dessa pesquisa.

À Deus, por tudo aquilo que vivi até este momento, incluindo meus fracassos e sucessos. Agradeço, ainda, pela proteção que me concede todos os dias da minha vida e pela força para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Stivelberg Carvalho de Brito e Marta Ferreira Lima Rocha Brito, pelo amor incondicional que me transformou no que sou hoje. Vocês são responsáveis por todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Lívia, Stivel, Leonardo e Heitor, pela união em todos os momentos e pela certeza de que sempre podemos contar uns com os outros, independente da distância que nos separa.

Aos meus queridos avós, Francisco de Assis Rocha e Maria Zilmar Ferreira Lima Rocha, que são a base de uma família amorosa e atenciosa. Vocês são meu orgulho e meu espelho.

Ao meu amado noivo, Felipe Ferreira Lima Brasil, cujo apoio e incentivo foi fundamental para a superação de vários obstáculos. Sou imensamente grata pela paciência, atenção e, especialmente pelo amor imensurável que o fez compartilhar seus objetivos de vida comigo.

A todos os familiares, tios, tias, primos e primas que torceram por mim na busca da realização deste sonho.

À amiga Márcia Viviane Alves Saraiva, que me acolheu em sua casa e em seu coração, me incentivou desde o início e sempre esteve ao meu lado. Mesmo que a palavra "obrigada" signifique tanto, não expressará por inteiro a importância da sua amizade para mim.

Às amigas Hiédely Luz, Isadora Lima e Livia Schell, por simplesmente existirem, mas, principalmente, por terem cruzado meu caminho e se tornarem minhas amigas. A amizade e o companheirismo de vocês foi essencial para tornar mais leve e divertido esses quase dois anos.

À todos os membros do LAMOFOPA, que me permitiram compartilhar diferentes idéias e experiências de vida. De forma direta ou indireta, todos contribuíram para que eu obtivesse sucesso nessa caminhada, seja colaborando na execução dos experimentos ou na organização do laboratório.

Ao meu orientador Dr. José Ricardo de Figueiredo, pela oportunidade e confiança na execução deste projeto.

Ao meu co-orientador Dr. José Roberto Viana Silva, que abriu todas as portas para mim, desde a iniciação científica, contribuindo imensamente para a minha formação profissional, e à toda sua equipe.

Ao Professor Dr. Claudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados, por todas as suas valiosas idéias, paciência e atenção disponibilizada.

À banca examinadora, por ter aceitado prontamente o convite e, sobretudo pela sua prestimosa colaboração ao corrigir o presente trabalho.

À todos, muito obrigada!

"Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço"

Dave Weinbaum

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram investigar os níveis de RNAm para os receptores de PDGF (PDGFR- α e - β) em folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como avaliar a influência do PDGF sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Para tanto, folículos primordiais, primários e secundários, bem como pequenos (1-3 mm) e grandes (3-6 mm) folículos antrais foram obtidos e os níveis de RNAm para PDGFR- α e - β foram quantificados por PCR em tempo real. Além disso, folículos secundários ($\geq 200 \mu\text{m}$) foram isolados do cortex ovariano de cabras e cultivados por 18 dias em meio α -MEM suplementado com 50 ou 100 ng/ml de PDGF, na presença ou ausência de FSH. Os resultados da PCR em tempo real mostraram níveis de RNAm para PDGFR- α significativamente superiores em folículos secundários quando comparados aos folículos primordiais e primários, enquanto os níveis de RNAm para PDGFR- β apresentavam-se mais elevados em folículos primários e secundários em comparação aos folículos primordiais. Ambos os receptores mostraram níveis de RNAm superiores em células da granulosa/teca de pequenos e grandes folículos antrais, quando comparadas aos seus respectivos complexos cumulus-oócito (CCOs). Com relação ao cultivo *in vitro*, verificou-se um percentual de formação de antro significativamente superior no tratamento PDGF 100 ng/ml quando comparado a esta mesma concentração associada ao FSH. Após 18 dias de cultivo, o PDGF em ambas as concentrações, associado ao FSH, promoveu um crescimento folicular significativamente superior ao controle. Além disso, a adição de FSH ao tratamento PDGF 50 ng/ml influenciou positivamente o crescimento folicular quando comparado a esta mesma concentração na ausência de FSH. Dessa forma, o presente estudo forneceu evidências da importância do PDGF para a foliculogênese inicial em cabras, uma vez que a presença de RNAm para PDGFR- α e - β foi identificada em todas as categorias foliculares e, ainda, PDGF associado ao FSH estimula o crescimento de folículos secundários caprinos isolados e cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Folículos ovarianos. PCR. PDGFR.

LISTA DE TABELAS

Table 1	Primer pairs used for real-time PCR analysis. s: sense; as: antisense.....	103
Table 2	Percentage of antrum formation during <i>in vitro</i> culture of caprine preantral follicles in different PDGF concentrations (50 ng/ml or 100 ng/ml) in the absence or presence of FSH. *: differs significantly from the control (P<0.05). a,b,c: indicates significant differences among days of culture into the same treatment (P<0.05). ♦:differs significantly from FSH alone (P<0.05). α, β: indicates significant differences between the same PDGF concentrations in the absence or presence of FSH (P<0.05). There was no significant difference among the concentrations of PDGF in the absence or presence of FSH (P>0.05).....	104
Table 3	Diameter of caprine preantral follicles after <i>in vitro</i> culture for 18 days in different PDGF concentrations (50 ng/ml or 100 ng/ml) in the absence or presence of FSH. *: differs significantly from the control (P<0.05). a,b,c: indicates significant differences among days of culture into the same treatment (P<0.05). ♦: differs significantly from FSH alone (P<0.05). α, β: indicates significant differences between the same PDGF concentrations in the absence or presence of FSH (P<0.05). There was no significant difference among the concentrations of PDGF in the absence or presence of FSH (P>0.05).....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Caracterização estrutural das cadeias de PDGF. As cadeias A e B são caracterizadas pela presença de um “motivo estrutural de retenção”, enquanto as cadeias C e D apresentam o domínio CUB	33
Figura 2	Estrutura dos genes que codificam as quatro cadeias de PDGF. Duas isoformas de PDGF-A podem ser originadas devido a um splicing alternativo, onde são utilizados dois códon de terminação localizados em éxons diferentes. Os códon de iniciação (ATG) e terminação (Stop) são representados na figura. Os íntrons e éxons não são apresentados em escala, sendo os íntrons com comprimento superior a 5 kb representados por (//). Figura adaptada de Li & Eriksson [63]	34
Figura 3	Interações PDGF-PDGFR e organização estrutural dos receptores para os PDGFs. Diferentes isoformas de PDGF ligam-se e dimerizam as subunidades α e β dos receptores. Cada receptor é constituído de uma região extracelular, a qual apresenta 5 domínios semelhantes à imunoglobulinas, uma região transmembranária e outra intracelular, composta pelos domínios justamembranário e tirosina-quinase	38
Figure 1	Distribution of treatments formed from the use of PDGF in the absence or presence of FSH	98
Figure 2	Steady-state levels of PDGFR- α mRNA in goat ovarian follicles. (A) Primordial, primary, and secondary follicles, (B) COCs from small and large antral follicles, (C) granulosa/theca cells from small and large antral follicles, (D) COCs and granulosa/theca cells from small antral follicles, and (E) COCs and granulosa/theca cells from large antral follicles. ^{a, b} (P<0.05)	98
Figure 3	Steady-state levels of PDGFR- β mRNA in goat ovarian follicles. (A) Primordial, primary, and secondary follicles, (B) COCs from small and large antral follicles, (C) granulosa/theca cells from small and large antral follicles, (D) COCs and granulosa/theca cells from small antral follicles, and (E) COCs and granulosa/theca cells from large antral follicles. ^{a, b} (P<0.05)	100
Figure 4	Percentage of surviving follicles after 18 days of <i>in vitro</i> culture with PDGF and/or FSH. There was no significant difference among treatments (P>0.05)	102
Figure 5	Analysis of goat follicle viability after 18 days of culture. (A) Morphologically normal follicle, visualized by stereomicroscope; (B) Viable follicles labeled in green with calcein-AM, observed by fluorescence microscopy	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Percentage
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
100X	Aumento de 100 vezes
as	Anti-sense
ATG	Adenina, timina, guanina (códon de iniciação)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaMKs	Calmodulin-dependent protein kinases (Proteínas quinases dependentes de calmodulina)
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (Adenosina monofosfato cíclica)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	Complementary DNA (DNA complementar)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Cumulus-oocyte complex (Complexo cumulus-oócito)
Crk	Proteína adaptadora
CT	Cycle Threshold
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
dNTP	Deoxy-nucleotide-triphosphate (Desoxinucleotídeo trifosfato)
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de crescimento epidermal)
FAMED	Faculdade de Medicina
FAVET	Faculdade de Veterinária
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>

FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Fyn	Proteína envolvida na sinalização de PDGF
G	Gauge
g	Gravidade
GDP	Guanosine 5'-di-phosphate (Guanosina 5'-di-fosfato)
GI	Número de acesso ao Genbank
Grb2/Grb7	Growth factor receptor-bound protein (Proteína 2/7 ligada a receptor de fator de crescimento)
GT	Granulosa/theca cell (Célula da granulosa/teca)
GTP	Guanosine 5'-tri-phosphate (Guanosina 5'-tri-fosfato)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1)
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
Kb	Kilobase (quilo base)
kDa	Kilodalton (quilo Dalton)
KL	Kit Ligand
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Proteína quinase ativada por mitógenos)
MEM	Minimum Essential Medium (Meio Essencial Mínimo)
min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-

Antrais

Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
P	Probabilidade de erro
p110	Subunidade catalítica da PI3K
p85	Subunidade reguladora da PI3K
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)
PDGFR	PDGF receptor (Receptor de PDGF)
PDZ	Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA) e Zonula occludens-1 protein (zo-1) (Domínio estrutural)
PH	Pleckstrin homology (Domínio de homologia à proteína pleckstrin)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (Fosfatidilinositol 3-quinase)
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato)
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato)
PKC	Protein Kinase C (Proteínas quinase C)
PLC- γ	Phospholipase- C γ 1 (Fosfolipase C γ 1)
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
PTB	Phosphotyrosine-binding (Domínio de ligação da fosfotirosina)
Raf-1	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RAS	Rat Sarcoma Vírus

RENORBIO	Rede Nordeste de Biotecnologia
RNAm	Messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucléico mensageiro)
s	Sense
SAS	Statistical Analysis Software
SD	Standard deviation (Desvio Padrão)
sec	Second (segundo)
SH2/SH3	Src Homology 2/3 (domínio de homologia à Src 2/3)
Shc	Src homology collagen-like
SOS	Son of Sevenless
Src	Proteína tirosina quinase não receptora
Stat	Signal Transducers and Activators of Transcription (Proteínas Transdutoras de Sinais e Ativadoras da Transcrição)
TCM199	Tissue Culture Medium 199 (Meio de Cultivo Tecidual 199)
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha (Fator de crescimento transformante- α)
tPA	Tissue plasminogen activator (Ativador de plasminogênio de tecido)
Tyr	Tyrosine (tirosina)
U	Units (unidades)
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular)
Yes	Proteína tirosina quinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CAPÍTULO I	19
2.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	19
2.1.2 Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	19
2.1.3 Métodos de isolamento folicular	21
2.1.4 Fatores que afetam o cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais .	22
2.1.5 Técnicas para avaliação da eficiência do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	23
2.1.6 Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	24
2.2 CAPÍTULO II - Caracterização estrutural e papel do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na foliculogênese ovariana ..	26
3 JUSTIFICATIVA	68
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	70
5 OBJETIVOS	71
5.1 OBJETIVO GERAL	71
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
6 CAPÍTULO III - Steady-state levels of mRNA encoding PDGF receptors in goat ovaries and the influence of PDGF on <i>in vitro</i> development of preantral follicles.	72
7 CONCLUSÕES	106
8 PERSPECTIVAS	107
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXO A	128

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as biotecnologias reprodutivas vêm se desenvolvendo expressivamente e criando oportunidades extraordinárias para a reprodução animal, especialmente no que se refere ao aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos de elevado potencial econômico. No Nordeste brasileiro, o rebanho de caprinos representa 93% de todo o rebanho do país (IBGE, 2006), desempenhando um papel crucial para o desenvolvimento econômico e social da região, uma vez que a produção destes animais é uma alternativa importante na oferta de carne, leite e pele para as populações locais. No intuito de incrementar a eficiência reprodutiva nesta espécie, diversas biotécnicas vêm sendo amplamente utilizadas, porém, embora importantes resultados já tenham sido alcançados, a produção de embriões a partir de fêmeas caprinas ainda é relativamente baixa visto que somente uma porcentagem muito pequena (0,1%) de folículos ovarianos desenvolve-se até o estágio pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), sendo a grande maioria eliminada por atresia (MARKSTRÖM et al., 2002). Dessa forma, torna-se prioritário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão dos processos relacionados com a formação, crescimento e maturação dos oócitos inclusos em folículos ovarianos caprinos, na tentativa de resgatar os folículos dos ovários e maximizar o aproveitamento do potencial oocitário desses animais. A biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) surge então como uma importante ferramenta para esse estudo, dando suporte necessário para a elucidação dos mecanismos que envolvem a foliculogênese inicial.

Sabe-se que a foliculogênese é controlada pela interação entre diferentes fatores de crescimento e hormônios, e a identificação desses fatores, bem como a avaliação dos seus efeitos sobre o crescimento e maturação oocitária poderá contribuir para uma melhor compreensão da foliculogênese, otimizando a produção de embriões a partir de oócitos inclusos em folículos pré-antrais caprinos. Dentre os fatores de crescimento que participam da regulação do desenvolvimento folicular, destaca-se o Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).

Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir fará uma breve abordagem sobre os principais aspectos relacionados ao cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, enfatizando os avanços obtidos em diferentes espécies.

Ainda, será abordada a caracterização estrutural do PDGF e de seus receptores, destacando-se a participação deste fator de crescimento na foliculogênese. Parte desta revisão deu origem ao artigo intitulado: “Caracterização estrutural e papel do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na foliculogênese ovariana”, o qual está publicado no periódico *Acta Scientiae Veterinariae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAPÍTULO I

2.1.1 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficientes que evitem a grande perda oocitária que ocorre normalmente *in vivo*. Neste contexto, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma importante ferramenta para o estudo dos fatores que controlam a foliculogênese e a atresia, contribuindo assim para o melhoramento da eficiência reprodutiva em animais domésticos, humanos, e de diversas outras espécies (FORTUNE, 2003).

Dessa forma, a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) surge como um importante modelo para a compreensão de mecanismos e fatores envolvidos na fase pré-antral da foliculogênese. Tal biotécnica tem como principal objetivo resgatar oócitos oriundos de folículos pré-antrais, a partir do ambiente ovariano, e posteriormente cultivá-los *in vitro* até a maturação, prevenindo-os da atresia. Dessa forma, a MOIFOPA pode oferecer condições para a conservação e multiplicação de animais de alto valor genético e/ou em vias de extinção, através do fornecimento de um grande número de oócitos provenientes de um mesmo animal, os quais poderão ser destinados aos programas de produção *in vitro* de embriões ou clonagem e posterior transferência de embriões (FIGUEIREDO et al., 2008). Para o sucesso desta biotécnica, é essencial o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Contudo, para alcançar este propósito, alguns pontos devem ser considerados, como o sistema de cultivo a ser empregado, o método utilizado para o isolamento folicular, bem como a composição do meio.

2.1.2 Sistemas de cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma técnica que vem sendo largamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias e concentrações sobre o desenvolvimento folicular, com o objetivo de mimetizar o

ambiente ovariano proporcionando aos folículos as condições ideais para que se desenvolvam *in vitro*. Os folículos podem ser cultivados “*in situ*”, ou seja, inseridos no córtex ovariano ou “isolados”. Em adição, o cultivo pode ser realizado em dois passos, podendo ser iniciado com o cultivo de folículos *in situ*, seguido de uma etapa de cultivo de folículos isolados (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; TELFER et al., 2008). Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (FORTUNE, 2003). Contudo, em animais domésticos de médio e grande porte, não é possível utilizar este modelo devido às grandes dimensões dos ovários. Uma alternativa para superar este obstáculo é o cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano, o qual tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos em diferentes espécies, como caprinos (SILVA et al., 2004b), bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), babuínos (WANDJI et al., 1997) e humanos (ZHANG et al., 2004). Além da praticidade, o cultivo *in situ* apresenta como vantagem a manutenção do contato celular (ABIR et al., 2006) e da integridade tridimensional dos folículos. No entanto, neste tipo de modelo, embora haja uma expressiva ativação folicular, poucos folículos primários cultivados progridem até o estágio de folículo secundário (FORTUNE, 2003).

O cultivo de folículos isolados apresenta como vantagens a possibilidade do acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de favorecer melhor perfusão do meio para o folículo (ABIR et al., 2006). Este sistema pode ser realizado de forma bidimensional (mouse: EPPIG; SCHROEDER 1989; CORTVRINDT; SMITZ; VAN STEIRTEGHEM, 1996), na qual o folículo é cultivado diretamente sobre o suporte de plástico ou sobre uma matriz, ou ainda de forma tridimensional, na qual o folículo é incluso em uma matriz, como por exemplo o colágeno (mouse: CARROLL; WHITTINGHAM; WOOD, 1991; pig: HIRAO et al., 1994) e o alginato (XU et al., 2006; WEST et al., 2007).

O sistema de cultivo tridimensional evita a aderência das células foliculares ao suporte plástico e, conseqüentemente, a perda da integridade morfológica do folículo (NAYUDU; OSBORN, 1992). Para ambos os sistemas de cultivo *in vitro* de folículos isolados (bi ou tridimensional), diferentes métodos mecânicos e/ou enzimáticos têm sido desenvolvidos para a obtenção de um grande número de folículos intactos em diferentes espécies (bovinos: FIGUEIREDO et al., 1993; caprinos: LUCCI et al., 1999;

ovinos: CECCONI et al., 1999; ratas: ZHAO, 2000; camundongas: LENIE et al., 2004, PESTY et al., 2007).

2.1.3 Métodos de isolamento folicular

O isolamento folicular consiste na dissociação dos folículos dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina etc.). Existem basicamente três tipos de isolamento de folículos pré-antrais: isolamento mecânico (EPPIG; SCHROEDER, 1989; EPPIG; TELFER, 1993; FIGUEIREDO et al., 1993; HULSHOF et al., 1994; EPPIG; O'BRIEN, 1996; WANDJI et al., 1996), digestão proteolítica pelo uso de enzimas (GREENWALD; MOOR, 1989; FIGUEIREDO et al., 1993; DURRANT et al., 1998) ou isolamento mecânico em combinação com dissociação enzimática parcial (FIGUEIREDO et al., 1993; OKTAY; BRIGGS; GOSDEN, 1997).

Nos procedimentos mecânicos, os folículos podem ser isolados do córtex ovariano com auxílio de equipamentos como o *tissue chopper* (FIGUEIREDO et al., 1993) ou mýxer (NUTTINCK et al., 1993) ou de instrumentos simples como tesouras cirúrgicas (CARAMBULA et al., 1996), pequenos fórceps (HULSHOF et al., 1994), filtros de dissociação celular (JEWGENOW; GÖRITZ, 1995; JEWGENOW; STOLTE, 1996; JEWGENOW et al., 1998) e agulhas dissecantes (JEWGENOW; PITRA, 1993). Nos procedimentos enzimáticos, o isolamento folicular ocorre após contato direto do córtex ovariano com enzimas, sendo as mais utilizadas a colagenase, a tripsina, a pronase e a DNase (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; ROY; TREACY, 1993; TELFER et al., 1999; BOLAMBA et al., 2002). Os tratamentos enzimáticos possibilitam a recuperação de um grande número de folículos pré-antrais, mas podem danificar a membrana basal ou células da teca quando o tempo de incubação não é rigorosamente controlado.

A grande vantagem do isolamento mecânico é que, ao contrário do isolamento enzimático, este mantém a integridade da estrutura folicular, a membrana basal permanece intacta e as interações entre oócito, células da granulosa e células da teca são mantidas (DEMEESTERE et al., 2005). Além disso, o emprego do método mecânico com a utilização do *tissue chopper*, por exemplo, possibilita o isolamento de até 70.000 pequenos folículos pré-antrais (< 100 µm) por ovário bovino (FIGUEIREDO et al., 1993), sendo portanto, uma técnica bastante eficiente. Para o isolamento de grandes

folículos pré-antrais (150-200 μ m), tem sido utilizada a técnica de microdissecação, que isola os folículos do estroma ovariano com o auxílio de agulhas. Esta técnica possibilita a manutenção da integridade das camadas tecais presentes em grandes folículos pré-antrais (TELFER, 1998). No entanto, na espécie caprina, esta técnica possibilita a obtenção de um número reduzido de folículos por ovário de, em média 11 folículos por par de ovário (SARAIVA et al., 2010).

2.1.4 Fatores que afetam o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados obtidos são dependentes da espécie animal estudada, do sistema de cultivo utilizado e principalmente da composição do meio, o qual deve garantir o fornecimento adequado de nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, fatores de crescimento e hormônios (EPPIG; SCHOEDER, 1989; BOLAND et al., 1994; FORTUNE, 2003; PICTON et al., 2008). Diferentes meios comerciais podem ser utilizados para o cultivo de folículos ovarianos *in vitro*. Dentre os meios de cultivo base utilizados para folículos pré-antrais, destacam-se o Meio Essencial Mínimo (MEM) (SILVA et al., 2004a; MATOS et al., 2007), o Meio de Cultivo Tecidual 199 (TCM199) (RAJARAJAN et al., 2006) e os meios Waymouth (MURUVI et al., 2005) e McCoy's (TELFER et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a adição de diferentes suplementos ao meio de cultivo, como piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), aumenta o percentual de folículos morfolologicamente normais e estimula o crescimento folicular (SILVA et al., 2004a; DEMEESTERE et al., 2005). Além disso, tem-se observado que o ácido ascórbico, importante antioxidante, também atua benéficamente sobre a foliculogênese, promovendo uma redução da apoptose em folículos pré-antrais de camundongos (MURRAY et al., 2001) e estimulando a manutenção da viabilidade folicular em caprinos (ROSSETTO et al., 2009) após cultivo de longa duração.

Além da composição do meio de cultivo, outros fatores, como o pH, a temperatura e a tensão de oxigênio, são de extrema relevância para a promoção do desenvolvimento folicular, uma vez que proporcionam *in vitro* condições semelhantes ao ambiente ovariano (YE et al., 2007). Deficiências na regulação do pH podem comprometer a função e a viabilidade celular (KAPUS et al., 1994), bem como dificultar o desenvolvimento pré-implantacional de embriões (ratas: LANE; BALTZ;

BAVISTER, 1998; hamsters: ZHAO et al., 1995). No que diz respeito à temperatura, para o transporte dos ovários, em geral utiliza-se temperaturas mais baixas (4 a 20°C) para reduzir o metabolismo celular e, conseqüentemente, minimizar o gasto de energia e diminuir a taxa de autólise do tecido (SALEHI et al., 2004). Já para o cultivo folicular *in vitro*, emprega-se temperaturas elevadas (37,5 a 39°C), semelhantes à temperatura corporal interna da espécie a ser estudada. No que se refere à concentração de oxigênio ideal para o cultivo *in vitro* de folículos, os resultados ainda são controversos. Alguns trabalhos apontam a concentração de 5% de oxigênio como sendo mais eficaz para estimular o crescimento folicular (ovinos: CECCONI et al., 1999) e a competência oocitária (camundongas: EPPIG; WIIGGLESWORTH, 1995), enquanto outros estudos sugerem a utilização de 20% de oxigênio (camundongas: HU et al., 2001; bovinos: GIGLI; BYRD; FORTUNE, 2006; caprinos: SILVA et al., 2010).

2.1.5 Técnicas para avaliação da eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A utilização de técnicas para a avaliação da qualidade de folículos pré-antrais antes e após o cultivo *in vitro* permite o monitoramento das alterações ocorridas, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais.

A histologia clássica é utilizada para a análise quantitativa de folículos inclusos em tecido ovariano, com a finalidade de verificar modificações na morfologia das células da granulosa, de pavimentosa para cúbica. Assim, a histologia clássica permite classificar os folículos pré-antrais quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, intermediário, primário ou secundário), e ainda quanto às suas características morfológicas (normais ou atrésicos).

A microscopia eletrônica de transmissão é considerada uma técnica qualitativa para a avaliação das organelas celulares e das mudanças ultra-estruturais (SALEHNIA; MOGHADAM; VELOJERDI, 2002) ocorridas durante a atresia folicular, sendo, portanto, um método mais preciso e eficiente do que a histologia clássica para avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais. Em geral, esta técnica é utilizada após o cultivo *in vitro* de folículos isolados ou inclusos em fragmentos ovarianos para confirmar ou não os resultados da análise morfológica por histologia clássica.

Outra técnica empregada para avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro* é a microscopia de fluorescência (BRUNO et al., 2010; SILVA et al., 2010), a qual utiliza marcadores fluorescentes, que quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Além disso, esta técnica é empregada no intuito de avaliar a configuração da cromatina de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, indicando assim o estágio meiótico alcançado após terem sido cultivados e maturados *in vitro* (SARAIVA et al., 2010).

A quantificação dos níveis de RNAm para as diferentes substâncias (ligantes e receptores) que atuam durante a foliculogênese também é considerada uma importante ferramenta para auxiliar na compreensão desse processo, uma vez que permite detectar alterações nos padrões de expressão gênica que ocorrem em resposta à fenômenos relacionadas à sobrevivência, ao crescimento e à diferenciação celular (ZAMORANO; MAHESH; BRANN, 1996). Dentre as técnicas comumente utilizadas para esta finalidade, pode-se destacar a RT-PCR em tempo real, a qual detecta e quantifica ácidos nucleicos em folículos isolados ou ainda inclusos em fragmentos de tecido ovariano enquanto são amplificados, sem a necessidade de realizar purificação e análises adicionais. Para tanto, utiliza-se um sistema de detecção de fluorescência, capaz de captar a luz oriunda da reação de amplificação de um determinado gene no momento real da amplificação (BUSTIN, 2002).

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

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos a partir de estudos *in vitro* com o cultivo de folículos pré-antrais de camundongas, os quais demonstraram que é possível a obtenção de crias vivas a partir de oócitos oriundos de folículos cultivados *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; HASEGAWA et al., 2006). Já em animais de produção, como caprinos (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2010), ovinos (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010), bubalinos (GUPTA et al., 2008) e suínos (HIRAO et al., 1994; WU; EMERY; CARRELL, 2001), o cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros, os quais foram fecundados *in vitro* gerando embriões. Contudo, a quantidade de embriões produzidos a partir de oócitos provenientes de

folículos pré-antrais crescidos *in vitro* ainda é limitado nestas espécies. Nas espécies bovina (GUTIERREZ et al., 2000; ITOH et al., 2002), humana (ROY; TREACY, 1993) e canina (SERAFIM et al., 2010), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram somente até o estágio antral. Em gatas (JEWGENOW; STOLTE, 1996), gambás (BUTCHER; ULLMAN, 1996) e macacas (FORTUNE et al., 1998), já foi observado o crescimento de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro, o que reflete diretamente a dificuldade da técnica e a diferença entre as espécies.

2.2 CAPÍTULO II

Caracterização estrutural e papel do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na foliculogênese ovariana

Structural characterization and role of platelet-derived growth factor (PDGF) in ovarian
folliculogenesis

Acta Scientiae Veterinariae, 38(3):221-236, 2010.

(Artigo publicado)

**Caracterização estrutural e papel do fator de crescimento derivado de plaquetas
(PDGF) na foliculogênese ovariana**

Structural characterization and role of platelet-derived growth factor (PDGF) in ovarian
folliculogenesis

Ivina Rocha Brito¹, Isadora Machado Teixeira Lima¹, Márcia Viviane Alves Saraiva¹,
José Roberto Viana Silva², Ana Paula Ribeiro Rodrigues¹ & José Ricardo de
Figueiredo¹.

¹Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA),
Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará (UECE). Avenida
Paranjana, 1700, Itaperi, CEP: 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil. ²Núcleo de Biotecnologia de
Sobral (NUBIS), Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Ceará (UFC),
Avenida Geraldo Rangel, 100, Derby, CEP: 52042-289, Sobral, CE, Brasil.
CORRESPONDÊNCIA: I.R. Brito [ivinabrito@yahoo.com.br; Tel.: +55 85 3101 9840].

ABSTRACT

Background: The platelet-derived growth factor (PDGF) is expressed in a wide variety of cell types, exerts a potent mitogenic role and acts on the growth, differentiation and cell chemotaxis. Studies have shown that during folliculogenesis, PDGF and their receptors are expressed in oocytes, granulosa cells and thecal cells of ovarian follicles at different developmental stages in several species. Although exist many information about its expression sites, as well as about its action in different cells types, the role of PDGF on ovarian folliculogenesis remains understudied. Thus, this article aims to review issues related to PDGF, suggesting the involvement of this mitogenic factor during follicular development.

Review: Along this work, it was shown aspects related to structural characterization of PDGF and its receptors, as well as PDGF expression in different cells types, emphasizing its importance to follicular development. PDGF family is composed by four polypeptide chains (each encoded by a different gene), which are synthesized in the

form of inactive pro-proteins. After a proteolytic processing, these chains undergo homo or heterodimerization, resulting in five isoforms (PDGF-AA, -BB, -AB, -CC e -DD). The cellular effects of these different PDGF isoforms are mediated by binding, with different specificities, to three transmembrane receptors isoforms of type tyrosine kinase generated by the association of subunits α e β (PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$, - $\beta\beta$). PDGF was initially purified from platelets, being later verified its production by many varieties of cell types. It acts as an important mitogenic factor, especially to cells of mesenchymal origin as fibroblasts and smooth muscle cells, and also exerts a role on cellular migration and survival. Studies with PDGF and its receptors have demonstrated its importance as a paracrine growth factor for normal embryo development and angiogenesis. Although the action of this growth factor has been shown in several cellular responses, its role in ovarian folliculogenesis of mammals is understudied. Folliculogenesis, event initiated at pre-natal life in most species, can be defined as the process of follicular formation, growth and maturation, beginning with the primordial follicle formation and resulting in preovulatory stage. Until the present moment, the different PDGF types and their receptors were detected in ovarian follicles of murines, rodents, swines and humans according to developmental stage. Evidences suggest that this growth factor may acts as a potent regulator of ovarian function, increasing DNA synthesis in granulosa cells and stimulating theca cells growth in swines. In addition, PDGF has shown benefic effects in *in vitro* maturation of bovine oocytes when associated with follicle stimulating hormone (FSH).

Conclusion: Nevertheless, the specific actions of PDGF on ovarian follicles development have not been described due to lack of data available in the literature about this subject. Therefore, this review was performed to clarify the involvement of this growth factor in the regulation of ovarian function in mammals. However, it is

necessary to perform additional studies that may provide a greater understanding about the importance of PDGF during folliculogenesis.

Keywords: PDGF, folliculogenesis, mammalian

Descritores: PDGF, foliculogênese, mamíferos

I. INTRODUÇÃO

II. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

- 2.1. Caracterização estrutural
- 2.2. Estrutura dos genes que codificam os PDGFs
- 2.3. Processamento proteolítico dos PDGFs
- 2.4. Expressão dos PDGFs em diferentes tipos celulares

III. RECEPTORES DE PDGF

- 3.1. Ativação do receptor
- 3.2. Padrões de sinalização induzidos pela ligação PDGF-PDGFR
 - 3.2.1. Padrão RAS-MAPK
 - 3.2.2. Padrão PI3K
 - 3.2.3. Padrão PLC- γ
 - 3.2.4. Padrão Src

IV. PAPEL DOS PDGFs NA FOLICULOGÊNESE

- 4.1. Foliculogênese
- 4.2. Importância do PDGF para o desenvolvimento folicular

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

I. INTRODUÇÃO

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é uma glicoproteína dimérica que foi primeiramente identificada por Ross *et al.* [95] e Kohler & Lipton [56] como um agente mitogênico para células mesenquimais presentes no soro sanguíneo de macacos e camundongos, respectivamente. Diferentes estudos relataram a produção de PDGF por megacariócitos, monócitos/macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, fibroblastos, neurônios e células embrionárias, dentre outros tipos celulares [4, 27, 96, 121].

No ovário mamífero, a expressão do PDGF foi identificada em oócitos, células da granulosa e células da teca de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento. Além disso, evidências indicam a sua atuação nos vários estádios da foliculogênese, bem como no desenvolvimento embrionário inicial. A foliculogênese consiste na formação e crescimento folicular, culminando com a liberação de um oócito maduro capaz de ser fertilizado [117].

O desenvolvimento folicular é coordenado por uma complexa comunicação bidirecional entre oócito, células da granulosa e células da teca, que promove a interação de fatores de crescimento locais e gonadotrofinas entre os compartimentos foliculares. Os fatores intraovarianos, incluindo o PDGF, participam ativamente do controle do crescimento folicular promovendo a multiplicação das células da granulosa e da teca, o crescimento oocitário e regulando a ação das gonadotrofinas de origem hipofisária [22, 120].

Estudos recentes têm contribuído para identificar os locais de síntese do PDGF nos folículos ovarianos e evidenciado seus efeitos específicos na foliculogênese. Desta forma, a presente revisão aborda a caracterização estrutural do PDGF e de seu

receptores, bem como sua atuação em diversos tipos de células, destacando a sua participação na foliculogênese.

II. FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

2.1 Caracterização estrutural

A família PDGF é composta por 4 cadeias polipeptídicas (A, B, C e D), cada uma codificada por um gene diferente [115]. Cada molécula de PDGF é formada por duas cadeias polipeptídicas anti-paralelas ligadas por pontes dissulfídicas através de homo ou heterodimerização, originando 5 isoformas: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC and PDGF-DD. Devido a um “splincing” alternativo nos transcritos de PDGF-A, este é sintetizado na forma de duas diferentes cadeias, sendo uma com 196 e outra com 211 resíduos de aminoácidos, que diferem somente na sua extremidade C-terminal. Ambas as isoformas são encontradas naturalmente em diferentes tipos de células, sendo a de menor tamanho mais abundante [67, 127]. Já as cadeias de PDGF-B, -C e -D apresentam 241, 345 e 370 resíduos de aminoácidos, respectivamente [89].

Os PDGFs pertencem à uma família estrutural e funcionalmente relacionada aos fatores de crescimento vasculares, incluindo os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) [23]. Os fatores PDGF e VEGF contêm um domínio principal, chamado de domínio de homologia PDGF/VEGF (Figura 1). Este domínio é constituído por aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e é, evolutivamente, uma estrutura altamente conservada presente em diferentes organismos, incluindo a *Drosophila* [70] e várias espécies de cobras [49, 123]. É caracterizado pela presença de 8 resíduos de cisteínas conservadas, constituindo o nó de cisteína, onde dois resíduos (2 e 4) estão

envolvidos nas ligações dissulfídicas intermoleculares, e o restante participa das ligações intramoleculares. Esta estrutura está presente em todos os membros da família PDGF e está envolvido tanto na dimerização das duas cadeias como na ligação e ativação do receptor. Além disso, todos os PDGFs possuem um peptídeo sinal e uma extensão N- ou C-terminal envolvidas na regulação das propriedades biológicas destes fatores. Os PDGF-A e -B apresentam uma pequena extensão N-terminal e uma extensão C-terminal, também chamada de “motivo estrutural de retenção”, contendo uma alta proporção de aminoácidos básicos envolvidos na ligação destes fatores a componentes da matriz extracelular [59, 82]. Robbins *et al.* [93] observaram que grande parte do PDGF-BB expresso permanece associado à membrana plasmática. Os PDGF-C e -D não contêm a extensão C-terminal, mas apresentam o domínio CUB como parte da sua extensão N-terminal, o qual liga-se ao domínio principal através de uma cadeia com cerca de 80-100 aminoácidos, chamada de “região de dobradiça” [3, 64]. O domínio CUB é comumente encontrado em diferentes tipos de proteínas, incluindo proteases extracelulares e proteínas de superfície celular, dentre outras [7], e participa da interação proteína-proteína ou proteína-carboidrato, além de regular a distribuição extracelular das cadeias -C e -D inativas.

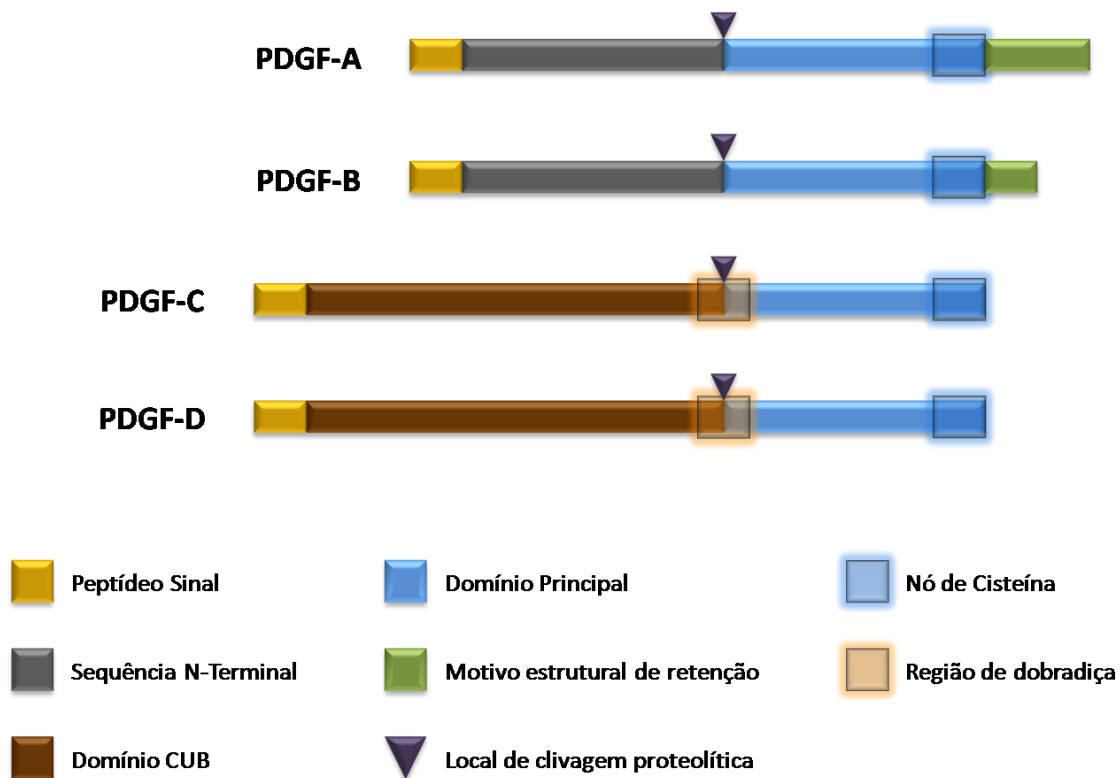


Figura 1 – Caracterização estrutural das cadeias de PDGF. As cadeias A e B são caracterizadas pela presença de um “motivo estrutural de retenção”, enquanto as cadeias C e D apresentam o domínio CUB.

2.2 Estrutura dos genes que codificam os PDGFs

Os genes que codificam as 4 cadeias de PDGFs estão localizados em 4 cromossomos diferentes. Em humanos, os genes *PDGFA* e *PDGFB* estão localizados nos cromossomos 7 e 22 [5, 16, 112], enquanto os genes *PDGFC* e *PDGFD* estão nos cromossomos 4 e 11, respectivamente [115]. Todos os genes apresentam uma organização muito semelhante no que se refere ao número e tamanho dos éxons. No entanto, uma grande diferença é observada entre o tamanho dos íntrons. Os genes

PDGFA e *PDGFB* apresentam íntrons de aproximadamente 20 kb, enquanto os genes *PDGFC* e *PDGFD* apresentam íntrons de aproximadamente 200 kb [63].

Os genes *PDGFA* e *PDGFB* possuem 7 éxons (Figura 2), onde o éxon 1 codifica o peptídeo sinal e os éxons 2 e 3 codificam a sequência N-terminal. Os éxons 4 e 5 são responsáveis pela codificação do domínio principal e o 6 da extensão C-terminal. A cadeia A é expressa em duas diferentes isoformas, devido ao “splicing” alternativo, com ou sem a sequência codificada pelo éxon 6. E, em ambos os genes, o éxon 7 não é codificado [6, 46, 94].

O gene *PDGFC* consiste de 6 éxons, enquanto o gene *PDGFD* apresentam um éxon adicional. Em ambos os genes, o éxon 1 codifica o peptídeo sinal e os éxons 2 e 3, o domínio CUB. No gene *PDGFC*, o éxon 4 codifica a “região de dobradiça” e no gene *PDGFD* esta região é codificada pelos éxons 4 e 5. Conseqüentemente, o domínio principal é codificado pelos éxons 5 e 6 no gene *PDGFC*, e 6 e 7 no gene *PDGFD* [63].

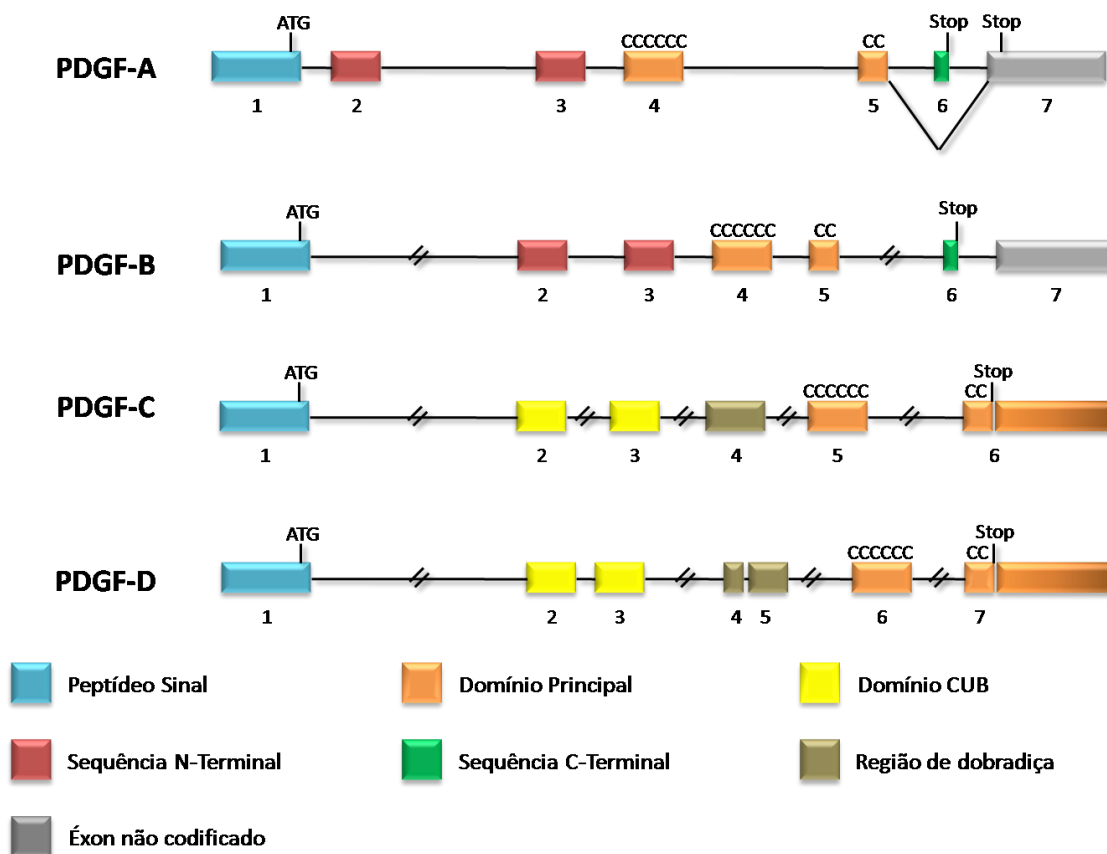


Figura 2 – Estrutura dos genes que codificam as quatro cadeias de PDGF. Duas isoformas de PDGF-A podem ser originadas devido a um splicing alternativo, onde são utilizados dois códons de terminação localizados em éxons diferentes. Os códons de iniciação (ATG) e terminação (Stop) são representados na figura. Os íntrons e éxons não são apresentados em escala, sendo os íntrons com comprimento superior a 5 kb representados por (/). Figura adaptada de Li & Eriksson [63].

2.3 Processamento proteolítico dos PDGFs

Todos os PDGFs são sintetizados nos retículos endoplasmáticos das células produtoras na forma de moléculas precursoras inativas, denominadas pró-proteínas. Essas moléculas são então dimerizadas e necessitam de diferentes processamentos proteolíticos para a sua ativação [93]. No entanto, atualmente, não existem evidências de regulação da secreção dos PDGFs, sendo estes liberados de forma contínua [25].

Os PDGF-A e -B são ativados por um padrão exocítico. Após a dimerização das suas cadeias nos retículos endoplasmáticos, os dímeros são transportados para o complexo de Golgi, onde ocorre o processamento proteolítico, caracterizado pela remoção da extensão N-terminal das moléculas. PDGF-AA é processado em uma molécula de 30 kDa, a qual é carregada por vesículas até a superfície da célula para liberação extracelular por exocitose. Já o PDGF-BB é processado em dois diferentes produtos finais: uma molécula de 24 kDa, mais abundante, a qual é degradada por lisossomos, e outra de 30 kDa, liberada da mesma forma que o PDGF-AA [83]. A protease envolvida na conversão da pró-PDGF-A para PDGF-A ainda é desconhecida, no entanto, evidências sugerem que a furina, uma endoprotease dibásica, seja a responsável por esta conversão [101]. Da mesma forma, a enzima correspondente para a

conversão da pró-PDGF-B para PDGF-B ainda não foi identificada, mas acredita-se que também seja uma pró-proteína convertase.

As isoformas -C e -D são secretadas sem a remoção da extensão N-terminal, ou seja, na sua forma inativa sugerindo que ambos os fatores são ativados por proteólise extracelular [23, 92]. A ativação requer a remoção do domínio CUB, incluso na extensão N-terminal, e liberação do domínio principal para que possa haver a ligação da proteína ao receptor. As enzimas plasmina e ativador de plasminogênio de tecido (tPA) têm sido demonstradas como as responsáveis pela clivagem proteolítica do PDGF-C, enquanto somente a plasmina pode remover o domínio CUB do PDGF-D [23]. Além disso, PDGF-C e -D parcialmente processados, ou seja, com remoção de somente um domínio CUB do homodímero (chamados de hemidímeros), ainda são capazes de se ligar ao receptor. No entanto, esta ligação ocorre com baixa afinidade e desencadeia uma resposta antagônica, ou seja, a ligação do hemidímero impede que ocorra a dimerização do receptor e, conseqüentemente, a transdução do sinal [89].

2.4 Expressão dos PDGFs em diferentes tipos celulares

O padrão de expressão de cada PDGF vem sendo amplamente estudado, demonstrando que este fator é sintetizado por uma grande variedade de tipos celulares. O PDGF-AA tem sido identificado como produto de células epiteliais, osteosarcomas, melanomas e glioblastomas [36, 79], sendo necessário durante a embriogênese e organogênese, bem como no desenvolvimento do sistema nervoso central e da crista neural [9, 26, 29, 51, 52, 62, 108, 109]. Já o PDGF-BB é expresso em células do endotélio vascular, megacariócitos e neurônios, sendo implicado principalmente na angiogênese [1].

O PDGF-CC é expresso em células epiteliais, musculares e progenitoras neurais e, em adultos, parece contribuir para a cicatrização de ferimentos, proliferação de fibroblastos, migração epitelial, vascularização e infiltração de neutrófilos. Além disso, a presença de PDGF-CC foi demonstrada em tecidos ativamente angiogênicos, como placentas, alguns tecidos embrionários, e tumores, sugerindo um papel para esta isoforma durante a angiogênese [61]. Já a expressão de PDGF-DD é bem menos caracterizada, embora tenha sido observada em fibroblastos e células musculares lisas [1].

Quanto à ocorrência de PDGF-AB, acredita-se que esta seja específica para seres humanos [111]. Plaquetas humanas e algumas linhagens de células cultivadas expressam naturalmente as cadeias -A e -B, podendo originar as três isoformas, sugerindo que a formação de dímeros é um processo aleatório [31, 32, 34]. Esta observação é baseada em trabalhos que utilizam células transfectadas com os genes das cadeias -A e -B, onde verificou-se a formação tanto de heterodímeros quanto de homodímeros [42]. No entanto, Hammacher *et al.* [31] demonstraram que as plaquetas são a maior fonte do heterodímero -AB, enquanto os homodímeros -AA e -BB são encontrados em menor proporção. In vivo, a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos é estimulada pelo PDGF-AB [48], sendo detectado, ainda um efeito terapêutico na cicatrização de ferimentos para esta isoforma [72].

III. RECEPTORES DE PDGF

Os eventos celulares mediados pelos PDGFs acontecem após a ligação da molécula e a consequente ativação do receptor, o qual é uma glicoproteína transmembranária do tipo tirosina quinase. Estes receptores são formados por duas

cadeias polipeptídicas, α e β , constituídas por 1.089 e 1.106 resíduos de aminoácidos, respectivamente [12, 13]. Após a ligação do PDGF, duas cadeias de receptor dimerizam-se e, dependendo da configuração do ligante e do padrão de expressão do receptor, diferentes isoformas podem ser formadas: PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ e PDGFR- $\alpha\beta$ [39]. As isoformas diméricas PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB e PDGF-CC se ligam ao PDGFR- $\alpha\alpha$, enquanto PDGF-BB e PDGF-DD interagem com o PDGFR- $\beta\beta$. O heterodímero PDGFR- $\alpha\beta$, por sua vez, pode ser formado após a ligação das isoformas PDGF-AB, PDGF-BB e PDGF-CC [10, 130].

Estruturalmente, os PDGFRs são caracterizados por uma região extracelular, composta por cinco domínios semelhantes à imunoglobulinas, sendo os três primeiros domínios responsáveis pela interação com os ligantes [129], enquanto o domínio 4 contribui para a dimerização das subunidades de receptores [81]. Apresentam ainda uma região transmembranária e outra intracelular, formada por um domínio justamembranário seguido pelo domínio tirosina quinase e, por fim, uma cadeia C-terminal (Figura 3).

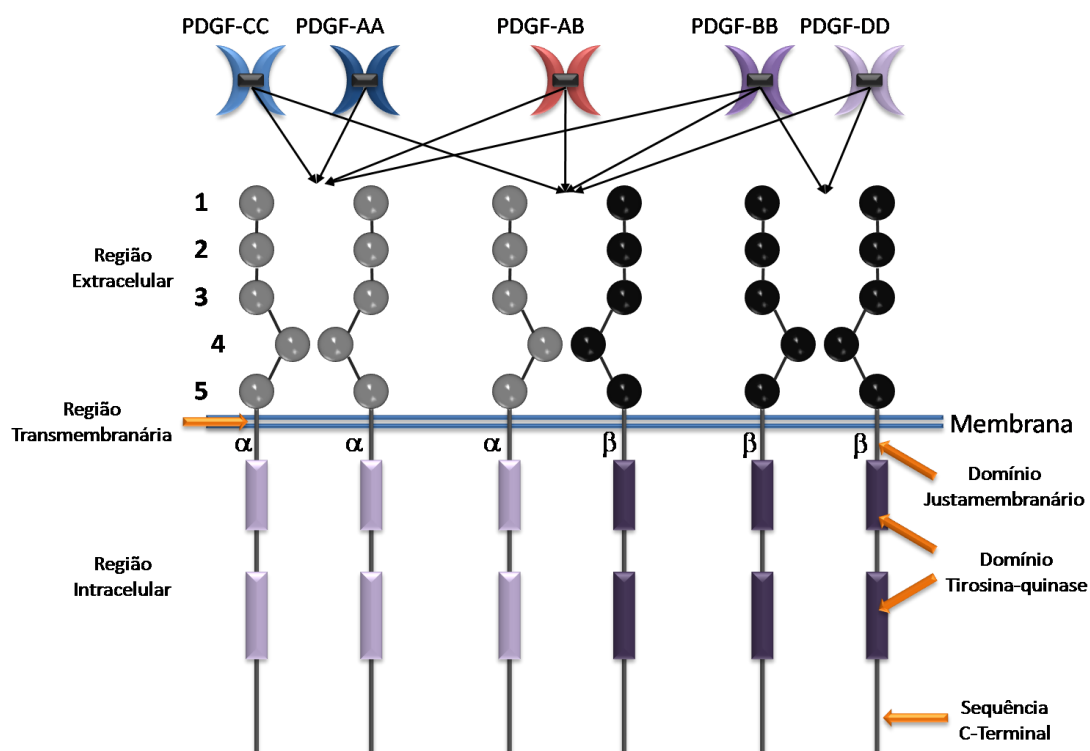


Figura 3 – Interações PDGF-PDGFR e organização estrutural dos receptores para os PDGFs. Diferentes isoformas de PDGF ligam-se e dimerizam as subunidades α e β dos receptores. Cada receptor é constituído de uma região extracelular, a qual apresenta 5 domínios semelhantes à imunoglobulinas, uma região transmembranária e outra intracelular, composta pelos domínios justamembranário e tirosina-quinase.

As cinco isoformas diméricas de PDGF possuem habilidades distintas para se ligar e ativar os receptores, conforme mostrado em um estudo realizado em ratos, utilizando células osteoblásticas fetais, o qual sugere que os diferentes tipos de receptores não só se ligam seletivamente a uma ou mais isoformas de PDGF, como também são capazes de responder de forma diferente a estas [86]. Desta forma, a expressão de ambos os receptores e de cada um dos cinco PDGFs é controlada de forma independente, dando ao sistema PDGF/PDGFR uma grande flexibilidade. A proporção de isoformas de PDGF e PDGFRs expressas varia grandemente entre os diferentes tipos de células. Algumas células apresentam apenas uma das isoformas de PDGFR, como as células precursoras da glia [35], plaquetas humanas [119] e células endoteliais de fígado de ratos [40], que expressam a isoforma $\alpha\alpha$, ou células musculares lisas e endoteliais de capilares de camundongos [107], que expressam somente a isoforma $\beta\beta$. Outros tipos de células expressam ambas as isoformas, simultânea ou separadamente, como por exemplo, fibroblastos e células musculares lisas [107].

As isoformas homodímeras exercem um potente efeito mitogênico, promovendo o crescimento de células tumorais [38, 90], a reorganização dos filamentos de actina [20] e o aumento intracelular de Ca^{2+} [17]. A ativação do receptor $\beta\beta$ estimula a quimiotaxia, enquanto o receptor $\alpha\alpha$ pode inibir ou estimular a migração de diferentes tipos de células, incluindo fibroblastos, células musculares lisas e epiteliais [57, 100, 125, 128]. O receptor $\beta\beta$ inibe a comunicação entre as células através de junções do tipo gap [43] e exerce ainda um efeito antiapoptótico [124].

Contudo, os níveis de expressão dos receptores para PDGF não permanecem constantes nas células, podendo diferentes estímulos externos, tais como inflamação, desenvolvimento embrionário ou diferenciação, exercer influência sobre a expressão desses receptores celulares permitindo a ligação de alguns PDGFs, mas não de outros [97].

3.1 Ativação do receptor

Após a ligação do PDGF ao seu receptor, ocorre a dimerização das subunidades de receptores, caracterizada pela aproximação dos domínios citoplasmáticos de cada subunidade, permitindo a fosforilação da tirosina entre as diferentes subunidades do dímero (transfosforilação). Essa dimerização é essencial para a ativação da quinase e consequente ativação do receptor [53], o qual sofre mudanças conformacionais que permitem que a enzima, em atividade basal, fosforile um resíduo específico de tirosina. Este evento leva ao “desbloqueio” da quinase, a qual aumenta sua atividade enzimática agindo sobre outros resíduos de tirosina, bem como sobre outros substratos.

Nove e doze locais de fosforilação têm sido identificados nos receptores α e β , respectivamente [37]. As tirosinas fosforiladas dentro do domínio quinase (Tyr-849 no receptor α e Tyr-857 no receptor β) regulam a atividade catalítica das quinases, enquanto as tirosinas fosforiladas fora deste domínio criam locais específicos para a ligação das moléculas responsáveis pela transdução do sinal [39].

Em geral, as moléculas sinalizadoras podem ligar-se aos receptores através de diferentes domínios, como por exemplo, os domínios SH2 (domínio de homologia à Src 2) e PTB (domínio de ligação da fosfotirosina), que reconhecem tirosinas fosforiladas, o domínio SH3, o qual reconhece regiões ricas em prolina, o domínio PH (domínio de

homologia à proteína pleckstrin), que reconhece membrana fosfolipídica, e o domínio PDZ, o qual reconhece sequências C-terminal específicas [37].

No entanto, todas as enzimas envolvidas na transdução da mensagem gerada pela formação do complexo PDGF-PDGFR utilizam o domínio SH2 para interagir com o receptor [13].

3.2 Padrões de sinalização induzidos pela ligação PDGF-PDGFR

Após a ativação do receptor, diferentes mecanismos de sinalização são recrutados. Estes envolvem as moléculas Ras-MAPK, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), Fosfolipase C γ 1 (PLC- γ) e Src. Outras moléculas, como Grb2, Grb7, Nck, Shc e Crk não possuem atividade enzimática e desempenham a função de proteínas adaptadoras, intermediando a interação do receptor com a molécula sinalizadora [11]. Além disso, membros da família Stat (Stat-1, -3, -5a, - β e -6) também se ligam aos PDGFR e atuam como fatores transcricionais que, após a fosforilação da tirosina, são direcionados para o núcleo das células onde afetam a transcrição de genes específicos [116].

A maioria das células responsivas ao PDGF são dependentes do contato com moléculas presentes na matriz extracelular. Esse contato é mediado pelas integrinas, as quais são receptores transmembranários localizados na superfície das células. A interação entre os PDGFRs, as integrinas e moléculas específicas da matriz extracelular levam à formação de adesões focais, onde vários padrões de sinalização são iniciados [14], aumentando a migração e a proliferação celular, e prevenindo a apoptose [2,24]. A seguir são descritas as mais importantes vias de sinalização ativadas pelos receptores de PDGF.

3.2.1 Padrão Ras-MAPK

O receptor de fator de crescimento ligado à proteína 2 (Gbr2) é uma pequena proteína citoplasmática de 25 kDa, constituída por dois domínios, SH3 e SH2 [66, 104]. O Gbr2 está constitutivamente ligado a uma região rica em prolina da proteína SOS (Son of Sevenless), uma permutadora GDP/GTP para RAS, formando o complexo Gbr2/SOS. Uma vez ativado, este complexo é então recrutado para a membrana da célula onde se liga ao receptor através do domínio SH2 da Grb2 e, desta forma, permite a ativação de RAS. A proteína RAS liga-se à quinase Raf-1, a qual inicia eventos em cascata da via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) [11]. Após a ativação da MAPK, esta fosforila uma grande variedade de substratos membranares e citoplasmáticos, bem como fatores de transcrição e, assim, pode contribuir para a regulação de diferentes processos celulares, tais como crescimento, migração e diferenciação [39].

3.2.2 Padrão PI3K

O fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) desempenha um importante papel na transdução do sinal intracelular, podendo ser ativado pela maioria dos receptores do tipo tirosina quinase. O PI3K consiste em um complexo heterodimérico composto por uma subunidade reguladora, p85, e uma subunidade catalítica, p110. Similarmente a outras proteínas contendo o domínio SH2, o PI3K forma complexos com tirosinas fosforiladas de receptores ativos. Sua principal função é converter fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), o qual atua como segundo mensageiro ativando um grande número de moléculas efetoras. As respostas celulares

mediadas pela ativação da via PI3K incluem reorganização das fibras de actina, quimiotaxia, crescimento celular e inibição da apoptose [118].

O PI3K, juntamente com membros da família Src e as quinases fosforiladas presente nos receptores, podem estar envolvidos na regulação do processo de internalização dos receptores para PDGF [47, 76, 110]. A ligação da proteína ao receptor induz a internalização do complexo ligante/receptor em endossomos, podendo esse complexo ser dissociado e o receptor devolvido à membrana, ou ainda degradado devido à fusão dos endossomos com lisossomos [110].

3.2.3 Padrão PLC- γ

Da mesma forma que o PI3K, a PLC- γ é imediatamente recrutada pelo receptor tirosina quinase fosforilado, ligando-se através do seu domínios SH2. Após sua ativação, a PLC- γ hidrolisa seu substrato, o PIP₂, originando duas moléculas, PIP₃ e diacilglicerol, que irão atuar como segundos mensageiros. O PIP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ intracelular, o qual se liga a calmodulina, ativando, posteriormente, uma família de proteínas quinases dependentes de calmodulina (CaMKs), enquanto o diacilglicerol, juntamente com o Ca²⁺, ativa membros da família de proteínas quinase C (PKC) [4]. A PLC- γ estimula diversos processos celulares, tais como angiogênese, proliferação, crescimento e motilidade de diferentes linhagens de células [50].

3.2.4 Padrão Src

As proteínas da família Src são um tipo de tirosina quinase citoplasmática não receptora, ativadas a partir da fosforilação dos resíduos de tirosina presentes no domínio

justamembranário do receptor [28, 41, 58]. A ativação das proteínas Src, Fyn e Yes, as quais são os membros desta família envolvidos na sinalização induzida pelos PDGFs, resulta no crescimento e/ou diferenciação celular [58] e são essenciais para a transmissão do sinal mitótico [114].

IV. PAPEL DOS PDGFs NA FOLICULOGÊNESE

4.1 Foliculogênese

A foliculogênese ovariana consiste no processo de formação e crescimento dos folículos, seguindo uma seqüência de acontecimentos característicos que iniciam com o estabelecimento da população folicular no ovário durante a vida pré-natal, na maioria das espécies, e terminam com a ovulação [117]. O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário mamífero, sendo responsável pela síntese e secreção de hormônios esteróides e fatores de crescimento e pela liberação de um oócito maduro através da ovulação. Essas funções atuam de forma interdependente e complementar, sendo necessárias para o sucesso da reprodução [88]. Um oócito circundado por células da granulosa e da teca constituem um folículo, o qual deve proporcionar as condições ideais para a manutenção da viabilidade, crescimento e liberação de um oócito maduro no processo de ovulação [15]. Os folículos podem ser classificados, de acordo com o grau de desenvolvimento, em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios) [102].

Os folículos primordiais constituem grande parte do estoque de gametas femininos no ovário, sendo formados por um oócito imaturo envolto por uma única camada de células somáticas de formato pavimentoso [45]. Após sua formação, esses

folículos podem imediatamente iniciar o seu crescimento ou permanecer quiescentes por dias, meses ou anos [117] até serem estimulados a iniciar seu desenvolvimento. Este evento é denominado de ativação folicular e é marcado por mudanças qualitativas e quantitativas, incluindo modificações no metabolismo e na estrutura folicular [103].

A transição do folículo primordial para primário é caracterizada por alterações morfológicas como por exemplo, o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa e a transformação no formato destas células de pavimentoso para cúbico. Assim, quando o oócito é circundado por uma única e completa camada de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos são denominados primários [30].

À medida que os folículos iniciam o crescimento, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas [60]. Enquanto isso, a multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas destas células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Neste estágio, as células da granulosa apresentam uma extensiva rede de junções do tipo *gap* ou intercomunicantes, que correspondem a canais membranários que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundos mensageiros e pequenos metabólitos entre as células [54]. Ainda nesta fase, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito e os precursores das células da teca são recrutados do estroma ovariano [85].

Com o crescimento dos folículos secundários e a contínua proliferação das células da granulosa, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro. A partir desse estágio os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais e são caracterizados pelo aumento acentuado do diâmetro folicular ocasionado pelo crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e acúmulo de fluido antral [18]. Tal fluido corresponde ao ambiente ao qual o oócito é submetido durante o seu desenvolvimento e maturação, sendo considerado de grande

importância para a determinação da qualidade oocitária. Dentre os componentes do fluido folicular, destacam-se hormônios esteróides e pituitários, citocinas, fatores de crescimento, proteínas séricas e eletrólitos [122].

O último estágio do desenvolvimento folicular ocorre em todas as espécies, geralmente a partir da puberdade [18], quando a liberação de altos níveis de hormônio luteinizante (LH) estimula a formação do folículo pré-ovulatório. Tal estágio é caracterizado por um oócito secundário, cujo núcleo encontra-se na segunda divisão meiótica, circundado pelas células do *cumulus*, formando o complexo *cumulus*-oócito. As células da granulosa dos folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao LH, o qual possibilita que os folículos atinjam os estádios finais de desenvolvimento e ovulem, originando corpos lúteos [77].

Apesar do amplo conhecimento existente sobre as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem com os folículos ovarianos durante seu desenvolvimento, ainda é limitado o conhecimento acerca dos fatores que regulam cada uma dessas etapas. Uma gama de fatores de crescimento e hormônios vêm sendo estudados, conforme descrito por Fortune *et al.* [21], e as evidências apontam que a dinâmica folicular é regulada por uma complexa interação de substâncias, dentre as quais podem ser citados os hormônios esteróides, as gonadotrofinas e fatores de crescimento. Dentre os fatores que atuam regulando o desenvolvimento folicular, pode-se destacar o PDGF, cuja importância na foliculogênese é abordada a seguir.

4.2 Importância do PDGF para o desenvolvimento folicular

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de demonstrar a importância do PDGF para o desenvolvimento folicular. Nilsson *et al.* [78]

caracterizaram o PDGF como um fator de crescimento parácrino produzido pelo oócito, que atua sobre as células da granulosa e da teca intersticial promovendo a transição de folículos primordiais para primários [78]. Os diferentes tipos de PDGF e seus receptores foram detectados em folículos ovarianos de acordo com o estágio de desenvolvimento em murinos [126] e ratas [105]. Nesta última espécie, após análise por imunohistoquímica, as proteínas PDGF-A, -B e -C, e o receptor PDGFR- $\alpha\alpha$ foram localizados em corpos lúteos, indicando um possível papel deste fator durante o processo de ovulação e luteogênese [106]. Em suínos, o PDGF-A e o PDGFR- $\alpha\alpha$ têm sido observados em oócitos e células da granulosa de folículos em estádios iniciais de crescimento [80], enquanto em humanos a isoforma -A foi identificada em grandes folículos antrais [87]. Ainda em humanos, McWilliam *et al.* [71] verificaram a presença de PDGF-AB no fluido folicular e de seu receptor em extratos de células da granulosa luteínicas isolados do líquido antral.

No folículo ovariano, a localização e a ação dos receptores para PDGF têm sido identificadas no oócito, células da granulosa e células da teca em diferentes espécies [19, 99, 113]. Em suínos, o PDGFR- $\beta\beta$ tem sido localizado na camada de células da teca de indivíduos adultos [113]. Já em ovários de ratas, as proteínas PDGFR- $\alpha\alpha$ e PDGFR- $\beta\beta$ foram encontrados em oócitos de folículos primordiais e primários. Além disso, o PDGFR- $\alpha\alpha$ também foi demonstrado em células da teca de folículos primários, secundários e antrais e em células da pré-granulosa/granulosa de folículos primordiais, secundários e antrais, enquanto o PDGFR- $\beta\beta$ foi demonstrado em células da teca do estroma e de folículos em todos os estádios de desenvolvimento [105].

Através da técnica de hibridização *in situ*, foi demonstrada a presença de RNAm para PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D em células da teca de folículos secundários, e somente para PDGF-D em oócitos de folículos primordiais e primários de ratas [105].

Nilsson *et al.* [78] verificou que o PDGF estimula a expressão do RNAm para Kit Ligand (KL), embora não tenha verificado o efeito deste fator sobre a expressão de PDGF e de seus receptores. Isso sugere que o PDGF promove a ativação de folículos primordiais através de um mecanismo que envolve o aumento da expressão do RNAm para KL [84]. Em oócitos não fertilizados de camundongas, foi identificado o RNAm para PDGF-A, o qual desaparece durante o estágio embrionário de 2 células e reaparece no estágio de 4 células [91], sugerindo um possível papel do PDGF na maturação do oócito e desenvolvimento embrionário durante a pré-implantação. Em oócitos suínos, e ainda em células da teca de folículos antrais avançados, Okamura *et al.* [80] também demonstraram a expressão de RNAm para o receptor PDGFR- α .

Estudos recentes têm identificado a atuação dos PDGFs em folículos pré-antrais de roedores [78, 105, 126], nos quais observou-se que a adição das isoformas -A e -B ao meio de cultivo promoveu o crescimento de folículos primordiais [78] e secundários [105]. Além disso a atividade proliferativa de células da teca de folículos antrais de ratas [19] e porcas [68, 99, 113] também foi estimulada por PDGFs.

Atuando em sinergia com o hormônio folículo estimulante (FSH), os PDGFs induziram a formação de receptores para LH em células da granulosa de ratas [74, 75]. Knecht & Catt [55] mostraram que o PDGF aumenta a atividade do AMPc estimulada pelo FSH, a produção de progesterona e a formação de receptores para LH em células da granulosa de ratas. O LH, por sua vez, induz o aumento dos níveis de RNAm para os PDGF-BB e -DD, e para o receptor β em ovários de ratas, sugerindo um importante papel para este fator durante a luteogênese [106]. Schmahl *et al.* [98] demonstraram ainda que mutações nos genes de todas as isoformas de PDGFs ocasionam uma deficiência na produção de esteróides pelas células, sugerindo que estes fatores também atuam na regulação da esteroidogênese em camundongas.

Por outro lado, Michel *et al.* [73] verificaram que, em suínos, o PDGF não afeta a secreção de progesterona pelas células da granulosa. Além disso, Taylor [113] demonstrou que os PDGF-AB e -BB inibem a secreção de androstenediona e progesterona estimulada pelo LH em células da teca suínas. Nesta espécie, em células tecais cultivadas, o PDGF aumentou a síntese de estradiol na presença do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) [99]. Além disso, Duleba *et al.* [19] observaram um efeito aditivo de PDGF-AB e IGF-1 sobre a síntese de DNA nas células da teca intersticiais de ratas. De forma similar, May *et al.* [68] sugeriram um efeito sinérgico entre PDGF e IGF-1 na proliferação de células da granulosa de suínos. Além disso, nesse mesmo estudo, verificou-se ainda que o fator de crescimento epidermal (EGF) atua potencializando a ação do PDGF em células da teca. Por outro lado, em células da granulosa, o PDGF tem demonstrado aumentar a atividade proliferativa do EGF e do fator de crescimento transformante- α (TGF- α) [69].

Em bovinos, a adição de FSH ao meio de maturação *in vitro* (MIV) contendo PDGF-AB, aumentou a proporção de oócitos inseminados que atingiram os estádios de mórula e blastocisto [33]. Bortolotto *et al.* [8] examinaram os efeitos do PDGF, da insulina e do retinol, bem como de suas interações na MIV de oócitos bovinos, e verificaram que a insulina e o PDGF, associados ou não, aceleraram a maturação nuclear, sendo suas ações potencializadas pelo retinol. A observação de que blastocistos humanos também respondem ao cultivo com PDGF indica uma provável expressão de receptores para este fator durante o desenvolvimento inicial [65].

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme demonstrado, a família PDGF é composta por 5 membros (PDGF-AA, -BB, -AB -CC e -DD), os quais têm sido amplamente estudados nos últimos anos quanto à sua estrutura e atuação. Especialmente com relação à foliculogênese, estudos demonstraram que o PDGF, bem como seus receptores, estão expressos em oócitos, células da granulosa e células da teca de folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes espécies. Estes dados sugerem uma atuação para este fator desde o processo de ativação folicular até o crescimento posterior destes folículos e maturação dos oócitos, seguido pelo desenvolvimento embrionário inicial. Entretanto, pode-se verificar que as informações disponíveis não são suficientes para descrever o papel específico do PDGF sobre o desenvolvimento folicular. Portanto, estudos adicionais são necessários para proporcionar o completo entendimento acerca da importância deste fator de crescimento durante a foliculogênese.

REFERÊNCIAS

- 1 Andrae J., Gallini R. & Betsholtz C. 2008.** Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Gene & Development*. 22(10): 1276-1312.
- 2 Assoian R.K. 1997.** Anchorage-dependent cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology*. 136(1):1-4.
- 3 Bergsten E., Uutela M., Li X., Pietras K., Östman A., Heldin C.H., Alitalo K. & Eriksson U. 2001.** PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nature Cell Biology*. 3(5): 512-516.

- 4 Berridge M.J. 1993.** Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361(6410):315–325.
- 5 Betsholtz C., Johnsson A., Heldin C.H., Westermark B., Lind P., Urdea M.S., Eddy R., Shows T.B., Philpott K., Mellor A.L., Knott T.J. & Scott J. 1986.** cDNA Sequence And Chromosomal Localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature*. 320(6064): 695–699.
- 6 Bonthron D., Collins T., Grzeschik K.H., Van Roy N. & Speleman F. 1992.** Platelet-derived growth factor A chain: confirmation of localization of PDGFA to chromosome 7p22 and description of an unusual minisatellite. *Genomics*. 13(2): 257–263.
- 7 Bork P. & Beckmann G. 1993.** The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *Journal of Molecular Biology*. 231(2): 539–545.
- 8 Bortolotto E.B., Gonçalves P.B.D., Neves J.P., Costa L.F.S., Maciel M.N., Montagner M.M., Farias A.M. & Stranieri P. 2001.** Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53(2): 191-197.
- 9 Boström H., Willetts K., Pekny M., Levéen P., Lindahl P., Hedstrand H., Pekna M., Hellström M., Gebre-Medhin S., Schalling M., Nilsson M., Kurland S., Törnell Heath J.K. & Betsholtz C. 1996.** PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*. 85(6): 863-873.
- 10 Cao R., Bråkenhielm E. & Li X. 2002.** Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors. *FASEB Journal*. 16(12): 1575–83.

- 11 Cattaneo E. & Pellicci P.G. 1998.** Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain. *TINS*. 21(11): 476-481.
- 12 Claesson-Welsh L. 1994.** Platelet-derived growth factor receptor signals. *Journal of Biological Chemistry*. 269(51): 32023-32026.
- 13 Claesson-Welsh L. 1996.** Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 28(4): 373-385.
- 14 Clark E.A. & Brugge J.S. 1995.** Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 268(5208): 233-239.
- 15 Cortvrindt R. & Smitz J.E.J. 2001.** *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction Domestic Animal*. 36(7): 3-9.
- 16 Dalla-Favera R., Gallo R.C., Giallongo A. & Croce C.M. 1982.** Chromosomal localization of the human homolog (c-sis) of the simian sarcoma virus onc gene. *Science*. 218(4573): 686-688.
- 17 Diliberto P.A., Gordon G.W., Yu C.L., Earp H.S. & Herman B. 1992.** Platelet-derived growth factor (PDGF) a receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF b receptor in Balb/c3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 267(17): 11888-11897.
- 18 Driancourt M.A. 2001.** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications and for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55(29): 1211-1239.
- 19 Duleba A.J., Spaczynski R.Z., Arici A., Carbone R. & Behrman H.R. 1999.** Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. *Biology of Reproduction*. 60(3): 546-550.

- 20 Eriksson A., Siegbahn A., Westermark B., Heldin C.H. & Claesson-Welsh L. 1992.** PDGF a- and b-receptors activate unique and common signal transduction pathways. *EMBO Journal*. 11(2): 543–550.
- 21 Fortune J.E. 2003.** The early stages of follicular development, p. activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78(3): 135-163.
- 22 Fortune J.E., Rivera G.M. & Yang M.Y. 2004.** Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*. 82(1): 109-126.
- 23 Fredriksson L., Li H. & Eriksson U. 2004.** The Pdgf family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Review*. 15(4): 197– 204.
- 24 Frisch S.M. & Ruoslahti E. 1997.** Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*. 9(6): 701–706.
- 25 Fruttiger M., Calver A.R. & Richardson W.D. 2000.** Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons. *Current Biology*. 10(20): 1283–1286.
- 26 Fruttiger M., Karlsson L., Hall A.C., Abramsson A., Calver A.R., Boström H., Willetts K., Bertold C.H., Heath J.K., Betsholtz C. & Richardson W.D. 1999.** Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development*. 126(3): 457-467.
- 27 Gaultier C.J. & Michel J.B. 1999.** Angiogenic growth factors. In: Levy B.I. & Tedgui A. (eds). *Biology of the arterial wall*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, pp.101-113.

- 28 Gelderloos J.A., Rosenkranz S., Bazenet C. & Kazlauskas A. 1998.** A role for Src in signal relay by the platelet-derived growth factor alpha receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 273(10): 5908–5915.
- 29 Gnessi L., Basciani S., Mariani S., Arizzi M., Spera G., Bondjers C., Karlsson L. & Betsholtz C. 2000.** Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*. 149(5): 1019-1025.
- 30 Gougeon A. 1996.** Regulation of ovarian follicular development in primates-facts and hypothesis. *Endocrinology Review*. 17(2): 121-155.
- 31 Hammacher A., Hellman U., Johnsson A., Östman A., Gunnarsson K., Westermark B., Wasteson A. & Heldin C.H. 1988.** A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *Journal of Biological Chemistry*. 263(1): 16493-16498.
- 32 Hammacher A., Niste´ R.M., Westermark B. & Heldin C.H. 1988.** A human glioma cell line secretes three structurally and functionally different dimeric forms of platelet-derived growth factor. *European Journal of Biochemistry*. 176(1): 179–186.
- 33 Harper K.M. & Brackett B.G. 1993.** Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation *in vitro*. *Zygote*. 1(1): 27-34.
- 34 Hart C.E., Bailey M., Curtis D.A., Osborn S., Raines E., Ross R. & Forstrom J.W. 1990.** Purification of PDGF-AB and PDGFBB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry*. 29(1): 166–172.

- 35 Hart I.K., Richardson W.D., Heldin C.H., Westermark B. & Raff M.C. 1989.** PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte- type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Development*. 105(3): 595– 603.
- 36 Heldin C.H., Östman A., Eriksson A., Siegbahn A., Claesson-Welsh L. & Westermark B. 1992.** Platelet-derived growth factor: Isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. *Kidney International*. 41(3): 571-574.
- 37 Heldin C.H., Östman A. & Ronnstrand L. 1998.** Signal transduction via platelet derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1378(1): 79-113.
- 38 Heldin C.H., & Westermark B. 1996.** *Role of Platelet-Derived Growth Factor In Vivo* (2nd ed.), edited by Clark R.A.F. New York: Plenum, pp.249–273.
- 39 Heldin C.H. & Westermark B. 1999.** Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*. 79(4): 1283–1316.
- 40 Heldin P., Pertoft H., Nordlinder H., Heldin C.H. & Laurent T.C. 1991.** Differential expression of platelet-derived growth factor a- and b-receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver. *Experimental Cell Research*. 193(2): 364–369.
- 41 Hooshmand-Rad R., Yokote K., Heldin C.H. & Claesson-Welsh L. 1998.** PDGF alpha-receptor mediated cellular responses are not dependent on Src family kinases in endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 111(5): 607–614.
- 42 Hoppe J., Weich H.A., Eichner W. & Tatje D. 1990.** Preparation of biologically active platelet-derived growth factor isoforms AA and AB. Preferential formation of AB heterodimers. *European Journal of Biochemistry*. 187(1): 207–214.
- 43 Hossain M.Z., Ao P. & Boynton, A.L. 1998.** Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in

T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor. *Journal of Cell Physiology*. 174(1): 66–77.

44 Hughes A.D., Clunn G.F., Refson J. & Demoliou-Mason C. 1996. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *General Pharmacology*. 27(7): 1079-1089.

45 Hutt K.J., Mclaughlin E.A. & Holland M.K. 2006. KIT/KIT Ligand in Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis: Roles in Rabbit and Murine Ovarian Follicle Activation and Oocyte Growth. *Biology of Reproduction*. 75(3): 421–433.

46 Johnsson A., Heldin C.H., Wasteson A., Westermark B., Deuel T.F., Huang J.S., Seeburg P.H., Gray A., Ullrich A., Scrace G., Stroobant P. & Waterfield M.D. 1984. The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO Journal*. 3(5): 921–928.

47 Joly M., Kazlauskas A., Fay F.S. & Corvera S. 1994. Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI-3 kinase binding sites. *Science*. 263(5147): 684–687.

48 Jungtäubl H., Peus D., Wlaschek M., Kirchberg K., Meyer-Ingold W., Plewing G. & Scharfletter-Kochanek K. 1994. The integrated response of human dermal fibroblasts to different cytokine combinations. *Archives Dermatological Research*. 286(1): 262-163.

49 Junqueira de Azevedo I.L., Farsky S.H., Oliveira M.L. & Ho P.L. 2001. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the Bothrops insularis pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 276(43): 39836–39842.

- 50 Kamat A. & Carpenter G. 1997.** Phospholipase C-g1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine Growth Factor Review*. 8(2): 109–117.
- 51 Karlsson L., Bondjers C. & Betsholtz C. 1999.** Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development*. 126(12): 2611-2621.
- 52 Karlsson L., Lindahl P., Heath J.K. & Betsholtz C. 2000.** Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR- α deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development*. 127(16): 3457-3466.
- 53 Kelly J.D., Haldeman B.A., Grant F.J., Murray M.J., Seifert R.A., Bowen-Pope D.F., Cooper J.A. & Kazlauskas A. 1991.** Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 266(14): 8987–8992.
- 54 Kidder G.M. & Mhawi A.A. 2002.** Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 123(5): 613.
- 55 Knecht M. & Catt K.J. 1983.** Modulation of cAMP mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Biological Chemistry*. 258(5): 2789-2794.
- 56 Kohler N. & Lipton A. 1974.** Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental Cell Research*. 87(2): 297-301.
- 57 Koyama H., Nishizawa Y., Hosoi M., Fukumoto S., Kogawa K., Shioi A. & Morii H. 1996.** The fumagillin analogue TNP- 470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like

growth factor-I: possible involvement of cyclin-dependent kinase 2. *Circulation Research*. 79(4): 757–764.

58 Kypta R.M., Goldberg Y., Ulug E.T. & Courtneidge S.A. 1990. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell*. 62(3): 481–492.

59 LaRochelle W.J., May-Siroff M., Robbins K.C. & Aaronson S.A. 1991. A novel mechanism regulating growth factor association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain. *Genes & Development*. 5(7): 1191–1199.

60 Lee V.H. 2000. Expression of Rabbit Zona Pellucida-1 Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. *Biology of Reproduction*. 63(2): 401–408.

61 Lei H. & Kazlauskas A. 2008. Focus on Molecules: Platelet-derived growth factor C, PDGF-C. *Experimental Eye Research*. 86(5): 711–712.

62 Levéen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larsson E. & Betsholtz C. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes & Development*. 8(16): 1875–1887.

63 Li X. & Eriksson U. 2003. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 14(2): 91–98.

64 Li X., Pontén A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A., Uutela M., Bäckström G., Hellström M., Boström H., Li H., Soriano P., Betsholtz C., Heldin C.H., Alitalo K., Östman A. & Eriksson U. 2000. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF α -receptor. *Nature Cell Biology*. 2(5): 302–309.

65 Lopata A. & Oliva K. 1993. Chorionic gonadotrophin secretion by human blastocysts. *Human Reproduction*. 8(6): 932–938.

- 66 Lowenstein E., Mohammadi M., Margolis B. & Schlessinger J. 1993.** The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathway. *Science*. 260(5116): 1953-1955.
- 67 Matoskova B., Rorsman F., Svensson V. & Betsholtz C. 1989.** Alternative splicing of the platelet-derived growth factor A-chain transcript occurs in normal as well as tumor cells and is conserved among mammalian species. *Molecular and Cellular Biology*. 9(7): 3148.
- 68 May J.V., Bridge A.J., Gotcher E.D. & Gangrade B.K. 1992.** The regulation of porcine theca cell proliferation *in vitro*: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Endocrinology*. 131(2): 689– 697.
- 69 May J.V., Frost J.P. & Bridge A.J. 1990.** Regulation of Granulosa Cell Proliferation: Facilitative Roles of Platelet-Derived Growth Factor and Low Density Lipoprotein. *Endocrinology*. 126(6): 2896-2905.
- 70 McDonald J.A., Pinheiro E.M. & Montell D.J. 2003.** PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development*. 130(20): 3469–78.
- 71 McWilliam R., Leake R.E. & Coutts J.R. 1995.** Growth factors in human ovarian follicle fluid and growth factor receptors in granulosa-luteal cells. *International Journal of Biological Markers*. 10(4): 216-20.
- 72 Meyer-Ingold W. & Eichner W. 1995.** Platelet-Derived Growth Factor. *Cell Biology International*. 19(5): 389-398.
- 73 Michel U., Liidemann S., Jarry H. & Wuttke W. 1991.** Effects of Growth Factors and Hormones on Basal and FSH-stimulated Inhibin Production by Porcine Granulosa Cells *In vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*. 3(2): 201-13.

- 74 Mondschein J.S. & Schomberg D.W. 1981.** Platelet-derived growth factor enhances granulosa cell luteinizing hormone receptor induction by follicle-stimulating hormone and serum. *Endocrinology*. 109(1): 325-327.
- 75 Mondschein J.S. & Schomberg D.W. 1984.** Effects of partially and more highly purified platelet-derived growth factor preparations on luteinising hormone receptor induction in granulosa cell cultures. *Biology of Reproduction*. 30(3): 603-608.
- 76 Mori S., RöNnstrand L., Claesson-Welsh L. & Heldin C.H. 1994.** A tyrosine residue in the juxtamembrane segment of the platelet-derived growth factor b-receptor is critical for ligand-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 269(7): 4917-4921.
- 77 Nascimento A.A., Pinheiro N.L., Sales A. & Viana J.H.M. 2003.** Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 40(2): 126-132.
- 78 Nilsson E.E., Detzel C. & Skinner M.K. 2006.** Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction*. 131(6): 1007-1015.
- 79 Nister M., Hammacher A., Mellstrom K., Sieobahn A., Ronnstrand L., Westermark B. & Heldin C.H. 1988.** A gliomaderived PDGF A chain homodimer has different functional activities than a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell*. 52(6): 791-799.
- 80 Okamura Y., Myoumoto A., Manabe N., Tanaka N., Okamura H. & Fukumoto M. 2001.** Protein tyrosine kinase expression in the porcine ovary. *Molecular Human Reproduction*. 7(8): 723-729.
- 81 Omura T., Heldin C.H. & Östman A. 1997.** Immunoglobulin-like Domain 4-mediated Receptor-Receptor Interactions Contribute to Platelet-derived Growth Factor-

induced Receptor Dimerization. *Journal of Biological Chemistry*. 272(19): 12676–12682.

82 Östman A., Andersson M., Betsholtz C., Westermark B. & Heldin C.H. 1991. Identification of a cell retention signal in the B-chain of platelet-derived growth factor and in the long splice version of the A-chain. *Cell Regulation*. 2(7): 503–512.

83 Östman A., Thyberg J., Westermark B. & Heldin C.H. 1992. PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *Journal of Cell Biology*. 118(3): 509–519.

84 Parrott J.A. & Skinner M.K. 1999. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. 140(9): 4262–4271.

85 Parrott J.A. & Skinner M.K. 2000. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Molecular Reproduction and Development*. 55(1): 55-64.

86 Pfeilschifter J., Krempien R., Naumann A., Gronwald R.G., Hoppe J. & Ziegler R. 1992. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology*. 130(4): 2059-2066.

87 Pietrowski D. & Keck C. 2004. Differential regulation of ANG2 and VEGF-A in human granulosa lutein cells by choriogonadotropin. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 112(4): 208–214.

88 Pineda M.H. 1989. Female reproductive system. In: McDonanld L.E. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp.303-354.

89 Pinkas H., Fisch B., Rozansky G., Felz C., Kessler-Icekson G., Krissi H., Nitke S., Ao A. & Abir R. 2008. Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their

receptors in human fetal and adult ovaries. *Molecular Human Reproduction*. 14(4): 199–206.

90 Raines E.W., Bowen-Pope D.F. & Ross R. 1990. Platelet-Derived Growth Factor. In: Sporn M.B. & Roberts A.B. *Handbook of experimental pharmacology. Peptide growth factors and their receptors*. Heidelberg: Springer-Verlag, pp.173–262.

91 Rappolee D.A., Breener C.A., Schultz R., Mark D. & Werb Z. 1988. Developmental expression of PDGF, TGF- α , and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science*. 241(4874): 1823-1825.

92 Reigstad L.J., Varhaug J.E. & Lillehaug J.R. 2005. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS Journal*. 272(22): 5723-5741.

93 Robbins K.C., Leal F., Pierce J.H. & Aaronson S.A. 1985. The v-sis/PDGF-2 transforming gene product localizes to cell membranes but is not a secretory protein. *EMBO Journal*. 4(7): 1783-1792.

94 Rorsman F., Leveen P. & Betsholtz C. 1992. Characterization of the mouse PDGF A-chain gene. Evolutionary conservation of gene structure, Nucleotide Sequence and Alternative Splicing. *Growth Factors*. 6(4): 303-313.

95 Ross R., Glomsett J., Kariya B. & Harker L.A. 1974. Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates The Proliferation Of Arterial Muscle Cells *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 71(4): 1207-1210.

96 Ross R., Raines E. & Bowen-Pope D. 1982. Growth factors from platelets, monocytes, and endothelium: their role in cell proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 397(1): 18-24.

97 Rubin K., Tingstro A.M., Hansson G.K., Larsson E., Ronnstrand L., Klareskog L., Claesson-Welsh L., Heldin C.H., Fellstro B.M. & Terracio L. 1988. Induction of

B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet*. 1(8599): 1353–1356.

98 Schmahl J., Rizzolo K. & Soriano P. 2008. The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages. *Genes & Development*. 22(23): 3255-3267.

99 Shores E.M. & Hunter M.G. 2000. The influence of blood cells and PDGF on porcine theca cell function *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 64(3-4): 247– 258.

100 Siegbahn A., Hammacher A., Westermarck B. & Heldin C.H. 1990. Differential effects of the various isoforms of platelet derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 85(3): 916–920.

101 Siegfried G., Khatib A.M., Benjannet S., Chretien M. & Seidah N.G. 2003. The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR(86) by members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity. *Cancer Research*. 63(7): 1458–1463.

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

103 Skinner M.K. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*. 11(5): 461-471.

104 Skolnik E.Y., Batzer A., Li N., Lee C.H., Lowenstein E., Mohammadi M., Margolis B. & Schlessinger J. 1993. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*. 260(5116): 1953-1955.

- 105 Sleer L.S. & Taylor C.C. 2007.** Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biology of Reproduction*. 76(3): 379–390.
- 106 Sleer L.S. & Taylor C.C. 2007.** Platelet-Derived Growth Factors and Receptors in the Rat Corpus Luteum: Localization and Identification of an Effect on Luteogenesis. *Biology of Reproduction*. 76(3): 391–400.
- 107 Smits A., Hermanson M., Niste M.R., Karnushina I., Heldin C.H., Westermark B. & Funai K. 1989.** Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth Factors*. 2(1): 1–8.
- 108 Soriano P. 1994.** Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF b-receptor mutant mice. *Genes & Development*. 8(16): 1888-1896.
- 109 Soriano P. 1997.** The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development*. 124(14): 2691-2700.
- 110 Sorkin A., Westermark B., Heldin C.H. & Claesson-Welsh L. 1991.** Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF b-receptor. *Journal of Cell Biology*. 112(3): 469–478.
- 111 Stroobant P. & Waterfield M.D. 1984.** Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. *EMBO Journal*. 3(12): 2963–2967.
- 112 Swan D.C., McBride O.W., Robbins K.C., Keithley D.A., Reddy E.P. & Aaronson S.A. 1982.** Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus oncogene analogue in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 79(15): 4691–4695.
- 113 Taylor C.C. 2000.** Platelet-derived growth factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and ras-extracellular signal-regulated

kinase-1/2 kinase signaling pathways via the platelet-derived growth factor-beta receptor. *Endocrinology*. 141(4): 1545–1553.

114 Twamley-Stein G.M., Pepperkok R., Ansorge W. & Courtneidge S.A. 1993. The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 90(16): 7696-7700.

115 Uutela M., Lauren J., Bergsten E., Li X., Horelli-Kuitunen N., Eriksson U. & Alitalo K. 2001. Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC genes. *Circulation*. 103(18): 2242–2247.

116 Valgeirsdóttir S., Paukku K., Silvennoinen O., Heldin C.H. & Claesson-Welsh L. 1998. Activation of Stat5 by platelet- derived growth factor (PDGF) is dependent on phosphorylation sites in PDGF b-receptor juxtamembrane and kinase insert domains. *Oncogene*. 16(4): 505–515.

117 Van Den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63(6): 1717-1751.

118 Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Panayotou G. & Waterfield M.D. 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Science*. 22(7): 267–272.

119 Vassbotn F.S., Havnen O. K., Heldin C.H. & Holmsen H. 1994. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor α -receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 269(19): 13874–13879.

120 Webb R., Nicholas B., Gong J.G., Campbell B.K., Gutierrez C.G., Garverick H.A. & Armstrong D.G. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement*. 61(1): 71-90.

- 121 Witte L.D., Kaplan K.L., Nossel H.L., Lages B.A., Weiss H.J. & Goodman D.S. 1978.** Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells. *Circulation Research*. 42(3): 402-409.
- 122 Wu Y.T., Tang L., Cai J., Lu X.E., Xu J., Zhu X.M., Luo Q. & Huang H.F. 2007.** High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Human Reproduction*. 22(6): 1526-1531.
- 123 Yamazaki Y., Takani K., Atoda H. & Morita T. 2003.** Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *Journal of Biological Chemistry*. 278(52): 51985–51988.
- 124 Yao R. & Cooper G.M. 1995.** Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 267(5206): 2003–2006.
- 125 Yokote K., Mori S., Siegbahn A., Rönnstrand L., Wernstedt C., Heldin C.H. & Claesson-Welsh L. 1996.** Structural determinants in the platelet-derived growth factor α -receptor implicated in modulation of chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 271(9): 5101–5111.
- 126 Yoon S.J., Kim K.H., Chung H.M., Choi D.H., Lee W.S., Cha K.Y. & Lee K.A. 2006.** Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertility and Sterility*. 85(1): 193–203.
- 127 Young R.M, Mendonza A.E., Collins T. & Orkin S.H. 1990.** Alternatively spliced platelet-derived growth factor A-chain transcripts are not tumor specific but encode normal cellular proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 10(11): 6051-6054.
- 128 Yu J.C., Heidaran M.A., Pierce J.H., Gutkind J.S., Lombardi D., Ruggiero M. & Aaronson S.A. 1991.** Tyrosine mutations within the a platelet-derived growth factor

receptor kinase insert domain abrogate receptor-associated phosphatidylinositol-3 kinase activity without affecting mitogenic or chemotactic signal transduction.

Molecular and Cellular Biology. 11(7): 3780–3785.

129 Yu, J.C., Mahadevan D., LaRochelle W.J., Pierce J.H. & Heidaran M.A. 1994.

Structural coincidence of α -PDGFR epitopes binding to platelet-derived growth factor-AA and a potent neutralizing monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*.

269(14): 10668–10674.

130 Zwerner J.P. & May W.A. 2001. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming

growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene*. 20(5): 626–33.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a região Nordeste concentra em torno de 93% da população caprina do Brasil (IBGE, 2006), contudo, os rebanhos ainda apresentam baixa qualidade genética, sendo formados principalmente por animais sem raça definida, cujo potencial reprodutivo está abaixo do esperado. Tendo em vista que estes animais possuem grande importância econômica e social para o desenvolvimento dessa região por representarem fontes de renda e de alimento, fornecendo carne, leite, pele e derivados, é essencial a compreensão da fisiologia ovariana nesta espécie a fim de proporcionar um melhoramento genético e, conseqüentemente, um aumento na produtividade animal. Nesse contexto, surge a importância da aplicabilidade da biotécnica de MOIFOPA, também conhecida como Ovário Artificial, que visa recuperar um grande número de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, antes que eles se tornem atrésicos, a fim de promover o seu crescimento e completa maturação por meio do uso de sistemas de cultivo *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2008).

Na busca por um sistema ideal de cultivo de folículos pré-antrais, diversas substâncias e fatores intra-ovarianos já foram testados *in vitro*, sendo ainda avaliada a expressão de diversas substâncias e de seus respectivos receptores no ovário. Entretanto, ainda não foi relatada a presença de RNAm para os receptores de PDGF (PDGFR- α e - β) nas diferentes categorias foliculares em ovários de cabras. Além disso, os efeitos de diferentes concentrações de PDGF, na presença ou ausência de FSH, ainda não foram avaliados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

Diante disso, o enfoque principal deste trabalho será demonstrar a presença de RNAm para PDGFR- α e - β em folículos isolados do ambiente ovariano, através da técnica de PCR em tempo real, bem como avaliar os efeitos do PDGF sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados, a fim de se determinar a concentração ideal dessa substância, seja na presença ou ausência de FSH, para a promoção do desenvolvimento folicular em caprinos.

Dessa forma, este trabalho poderá fornecer informações importantes para contribuir na redução da grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, possibilitando o desenvolvimento de um sistema de cultivo capaz de propiciar o adequado crescimento folicular *in vitro*. Com base nos resultados desse estudo, oócitos oriundos dos folículos pré-antrais cultivados poderão, em pesquisas posteriores, ser destinados à maturação e subsequente fertilização *in vitro*, visando a produção de

embriões. Isto seria um fator determinante para otimizar a multiplicação de cabras de alto valor zootécnico e/ou em via de extinção, o que poderá trazer benefícios econômicos para as populações que utilizam esta espécie como fonte de alimentação e sustento.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- Os RNAm para os receptores de PDGF (PDGFR- α e PDGFR- β) estão presentes em folículos ovarianos de caprinos.
- O PDGF, em associação ou não com o FSH, estimula o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar os efeitos de PDGF, isoladamente ou em associação com o FSH, sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os níveis de RNAm para PDGFR- α e PDGFR- β em folículos ovarianos caprinos em diferentes estágios de desenvolvimento;
- Determinar os efeitos do PDGF, associado ou não com o FSH, sobre a sobrevivência, formação de antro e crescimento de folículos ovarianos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

6 CAPÍTULO III

Níveis de RNAm para receptores de PDGF em ovários de cabras e influência do PDGF sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

Steady-state levels of mRNA encoding PDGF receptors in goat ovaries and the influence of PDGF on the *in vitro* development of caprine preantral follicles

Periódico: Journal of Endocrinology
(Submetido em 25 de outubro de 2010)

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram investigar os níveis de RNAm para os receptores de PDGF (PDGFR- α e - β) em folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como avaliar a influência do PDGF sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Para tanto, folículos primordiais, primários e secundários, bem como pequenos (1-3 mm) e grandes (3-6 mm) folículos antrais foram obtidos e os níveis de RNAm para PDGFR- α e - β foram quantificados por PCR em tempo real. Além disso, folículos secundários ($\geq 200 \mu\text{m}$) foram isolados do cortex ovariano de cabras e cultivados por 18 dias em meio α -MEM suplementado com 50 ou 100 ng/ml de PDGF, na presença ou ausência de FSH. Os resultados da PCR em tempo real mostraram níveis de RNAm para PDGFR- α significativamente superiores em folículos secundários quando comparados aos folículos primordiais e primários, enquanto os níveis de RNAm para PDGFR- β apresentavam-se mais elevados em folículos primários e secundários em comparação aos folículos primordiais. Ambos os receptores mostraram níveis de RNAm superiores em células da granulosa/teca de pequenos e grandes folículos antrais, quando comparadas aos seus respectivos complexos cumulus-oócito (CCOs). Com relação ao cultivo *in vitro*, verificou-se um percentual de formação de antro significativamente superior no tratamento PDGF 100 ng/ml quando comparado a esta mesma concentração associada ao FSH. Após 18 dias de cultivo, o PDGF em ambas as concentrações, associado ao FSH, promoveu um crescimento folicular significativamente superior ao controle. Além disso, a adição de FSH ao tratamento PDGF 50 ng/ml influenciou positivamente o crescimento folicular quando comparado a esta mesma concentração na ausência de FSH. Dessa forma, o presente estudo forneceu evidências da importância do PDGF para a foliculogênese inicial em cabras, uma vez que a presença de RNAm para PDGFR- α e - β foi identificada em todas as categorias foliculares e, ainda, PDGF associado ao FSH estimula o crescimento de folículos secundários caprinos isolados e cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Folículos ovarianos. PCR. PDGFR.

Steady-state levels of mRNA encoding PDGF receptors in goat ovaries and the influence of PDGF on the *in vitro* development of caprine preantral follicles

PDGFR mRNA levels and role of PDGF *in vitro*

Brito IR^{a*}, Lima IMT^a, Saraiva MVA^a, Silva CMG^a, Magalhães-Padilha DM^a, Araújo VR^a, Luz VB^a, Silva AWB^b, Campello CC^a, Silva JRV^b, Figueiredo JR^a

^a Faculty of Veterinary, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), PPGCV, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Biotechnology Nucleus of Sobral (NUBIS), Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil

*Corresponding address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi.

Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60740-930

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail: ivinabrito@yahoo.com.br (Ivina Rocha Brito)

Abstract

The aims of this study were to investigate the steady-state levels of mRNA for PDGF receptors (PDGFR- α and - β) in caprine follicles at different developmental stages and to evaluate the influence of PDGF on the *in vitro* development of preantral follicles. For this, goat primordial, primary and secondary follicles, as well as small (1-3 mm) and large (3-6 mm) antral follicles were obtained, and PDGFR- α and - β mRNA levels were quantified by real-time PCR. Furthermore, preantral follicles ($\geq 200 \mu\text{m}$) were isolated from goat ovaries and cultured for 18 days in α -MEM supplemented with PDGF at 50 or 100 ng/ml, containing or not FSH. Real-time PCR showed highest PDGFR- α mRNA levels in secondary follicles, while PDGFR- β mRNA levels were highest in primary follicles onwards. Both receptors showed higher mRNA levels in granulosa/theca cells from small and large antral follicles than in their corresponding COCs. In culture, the percentage of antrum formation was significantly higher in 100 ng/ml PDGF compared to the same PDGF concentration associated with FSH. After 18 days, PDGF in both concentrations associated with FSH promoted follicular growth significantly higher than the control. Moreover, the addition of FSH to 50 ng/ml PDGF positively influenced the follicular growth when compared to the same PDGF concentration in the absence of FSH. In conclusion, PDGF is important for early goat folliculogenesis, since the presence of PDGFR- α and - β mRNA was detected in all follicular categories, and PDGF associated with FSH stimulated the growth of goat preantral follicles isolated and cultured *in vitro*.

Keywords: *in vitro* culture, ovarian follicles, PCR, PDGFR.

Introduction

Although the regulation of the later stages of ovarian follicular development has been studied extensively, the early stages of folliculogenesis remain poorly understood, especially in non-rodent species. Understanding the mechanisms that control preantral follicular development is of practical, as well as scientific interest, since their elucidation is a prerequisite for the potential use of preantral follicles, which enclose thousands of oocytes that can grow and mature after *in vitro* culture. The use of this large number of oocytes may, thereafter, increase the reproductive efficiency in domestic animals and endangered species and ameliorate infertility in women exposed to gonadotoxic treatments (Yang & Fortune 2006).

The early signals that initiate follicle growth may depend on changes in both inhibitory and permissive factors within the microenvironment of an individual follicle and on signals originating from the oocyte (Fortune et al. 2004; McGee & Hsueh 2000). In this context, several growth factors, including platelet-derived growth factors (PDGFs), are involved in the early stages of folliculogenesis (Abir et al. 2006).

PDGFs are dimeric glycoproteins composed of four polypeptide chains joined together by disulfide bonds, giving rise to five isoforms: PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, and -DD. The cellular effects of each isoform are mediated by binding to three transmembrane tyrosine kinase receptors generated by the association of α and β subunits (PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$, and - $\beta\beta$). Several studies have shown that PDGF is produced by a wide variety of cells (Ross et al. 1982; Hughes et al. 1996; Gaultier & Michel 1999), and is considered to be a potent mitogenic agent, with functions in cell migration and differentiation (Hoch & Soriano 2003).

In the ovary, the importance of PDGF has been confirmed by studies that showed the presence of PDGF and its mRNA in follicular cells in different species (rats: Nilsson et al. 2006, Sleer & Taylor 2007a; humans: McWilliam et al. 1995; pigs: Taylor 2000, Okamura et al. 2001). Moreover, PDGF receptors have been identified in all compartments in pig follicles (i.e., oocyte, granulosa and theca cells) (Taylor 2000; Okamura et al. 2001). When added to the *in vitro* culture of preantral follicles, PDGF promoted the growth of primordial (Nilsson et al. 2006) and secondary follicles in rats (Sleer & Taylor 2007a) and also increased the proliferative activity of theca cells from antral follicles of rats (Duleba et al. 1999) and pigs (May et al. 1992; Shores & Hunter 2000; Taylor 2000). Furthermore, the *in vitro* interaction between FSH and PDGF increased the formation of LH receptors in the granulosa cells of rats (Mondschein & Schomberg 1981, 1984), the cAMP activity and progesterone production (Knecht & Catt 1983).

Despite the studies mentioned above, there are no data regarding the presence of PDGF receptors in goat ovarian follicles and the effect of PDGF on the *in vitro* follicle development. Therefore, this work was conducted with the following aims: (1) to verify the steady-state levels of PDGFR- α and PDGFR- β mRNA during different follicular stages in non-cultured goat ovaries and (2) to analyze the possible influence of different concentrations of PDGF, associated or not with FSH, on the *in vitro* development of caprine preantral follicles.

Materials and Methods

This work was divided into two experiments: the quantification of PDGFR- α and PDGFR- β mRNA in goat ovaries (Experiment 1) and the *in vitro* culture of caprine

preantral follicles in medium supplemented with PDGF-BB (50 ng/ml or 100 ng/ml) in the absence and presence of FSH in the basic medium (Experiment 2).

Chemicals

Recombinant bovine FSH was purchased from Nanocore (São Paulo, SP, Brazil). Recombinant human PDGF-BB, culture media, and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) unless mentioned otherwise.

Source of ovaries

Ovaries (n=76) were collected from adult cross-breed goats (*Capra hircus*) from a local slaughterhouse. Part of the ovaries (n=26) was used in Experiment 1, and the remainder (n=50) was used in Experiment 2. Immediately after slaughter, the ovaries were washed with 70% alcohol for 10 seconds. Then, the ovaries were washed twice with Minimum Essential Medium (MEM) buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Subsequently, the ovaries were transported at 4°C to our laboratory within one hour (Chaves et al. 2008).

Experiment 1: Steady-state levels of PDGFR- α and PDGFR- β mRNA in goat ovarian follicles

Ten ovaries were used for the isolation of primordial, primary and secondary follicles. From the other ovaries (n=16), cumulus-oocyte complexes (COCs) and mural cells (granulosa and theca cells) were collected from small and large antral follicles. Primordial and primary follicles were isolated using a mechanical procedure, as previously described (Lucci et al. 1999), while secondary ($\geq 200 \mu\text{m}$) follicles were microdissected from ovarian cortex. After isolation, these follicles were washed several times to completely remove the stromal cells and were then placed by category into separate Eppendorf tubes in groups of 10. This procedure was completed within two hours, and all samples were stored at -80°C until the RNA was extracted. From the second group of ovaries (n=16), COCs aspirated from small (1–3 mm) and large (> 3–6 mm) antral follicles were recovered. Compact COCs were selected from the follicle content as described by van Tol et al. (1996). Thereafter, groups of 10 COCs were stored at -80°C until RNA extraction. To collect mural granulosa and theca cell complexes, small (n=10) and large antral follicles (n=10) were isolated from ovaries and dissected free from stromal tissue using 26-G needles. The follicles were then bisected and mural granulosa/theca were collected and stored at -80°C .

Isolation of total RNA was performed using Trizol[®] plus purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 1 ml of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-G needle before centrifugation at 10,000 g for three min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using

RNase-free DNase (340 Kunitz units/ml) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 μ l RNase-free water.

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for five min at 70°C, and chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20 μ l, which was comprised of 10 μ l of sample RNA, 4 μ l 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen), 8 U RNaseout, 150 U Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for one hour at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions but without the inclusion of the reverse transcriptase.

Quantification of PDGFR- α and PDGFR- β mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 μ l cDNA as a template in 7.5 μ l of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5.5 μ l of ultra-pure water, and 0.5 μ l of each primer. The primers were designed to perform amplification of PDGFR- α and PDGFR- β mRNA. β -actin and β -tubulin (Table 1) were used as endogenous controls for normalization of steady-state level of gene mRNA. The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 15 min at 94°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, and 45 sec at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real-time PCR Mastercycler (Eppendorf, Germany). The delta-delta-CT method was used to transform CT values into normalized relative steady-state level of mRNA.

Experiment 2: Culture of goat preantral follicles with PDGF and/or FSH

Isolation and selection of goat preantral follicles

The remaining ovaries (n=50) were used in Experiment 2. In the laboratory, the fat tissue and ligaments surrounding the ovaries were stripped off. Caprine ovarian cortical slices (1-2 mm in thickness) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions. Then, the ovarian cortex slices were placed in a fragmentation medium consisting of HEPES-buffered MEM. Caprine preantral follicles $\geq 200 \mu\text{m}$ in diameter were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from the strips of the ovarian cortex using 26-gauge (26 G) needles. After isolation, follicles were transferred to 100 μl drops containing fresh medium under mineral oil to further evaluate the follicular quality. Follicles with a visible oocyte surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane, and no antral cavity were selected for culture.

In vitro culture of preantral follicles

After selection, follicles were individually cultured in 100 μl drops of culture medium in Petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA) under mineral oil for 18 days at 39°C and 5% CO₂ in air. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with 3 mg/ml bovine serum albumin (BSA), ITS (10 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 5.5 $\mu\text{g/ml}$ transferrin and 5 ng/ml selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid. This basic culture medium was supplemented or not (control) with PDGF-BB (50 ng/ml or 100 ng/ml) in the absence or presence of sequential

recombinant FSH (100 ng/ml from day 0 to day 6, 500 ng/ml from day 6 to day 12 and 1000 ng/ml from day 12 to day 18 of culture; Saraiva et al. *in press*) (see Figure 1). Every other day, partial replacements (60 μ l) were performed and total medium replacements were done on days 6 and 12 of culture. Approximately 47 follicles were used per treatment for a total of 285 follicles.

Morphological evaluation of follicle development

Follicles were classified according to their morphological aspect, and those showing morphological signs of degeneration, such as darkness of the oocyte and surrounding cumulus cells, or misshapen oocytes, were classified as degenerated. Every six days of culture (days 0, 6, 12 and 18) the following characteristics were analyzed: antral cavity formation, defined as a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, and the diameter of healthy follicles, measured as the mean of two perpendicular measurements of each preantral follicle using an ocular micrometer (100X magnification) inserted into a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan). The mean increase in the follicular diameter was calculated as follows: the diameter of viable follicles at day 18, minus the diameter of viable follicles at day 0, divided by the total number of viable follicles at day 18.

Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy

For a more precise evaluation of follicular quality after 18 days of culture, live/dead fluorescent labeling was performed on isolated cultured goat preantral follicles. Briefly, follicles were incubated in 100 μ l droplets of TCM199-HEPES

containing 4 μM calcein-AM and 2 μM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 39°C for 15 min. Afterwards, follicles were washed three times in MEM and examined under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i, Tokyo, Japan). The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered to be alive if the cytoplasm was marked positively with calcein-AM (green) and if chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red).

Statistical analysis

Data referring to PDGFR- α and - β mRNA expression in primordial, primary and secondary follicles were analyzed by the Kruskal-Wallis test (SAS 1999), while the *t*-test was used for paired comparisons of mRNA expression in the small and large antral follicles ($P < 0.05$).

Data concerning to follicular survival and antrum formation after *in vitro* culture were analyzed as dispersion of frequency, expressed in percentages and compared by the chi-square test. Follicle diameter data were initially subjected to Kolmogorov–Smirnov and Bartlett’s tests to confirm normal distribution and homogeneity of variances, respectively. An analysis of variance was then carried out using the PROC GLM procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) using a 2 \times 3 \times 4 factorial arrangement of treatments with medium (MEM alone or with FSH), PDGF concentrations (50 or 100 ng/ml) and culture time (0, 6, 12 and 18 days) as the main effects. Isolated follicles were considered as the experimental units, and the following general model was used:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + P_j + T_k + (M_i \times P_j) + (M_i \times T_k) + (P_j \times T_k) + (M_i \times P_j \times T_k) + e_{ijk},$$

where Y_{ijk} = dependent variable (follicle diameter), μ = general mean, M_i = presence or absence of FSH in the medium, P_j = PDGF concentrations, T_k = culture time, $M_i \times P_j$ = interaction between medium and PDGF concentration, $M_i \times T_k$ = interaction between medium and culture time, $P_j \times T_k$ = interaction between PDGF concentration and culture time, $M_i \times P_j \times T_k$ = interaction among media, PDGF concentration and culture time, and e_{ijk} = residual error. The differences were considered to be significant when $P < 0.05$, and the results were expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Results

Experiment 1: Steady-state levels of PDGFR- α and PDGFR- β mRNA in goat ovarian follicles

The mRNA levels for PDGF receptors (PDGFR- α and PDGFR- β) were quantified in goat follicles at different developmental stages by real-time PCR. After analyzing the PDGFR- α mRNA levels in the group of preantral follicles, it was found that secondary follicles produced more mRNA for this receptor than primordial and primary follicles ($P < 0.05$, Figure 2A). Significantly higher levels of PDGFR- β mRNA were observed in primary and secondary follicles than in primordial follicles ($P < 0.05$, Figure 3A). Moreover, in this study, the mRNA levels for PDGF receptors were compared between cumulus-oocyte complexes (COCs; Figures 2B and 3B) from small (< 3 mm) and large (> 3 mm) antral follicles, and no difference was observed between the two categories of COCs ($P > 0.05$). Similar results were found when comparing PDGFR- α and - β mRNA between granulosa/theca cells from small and large antral follicles ($P > 0.05$; Figures 2C and 3C). Nevertheless, it was verified that granulosa/theca

cells from small and large antral follicles produced higher PDGFR- α and - β mRNA levels when compared to their respective COCs ($P < 0.05$; Figures 2D, 2E, 3D and 3E).

Experiment 2: Culture of goat preantral follicles with PDGF and/or FSH

Follicular survival

Goat preantral follicles with a diameter larger than 200 μm were cultured *in vitro* in the presence of PDGF and/or FSH. The effects of the different treatments on the percentage of surviving follicles at the end of culture are shown in Figure 4. The results showed that all treatments were favorable to the maintenance of follicular survival, since they promoted high survival rates ($>70\%$) after 18 days of culture. Nevertheless, there was no significant difference among treatments. The fluorescence microscopy assessment using calcein-AM labeling confirmed the results of the morphological evaluation. All follicles considered to be survivors (Figure 5A) were positively labeled by green fluorescence after 18 days of culture (Figure 5B).

Antral cavity formation

On day 6 of culture, all treatments showed a high percentage of antral cavity formation (Table 2). With the progression of culture to day 12, there was a significant increase in this parameter in all treatments. However, on day 18, only the treatment containing FSH alone promoted a significant increase in antrum formation ($P < 0.05$). When all treatments were compared to the control, no significant differences were found after 18 days of culture ($P > 0.05$). Similarly, when comparing the different

concentrations of PDGF (50 and 100 ng/ml) in the absence of FSH, no significant difference was observed throughout the culture period ($P>0.05$). After comparing the treatments in the presence of FSH, it was observed that, on day 12 of culture, PDGF 50 + FSH showed a higher rate of antrum formation than FSH alone ($P<0.05$) but did not differ from PDGF 100 + FSH ($P>0.05$). At the end of culture, there were no significant differences among treatments ($P>0.05$). After analyzing the effect of adding FSH to each concentration of PDGF, it was found that, from day 12 of culture, PDGF 100 in the presence of FSH (PDGF 100 + FSH) showed a lower percentage of antrum formation ($P<0.05$) when compared to this same concentration of PDGF in the absence of FSH (PDGF 100).

Follicular growth

Values related to follicular growth during *in vitro* culture of isolated caprine preantral follicles are described in Table 3. There was a progressive and significant increase in follicular diameter until day 12 of culture in all treatments ($P<0.05$). As the culture progressed to day 18, only the follicles cultured with FSH alone significantly increased the growth ($P<0.05$). After comparing the treatments to the control, it was found that, on day 6 of culture, the follicles cultured with PDGF 100 showed larger follicular diameter ($P<0.05$). On day 12 of culture, PDGF 100 and PDGF 50 + FSH had a follicular growth significantly higher than in the control ($P<0.05$). At the end of culture (day 18), both treatments containing a combination of PDGF and FSH resulted in a significant increase in follicular growth compared to the control ($P<0.05$). When the different concentrations of PDGF (50 and 100 ng/ml) in the absence of FSH were compared to each other, there was no significant difference throughout the culture

period ($P>0.05$). However, after analyzing the treatments in the presence of FSH, it was observed that, on day 12 of culture, the follicles cultured in PDGF 50 + FSH showed a diameter significantly higher than those cultured in FSH alone ($P<0.05$) and similar to PDGF 100 + FSH ($P>0.05$). At the end of culture, there were no significant differences among treatments ($P>0.05$). The effect of FSH addition on follicular growth was observed only when PDGF 50 was compared to PDGF 50 + FSH, with a significant increase in follicular diameter was observed when PDGF and FSH were associated ($P<0.05$).

Discussion

The present study demonstrated for the first time in the literature the presence of PDGFR- α and - β mRNA in goat ovaries. This finding is of great interest for elucidating the folliculogenesis in goats, since it suggests a role for the PDGF family during follicular development.

In this study, the presence of high PDGFR- α mRNA levels was demonstrated in secondary follicles onwards. Nevertheless, the quantification of PDGFR- β mRNA revealed an increase in its levels in follicles during the transition from the primordial to the primary stage. Similar results were found by Pinkas et al. (2008) using woman ovaries, in which it was verified the presence of PDGFR- α mRNA in granulosa and theca cells from secondary follicles onwards, while PDGFR- β mRNA was identified in oocytes and granulosa cells from early preantral follicles. This variation in the gene expression patterns of the receptors (PDGFR- α and - β) suggests that each receptor is involved in the regulation of different biological processes. Thus, it is likely that the complex formed by the binding of PDGF to the PDGFR- α receptor is mainly involved

in follicular growth in the late preantral phase by regulating the proliferation of granulosa and theca cells. By contrast, the effects caused by the interaction between the protein and PDGFR- β may be more directly related to early preantral folliculogenesis, including the process of primordial follicle activation (Pinkas et al. 2008).

When the mRNA levels for both PDGF receptors were analyzed in goat antral follicles, it was found that both PDGFR- α and PDGFR- β mRNA were present at higher levels in granulosa/theca cells than in their respective COCs, which suggests that PDGF has a role in cellular proliferation and, therefore, in the follicle growth. The presence of protein and mRNA for PDGF receptors have been demonstrated in antral follicles. Okamura et al. (2001) observed the presence of PDGFR- α mRNA in oocytes and theca cells of antral follicles in pigs. In mice, PDGFR- α protein was detected in granulosa and theca cells from antral follicles and in corpora lutea (Sleer & Taylor 2007a,b). Similarly, PDGFR- β protein was identified in ovarian stroma and theca cells in pigs (Taylor 2000) and rats (Sleer & Taylor 2007a).

In the present study, the influence of different PDGF concentrations (50 and 100 ng/ml) associated or not with FSH on the follicular survival, antrum formation and growth was evaluated. After 18 days of *in vitro* culture, a high rate of follicular survival was verified in all treatments, regardless of the presence of PDGF and/or FSH. This fact can be explained by the use of an extremely rich basic medium that is able to provide adequate nutritional support and maintain the follicular survival. The basic medium used in this study consisted of α -MEM, which has been shown to be an optimal culture medium for the survival of preantral follicles in mice (Kim et al. 2008), sheep (Peng et al. 2010) and goats (Celestino et al. 2010). In α -MEM, high concentrations of DNA precursors, ribonucleosides and deoxynucleosides are present, which are suitable for rapidly dividing cell types and have beneficial effects on follicular survival (Hartshorne

1997). In addition, α -MEM contains several substances, such as vitamins, inorganic salts, energy substrates and antioxidants, that are able to sustain the viability of preantral follicles during *in vitro* culture, regardless of the addition of hormones and growth factors.

In this study, from day 6 of culture onwards, a high rate of antrum formation was observed in all treatments. On day 12 of culture, PDGF 50 + FSH significantly increased the percentage of antrum formation compared to FSH alone. This result suggests that 50 ng/ml PDGF associated with FSH benefit the antral cavity formation in caprine preantral follicles cultured *in vitro*, promoting a precocity of this event when compared to FSH alone, which has been reported to be an important substance related to antrum development *in vitro* in different species (goat: Saraiva et al. *in press*; sheep: Cecconi et al. 1999; cattle: Gutierrez et al. 2000). Indeed, as shown in this work, the mRNA for PDGF receptors is present in goat follicles, suggesting a direct effect of this growth factor during antrum formation. Furthermore, a common mechanism by which follicular development is controlled is related to the regulatory effects that different substances have on the expression of other substances, especially hormones and growth factors. This observation supports the results obtained by Nilsson et al. (2006), who demonstrated a stimulatory effect of PDGF on kit ligand (KL) mRNA expression. Studies have shown a role for KL in the induction of antral cavity formation (Yoshida et al. 1997; Reynaud et al. 2000). Therefore, we hypothesize that, in this study, PDGF may have stimulated the antrum formation by increasing KL mRNA expression.

On the other hand, it was verified in this study that the addition of FSH in the PDGF 100 treatment reduced the percentage of antrum formation from day 12 of culture onwards when compared to the same PDGF concentration in the absence of FSH. Thus, the addition of a high PDGF concentration (100 ng/ml) associated with FSH negatively

affected the antrum formation. It is known that follicular fluid is derived from blood flowing through the thecal capillaries (Gougeon 2010), and for it to be transported to the antral cavity, there must be the contact through intercellular gap junctions, which are important for allowing metabolic exchange and transport of molecules among neighboring cells (Oktem & Oktay 2008). Studies have demonstrated that the inappropriate administration of substances can disturb the delicate crosstalk between oocyte and granulosa cells and can lead to incompetent follicular development (Eppig & O'Brien 1997; Albertini et al. 2001). Therefore, in this study, we believe that the association between a high concentration of PDGF and FSH may have impaired this cellular interaction and may have thus resulted in lower rates of antral cavity formation.

In the current work, the *in vitro* culture of goat preantral follicles for 18 days in both PDGF concentrations (50 and 100 ng/ml) in the presence of FSH resulted in a significant increase in follicular diameter compared to the control. Moreover, the association between FSH and PDGF 50 (PDGF 50 + FSH) was more efficient in promoting follicular growth compared to the same PDGF concentration in the absence of FSH (PDGF 50). Several studies have shown a positive effect of PDGF on follicular growth. Sleer & Taylor (2007a) reported that rat preantral follicles cultured *in vitro* in the presence of PDGF showed a diameter significantly higher than control follicles. In addition, when an inhibitor of PDGF receptors (tyrphostin AG1296) was added to the control medium, there was no significant increase in follicular diameter, demonstrating that PDGF may be involved in the *in vitro* growth of preantral follicles (Sleer & Taylor 2007a). Many researchers have also demonstrated a role for PDGF in cell proliferation. In granulosa cell cultures from rats, PDGF has helped to maintain cell growth and proliferation and appears to be necessary for subsequent states of differentiation (Anderson & Lee 1993). In pigs, May et al. (1990) suggested that PDGF can greatly

amplify granulosa cell proliferation mediated by growth factors, such as EGF. Also in pigs, the potent mitogenic effects of PDGF on theca cells grown *in vitro* were observed (Duleba et al. 1999; Taylor 2000; May et al. 1992).

In agreement with our findings, Knecht & Catt (1983) demonstrated that PDGF may influence the follicular growth by synergizing with FSH and enhancing cellular responsiveness to FSH. In addition, other studies have confirmed the importance of this gonadotropin in promoting increased follicular diameter. In cattle, the presence of FSH in the *in vitro* culture of preantral follicles stimulated their growth and also the survival and antrum formation (Wandji et al. 1996; Gutierrez et al. 2000). In goats, the addition of FSH to the culture medium of preantral follicles enclosed in ovarian tissue was responsible for the preservation of follicular viability, the increase in follicular diameter, and the maintenance of the ultrastructural integrity of follicles (Matos et al. 2007).

In conclusion, the results obtained in this work demonstrated for the first time the importance of PDGF in caprine folliculogenesis. The presence of mRNA for PDGF receptors was identified in all follicular categories. Furthermore, it was verified that PDGF associated with FSH stimulated the growth of goat secondary follicles cultured *in vitro*. Therefore, this study provided important information that will contribute to the understanding of the mechanisms that regulate ovarian folliculogenesis in this species. However, further studies are necessary to obtain more evidence regarding the role of PDGF in follicular development, since the action of this growth factor still remains poorly studied.

Declaration of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

In this study, the co-authors Brito IR, Lima IMT, Saraiva MVA, Silva CMG, Magalhães-Padilha DM, Araújo VR, Luz VB, Silva AWB contributed to the designed study and drafted paper. Campello CC contributed to the analysed data. Finally, Silva JRV and Figueiredo JR contributed to the drafted paper.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number: 554812/2006-1-RENORBIO), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Brazilian Innovation Agency (FINEP). Ivina Rocha Brito is a recipient of a grant from CAPES.

References

- Abir R, Nitke S, Ben-Haroush A & Fisch B 2006 *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles- Clinical significance, progress and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology* **21** 887–898.
- Albertini DF, Combelle CM, Benecchi E & Carabatsos MJ 2001 Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121** 647-653.
- Anderson E & Lee GY 1993 The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium. *Tissue and Cell* **25** 49-72.

Cecconi S, Barboni B, Coccia M & Mattioli M 1999 *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction* **60** 594–601.

Celestino JJH, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Chaves RN, Martins FS, Almeida AP, Cunha RMS, Lima LF, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Bão SN & Figueiredo JR 2010 Steady-State Level of Kit Ligand mRNA in Goat Ovaries and the Role of Kit Ligand in Preantral Follicle Survival and Growth *In Vitro*. *Molecular Reproduction and Development* **77** 231-240.

Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Lima-Verde IB, Matos MHT, Bão SN, Name KPO, Campello CC, Silva JRV & Figueiredo JR 2008 Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development* **20** 640-647.

Duleba AJ, Spaczynski RZ, Arici A, Carbone R & Behrman HR 1999 Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. *Biology of Reproduction* **60** 546–550.

Eppig JJ & O'Brien J 1997 Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* **49** 415-422.

Fortune JE, Rivera GM & Yang MY 2004 Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science* **82-83** 109-126.

Gaultier CJ & Michel JB 1999 Angiogenic growth factors. In *Biology of the arterial wall*, pp 101-113. Eds Levy BI & Tedgui A. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers.

- Gougeon A 2010 Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Annales d'Endocrinologie* **71** 132–143.
- Gutierrez CC, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I & Webb R 2000 Growth and antral formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction* **62** 1322–1328.
- Hartshorne GM 1997 *In vitro* culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction* **2** 94-104.
- Hoch RV & Soriano P 2003 Roles of PDGF in animal development. *Development* **130** 4769-4784.
- Hughes AD, Clunn GF, Refson J & Demoliou-Mason C 1996 Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *General Pharmacology* **27** 1079-1089.
- Kim DH, Seong HH & Lee HJ 2008 *In vitro* culture conditions for the mouse preantral follicles isolated by enzyme treatment. *Asian – Australian Journal of Animal Science* **21** 532-537.
- Knecht M & Catt KJ 1983 Modulation of cAMP mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* **258** 2789-2794.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JRV & Gonçalves PBD 1999 Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science* **56** 39–49.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia Jr JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão SN, Lucci CM & Figueiredo JR 2007 Essential role of follicle

stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote* **15** 173–182.

May JV, Bridge AJ, Gotcher ED & Gangrade BK 1992 The regulation of porcine theca cell proliferation *in vitro*: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Endocrinology* **131** 689–697.

May JV, Frost JP & Bridge AJ 1990 Regulation of Granulosa Cell Proliferation: Facilitative Roles of Platelet-Derived Growth Factor and Low Density Lipoprotein. *Endocrinology* **126** 2896-2905.

McGee EA & Hsueh AJW 2000 Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews* **21** 200-214.

McWilliam R, Leake RE & Coutts JR 1995 Growth factors in human ovarian follicle fluid and growth factor receptors in granulosa-luteal cells. *International Journal of Biological Markers* **10** 216-20.

Mondschein JS & Schomberg DW 1981 Platelet-derived growth factor enhances granulosa cell luteinizing hormone receptor induction by follicle-stimulating hormone and serum. *Endocrinology* **109** 325-327.

Mondschein JS & Schomberg DW 1984 Effects of partially and more highly purified platelet-derived growth factor preparations on luteinising hormone receptor induction in granulosa cell cultures. *Biology of Reproduction* **30** 603-608.

Nilsson EE, Detzel C & Skinner MK 2006 Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction* **131** 1007–1015.

Okamura Y, Myoumoto A, Manabe N, Tanaka N, Okamura H & Fukumoto M 2001 Protein tyrosine kinase expression in the porcine ovary. *Molecular Human Reproduction* **7** 723–729.

Oktem O & Oktay K 2008 The Ovary: Anatomy and Function throughout Human Life. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1127** 1–9.

Peng X, Yang M, Wang L, Tong C & Guo Z 2010 *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **27** 247-57.

Pinkas H, Fisch B, Rozansky G, Felz C, Kessler-Icekson G, Krissi H, Nitke S, Ao A & Abir R 2008 Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their receptors in human fetal and adult ovaries. *Molecular Human Reproduction* **14** 199–206.

Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J & Driancourt MA 2000 Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development* **56** 483–494.

Ross R, Raines E & Bowen-Pope D 1982 Growth factors from platelets, monocytes, and endothelium: their role in cell proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **397** 18-24.

Saraiva MVA, Celestino JJH, Araújo VR, Chaves RN, Almeida AP, Lima-Verde IB, Duarte ABG, Silva GM, Martins FS, Bruno JB, Matos MHT, Campello CC, Silva JRV & Figueiredo JR 2010 Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote in press*. doi: 10.1017/S0967199410000511.

Shores EM & Hunter MG 2000 The influence of blood cells and PDGF on porcine theca cell function *in vitro*. *Animal Reproduction Science* **64** 247-258.

Sleer LS & Taylor CC 2007a Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biology of Reproduction* **76** 379-390.

Sleer LS & Taylor CC 2007b Platelet-Derived Growth Factors and Receptors in the Rat Corpus Luteum: Localization and Identification of an Effect on Luteogenesis. *Biology of Reproduction* **76** 391-400.

Taylor CC 2000 Platelet-derived growth factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and ras-extracellular signal-regulated kinase-1/2 kinase signaling pathways via the platelet-derived growth factor-beta receptor. *Endocrinology* **141** 1545–1553.

van Tol HTA, Van Eijk MJY, Mummery CL, Van Den Hurk R & Bevers MM 1996 Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrane granulosa. *Molecular Reproduction and Development* **45** 218-24.

Wandji SA, Eppig JJ & Fortune JE 1996 FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology* **45** 817-832.

Yang MY & Fortune JE 2006 Testosterone Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles *in Vitro*. *Biology of Reproduction* **75** 924-932.

Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H & Nishikawa S 1997 Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* **184** 122-137.

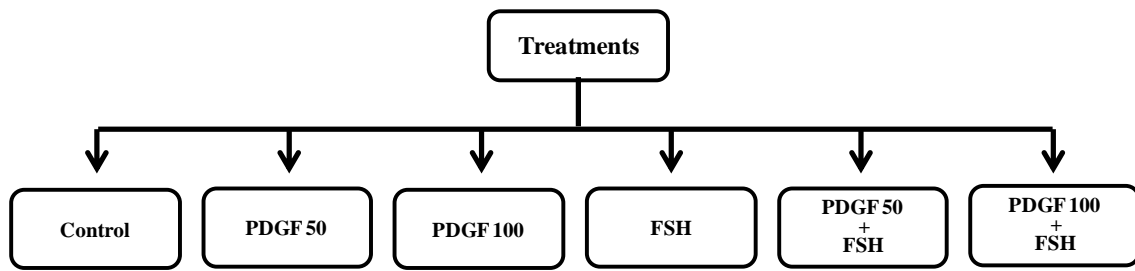
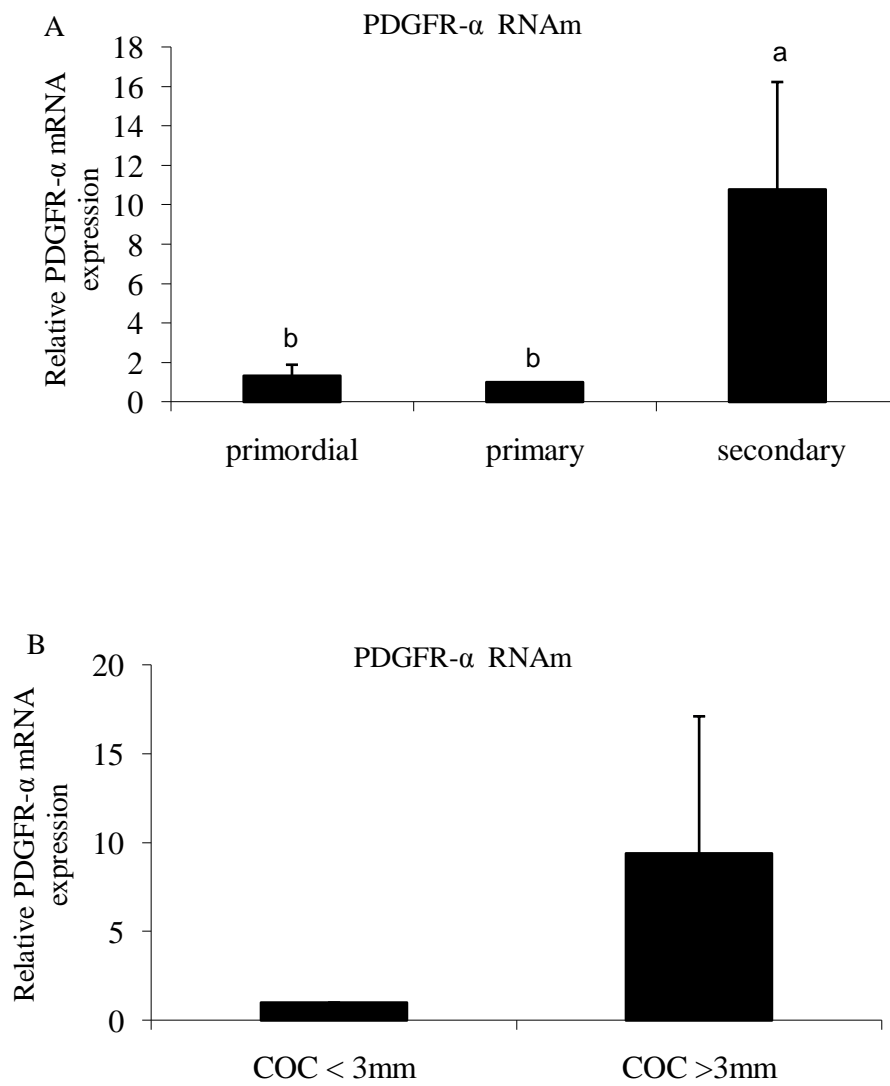


Figure 1. Experimental designed based on the use of PDGF in the absence or presence of FSH.



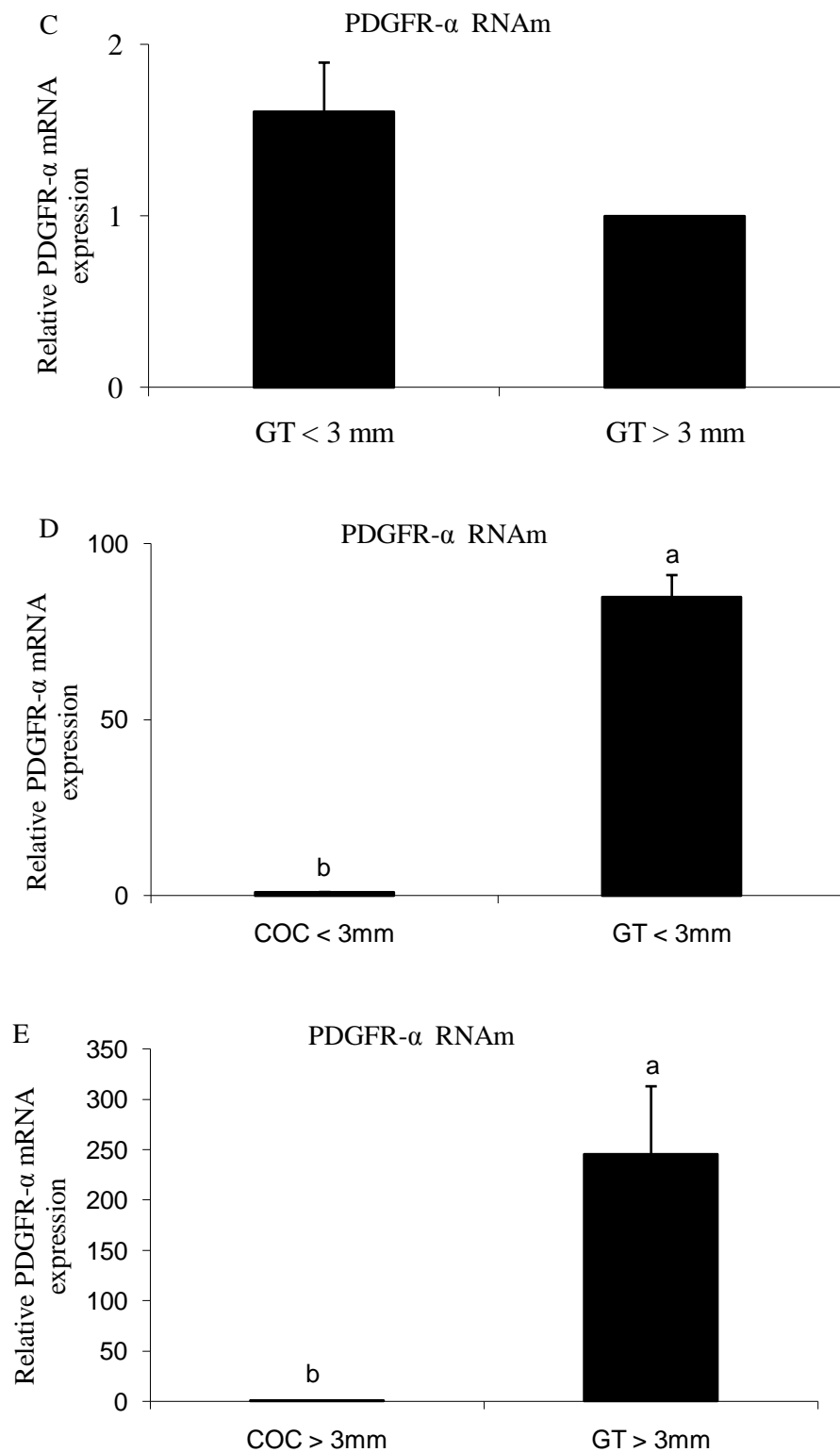
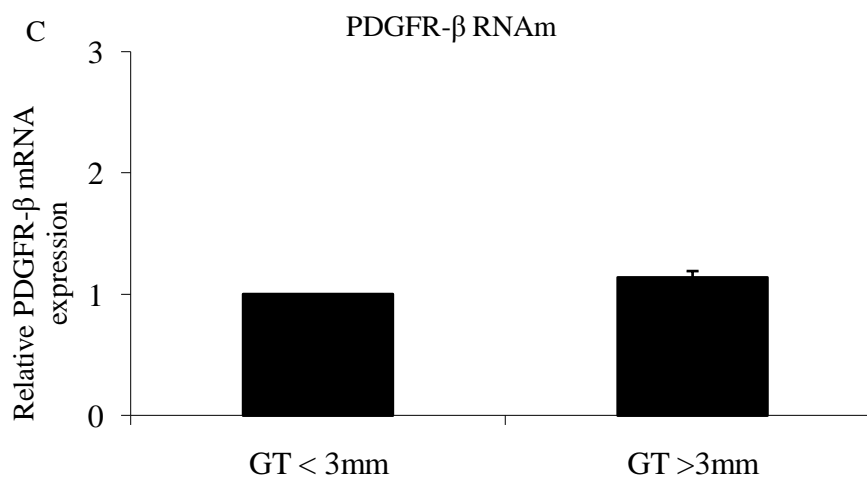
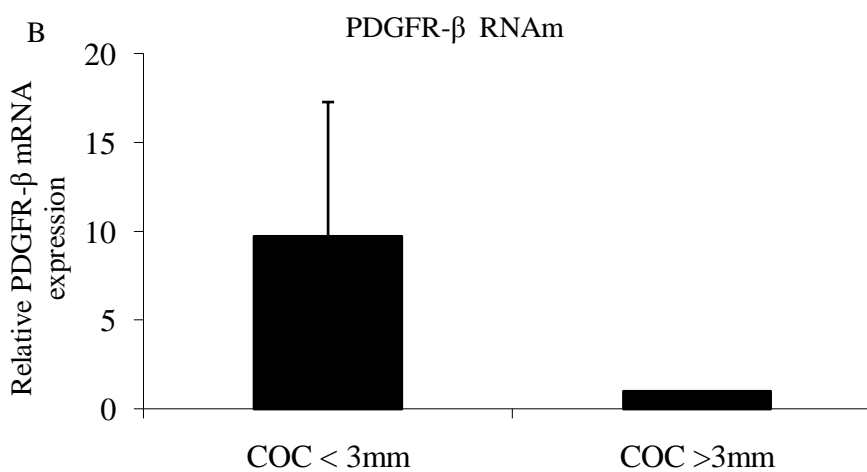
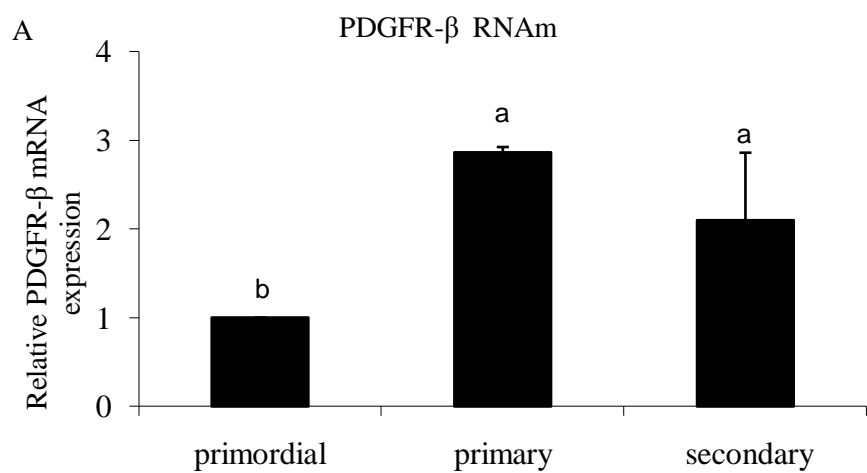


Figure 2. Steady-state levels of PDGFR- α mRNA in goat ovarian follicles. (A) Primordial, primary, and secondary follicles, (B) COCs from small and large antral follicles, (C) granulosa/theca cells from small and large antral follicles, (D) COCs and

granulosa/theca cells from small antral follicles, and (E) COCs and granulosa/theca cells from large antral follicles. ^{a, b}($P < 0.05$).



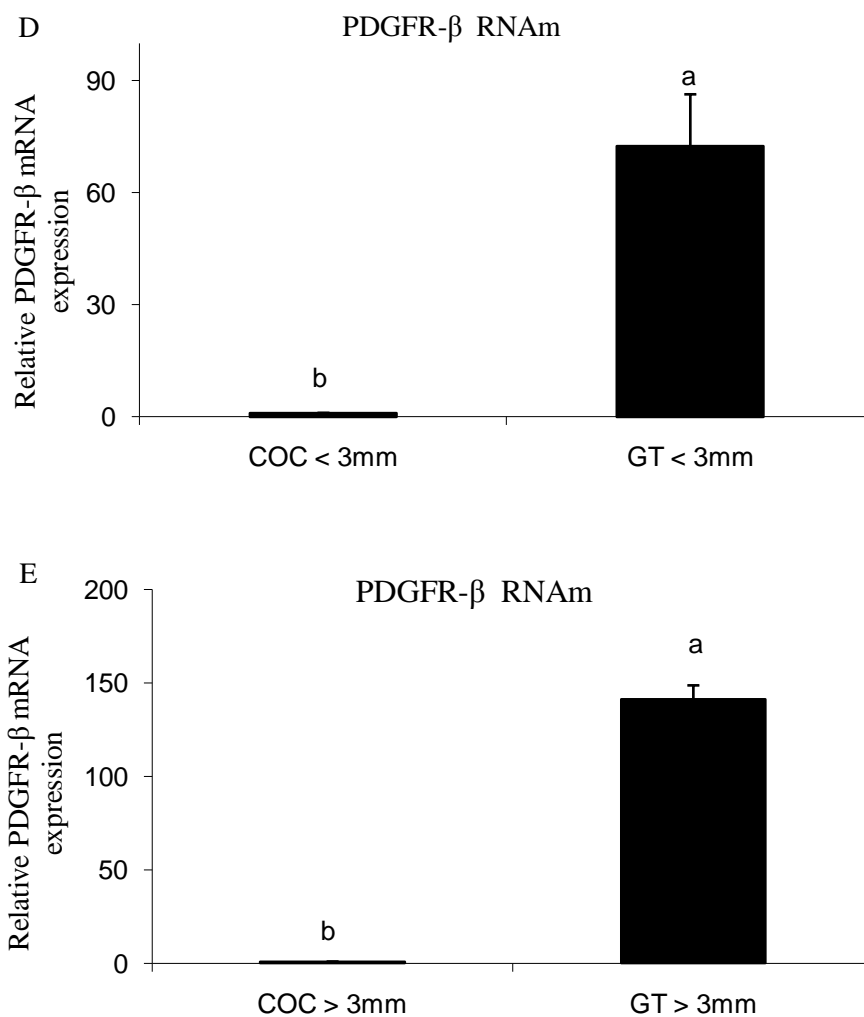


Figure 3. Steady-state level of PDGFR- β mRNA in goat ovarian follicles. (A) Primordial, primary, and secondary follicles, (B) COCs from small and large antral follicles, (C) granulosa/theca cells from small and large antral follicles, (D) COCs and granulosa/theca cells from small antral follicles, and (E) COCs and granulosa/theca cells from large antral follicles. ^{a, b} ($P < 0.05$).

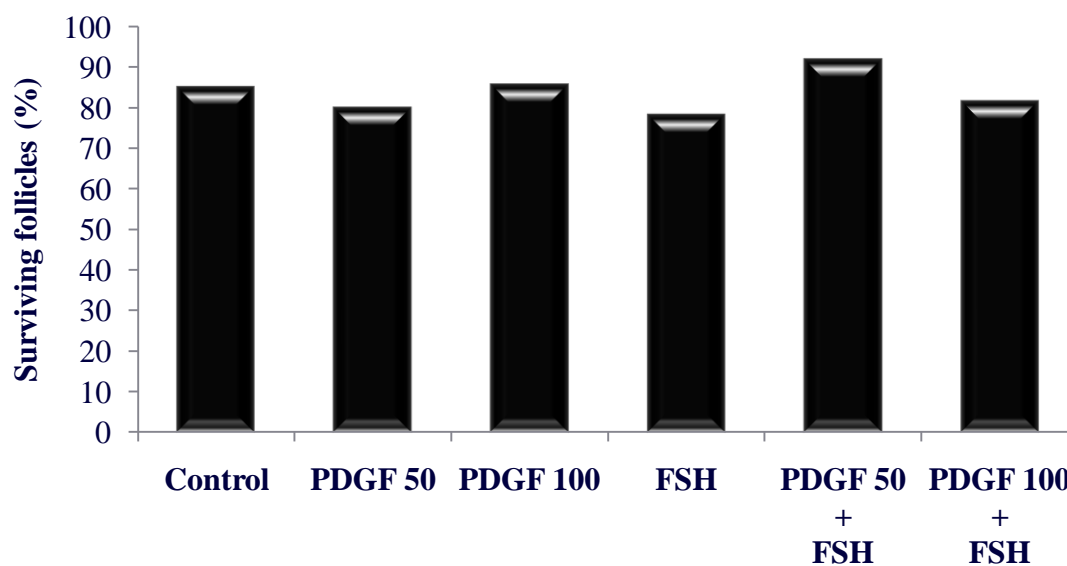


Figure 4. Percentage of surviving follicles after 18 days of *in vitro* culture with PDGF and/or FSH. There was no significant difference among treatments ($P>0.05$).

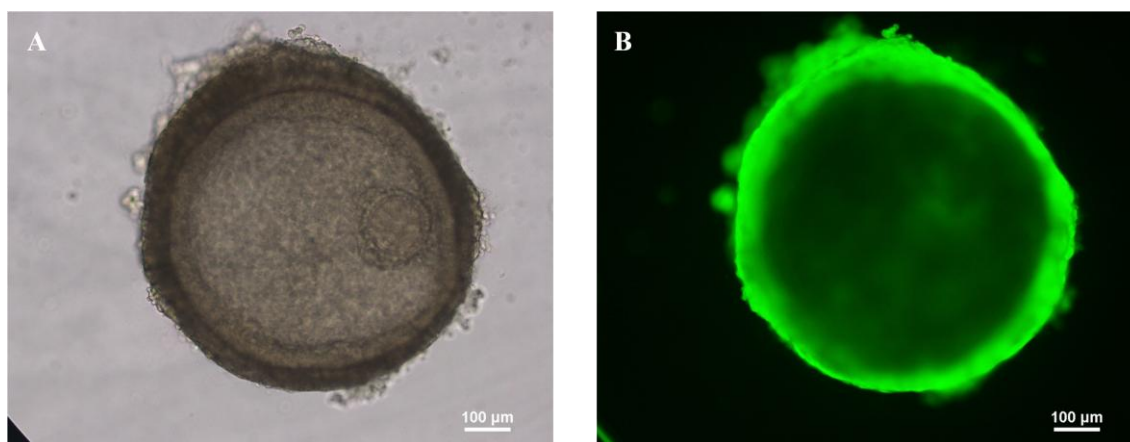


Figure 5. Analysis of goat follicle viability after 18 days of culture. (A) Morphologically normal follicle, visualized under a stereomicroscope; (B) Viable follicle labeled in green with calcein-AM, observed by fluorescence microscopy.

Table 1: Primer pairs used for real-time PCR analysis.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s) Anti-sense (as)	Position	Genbank accession n°
β- actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	s	188-211	GI:28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	as	363-386	
β-tubulin	TTCATTGGCAACAGCACAGCCA	s	1100-1121	GI: 114052730
	TCGTTTCATGTTGCTCTCAGCCT	as	1229-1250	
PDGFR-α	AGATTCCTTGGTCATCGTGGAGGA	s	35-59	GI:194318547
	TGACCGTGGCCTCACAGATATAGA	as	213-237	
PDGFR-β	ACATCATGCGGGACTCGAACTACA	s	2941-2965	GI:282721145
	AGATCTCCCAGAGCAAGATGCCAA	as	3081-3105	

s, sense; as, antisense

Table 2. Percentage of antrum formation during *in vitro* culture of caprine preantral follicles in different PDGF concentrations (50 ng/ml or 100 ng/ml) in the absence or presence of FSH.

Antrum formation (%)					
Treatments	n	Days of culture			
		Day 0	Day 6	Day 12	Day 18
Control	47	0.00	70.21b	89.36a	91.49a
PDGF 50	45	0.00	71.11b	95.56a	97.78a
PDGF 100	49	0.00	71.43b	95.92 α	97.96 $\alpha\alpha$
FSH	46	0.00	52.17c	76.09b	91.30a
PDGF 50 + FSH	49	0.00	42.86b*	93.88a \blacklozenge	97.96a
PDGF 100 + FSH	49	0.00	55.10b	83.67a β	89.80a β

*: differs significantly from the control ($P < 0.05$). a,b,c: indicates significant differences among days of culture into the same treatment ($P < 0.05$). \blacklozenge : differs significantly from FSH alone ($P < 0.05$). α , β : indicates significant differences between the same PDGF concentrations in the absence or presence of FSH ($P < 0.05$). There was no significant difference among the concentrations of PDGF in the absence or presence of FSH ($P > 0.05$).

Table 3. Diameter of caprine preantral follicles after *in vitro* culture for 18 days in different PDGF concentrations (50 ng/ml or 100 ng/ml) in the absence or presence of FSH.

Treatments	n	Follicular diameter (μm)			
		Days of culture			
		Day 0	Day 6	Day 12	Day 18
Control	47	222.47 \pm 38.67c	323.09 \pm 87.49b	425.01 \pm 103.62a	456.56 \pm 120.47a
PDGF 50	45	242.06 \pm 51.63b	357.26 \pm 95.80b	480.40 \pm 101.46a	506.09 \pm 115.66a β
PDGF 100	49	240.94 \pm 59.38c	384.11 \pm 102.04b*	502.19 \pm 122.59a*	521.14 \pm 131.01a
FSH	46	228.59 \pm 55.58d	330.30 \pm 105.21c	439.47 \pm 148.38b	521.82 \pm 159.45a
PDGF 50 + FSH	49	244.69 \pm 71.42c	374.32 \pm 106.41b	523.95 \pm 131.88a* \blacklozenge	575.74 \pm 152.38a α *
PDGF 100 + FSH	49	234.38 \pm 57.95c	354.85 \pm 95.88b	488.75 \pm 117.14a	539.54 \pm 140.23a*

*: differs significantly from the control ($P < 0.05$). a,b,c: indicates significant differences among days of culture into the same treatment ($P < 0.05$).

\blacklozenge : differs significantly from FSH alone ($P < 0.05$). α , β : indicates significant differences between the same PDGF concentrations in the absence or presence of FSH ($P < 0.05$). There was no significant difference among the concentrations of PDGF in the absence or presence of FSH ($P > 0.05$).

7 CONCLUSÕES

A presença de RNAm para PDGFR- α e β foi identificada em todas as categorias foliculares. Além disso, verificou-se que 50 ng/ml de PDGF associado ao FSH na forma sequencial estimula a formação de antro e o crescimento de folículos secundários caprinos cultivados *in vitro*.

8 PERSPECTIVAS

A aplicação da biotécnica de MOIFOPA, atualmente, permite demonstrar o papel de diversas substâncias envolvidas na foliculogênese ovariana. Os bons resultados obtidos neste trabalho utilizando PDGF associado ao FSH podem ser de grande valia para elaboração de meios de cultivo de base visando à obtenção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Entretanto, estudos adicionais sobre a influência da interação entre o PDGF e outras substâncias (hormônios e fatores de crescimento) que interferem no desenvolvimento folicular e atresia ainda são necessários para a compreensão da foliculogênese em caprinos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles- Clinical significance, progress and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*, v. 21, p. 887–898, 2006.

ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 121, p. 647-653, 2001.

ANDERSON, E.; LEE, G. Y. The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium. *Tissue and Cell*, v. 25, p. 49-72, 1993.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Gene & Development*, v. 22, p. 1276-1312, 2008.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-94, 2010.

ASSOIAN, R. K. Anchorage-dependent cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology*, v. 136, p 1-4, 1997.

BERGSTEN, E.; UUTELA, M.; LI, X.; PIETRAS, K.; ÖSTMAN, A.; HELDIN, C. H.; ALITALO, K.; ERIKSSON, U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nature Cell Biology*, v. 3, p. 512–516, 2001.

BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*, v. 361, p. 315–325, 1993.

BETSHOLTZ, C.; JOHNSON, A.; HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B.; LIND, P.; URDEA, M. S.; EDDY, R.; SHOWS, T. B.; PHILPOTT, K.; MELLOR, A. L.; KNOTT, T. J.; SCOTT, J. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature*, v. 320, p. 695–699, 1986.

BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; OLSON, M.A.; SANDLER, J.L.; DURRANT, B.S. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology*, v. 58, p. 1689-1703, 2002.

BOLAND, N. I.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; GOSDEN, R. G. Characterization of follicular energy metabolism. *Human Reproduction*, v. 9, p. 604-609, 1994.

BONTHRON, D.; COLLINS, T.; GRZESCHIK, K. H.; VAN ROY, N.; SPELEMAN, F. Platelet-derived growth factor A chain: confirmation of localization of PDGFA to chromosome 7p22 and description of an unusual minisatellite. *Genomics*, v. 13, p 257–263, 1992.

BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *Journal of Molecular Biology*, v. 231, p. 539–545, 1993.

BORTOLOTTO, E. B.; GONÇALVES, P. B. D.; NEVES, J. P.; COSTA, L. F. S.; MACIEL, M. N.; MONTAGNER, M. M.; FARIAS, A. M.; STRANIERI, P. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, p. 191-197, 2001.

BOSTRÖM, H.; WILLETTS, K.; PEKNY, M.; LEVÉEN, P.; LINDAHL, P.; HEDSTRAND, H.; PEKNA, M.; HELLSTRÖM, M.; GEBRE-MEDHIN, S.; SCHALLING, M.; NILSSON, M.; KURLAND, S.; TÖRNELL HEATH, J.K.; BETSHOLTZ, C. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*, v. 85, p. 863-873, 1996.

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

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Vasoactive intestinal peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after *in vitro* tissue culture. *Cells Tissues Organs*, v. 191, p. 414-421, 2010.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 43, p. 543-547, 1990.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, p. 23–39, 2002.

BUTCHER, L.; ULLMAN, S. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction Fertility and Development*, v. 8, p. 535-539, 1996.

CAO, R.; BRÄKENHJELM, E.; LI, X. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- α and β receptors. *FASEB Journal*, v. 16, p. 1575–83, 2002.

CARAMBULA, S. F.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; NEVES, J. P.; COSTA, L. S. F. Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. *Arq. Fac. Vet.*, v. 24, p. 235, 1996.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 93, p. 71–79, 1991.

CATTANEO, E.; PELLICCI, P. G. Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain. *TINS*, v. 21, p. 476-481, 1998.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 60, 594–601, 1999.

CELESTINO, J.J.H.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; ALMEIDA, A.P.; CUNHA, R.M.S. LIMA, L.F.; NAME, K.P.O. CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÃO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. *Molecular Reproduction & Development*, v. 77, p. 231-240, 2010.

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

CLAESSON-WELSH, L. Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 28, p. 373–385, 1996.

CLAESSON-WELSH, L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 32023-32026, 1994.

CLARK, E. A.; BRUGGE, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, v. 268, p. 233–239, 1995.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction Domestic Animal*, v. 36, p. 3-9, 2001.

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

DALLA-FAVERA, R.; GALLO, R. C.; GIALLONGO, A.; CROCE, C. M. Chromosomal localization of the human homolog (c-sis) of the simian sarcoma virus onc gene. *Science*, v. 218, p. 686–688, 1982.

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

DILIBERTO, P. A.; GORDON, G. W.; YU, C. L.; EARP, H. S.; HERMAN, B. Platelet-derived growth factor (PDGF) a receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF b receptor in Balb/c3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 11888–11897, 1992.

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

DULEBA, A. J.; SPACZYNSKI, R. Z.; ARICI, A.; CARBONE, R.; BEHRMAN, H. R. Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 546–550, 1999.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, v. 49, p. 917-932, 1998.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 197–207, 1996.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, v. 49, p. 415-422, 1997.

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

EPPIG, J. J.; TELFER, E. E. Isolation and culture of oocytes. *Methods Enzymol*, v. 225, p. 77-84, 1993.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: oxygen concentration. *Molecular Reproduction and Development*, v. 42, p. 447-456, 1995.

ERIKSSON, A.; SIEGBAHN, A.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H.; CLAESSION-WELSH, L. PDGF a- and b-receptors activate unique and common signal transduction pathways. *EMBO Journal*, v. 11, p. 543–550, 1992.

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

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. 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*. São Paulo: Roca, 2008. v2, p.303–327.

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

FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S.A.; SRSEN, V. Activation of bovine in baboon primordial follicular *in vitro*. *Theriogenology*, v. 49, p. 441-449, 1998.

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

FREDRIKSSON, L.; LI, H.; ERIKSSON, U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Review*, v. 15, p. 197– 204, 2004.

FRISCH, S. M.; RUOSLAHTI, E. Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 9, p. 701–706, 1997.

FRUTTIGER, M.; CALVER, A. R.; RICHARDSON, W. D. Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons. *Current Biology*, v.10, p. 1283–1286, 2000.

FRUTTIGER, M.; KARLSSON, L.; HALL, A. C.; ABRAMSSON, A.; CALVER, A. R.; BOSTRÖM, H.; WILLETTS, K.; BERTOLD, C. H.; HEATH, J. K.; BETSHOLTZ, C.; RICHARDSON, W. D. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development*, v. 126, p. 457-467, 1999.

GAULTIER, C. J.; MICHEL, J. B. Angiogenic growth factors. In: Levy B.I. & Tedgui A. (eds). *Biology of the arterial wall*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1999. pp.101-113.

GELDERLOOS, J. A.; ROSENKRANZ, S.; BAZENET, C.; KAZLAUSKAS, A. A role for Src in signal relay by the platelet-derived growth factor alpha receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 5908–5915, 1998.

GIGLI, I.; BYRD, D. D.; FORTUNE, J. E. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles. *Theriogenology*, v. 66, p. 344-353, 2006.

GNESSI, L.; BASCIANI, S.; MARIANI, S.; ARIZZI, M.; SPERA, G.; WANG, C.; BONDJERS, C.; KARLSSON, L.; BETSHOLTZ, C. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 149, p. 1019-1025, 2000.

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

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates-facts and hypothesis. *Endocrinology Review*, v. 17, p. 121-155, 1996.

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

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

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

HAMMACHER, A.; HELLMAN, U.; JOHNSON, A.; ÖSTMAN, A.; GUNNARSSON, K.; WESTERMARK, B.; WASTESON, A.; HELDIN, C. H. A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 16493-16498, 1988.

HAMMACHER, A.; NISTÉ, R. M.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H. A human glioma cell line secretes three structurally and functionally different dimeric forms of platelet-derived growth factor. *European Journal of Biochemistry*, v. 176, p. 179-186, 1988.

HARPER, K. M.; BRACKETT, B. G. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation *in vitro*. *Zygote*, v.1, p. 27-34, 1993.

HART, C. E.; BAILEY, M.; CURTIS, D. A.; OSBORN, S.; RAINES, E.; ROSS, R.; FORSTROM, J. W. Purification of PDGF-AB and PDGFBB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry*, v. 29, p. 166-172, 1990.

HART, I. K.; RICHARDSON, W. D.; HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B.; RAFF, M. C. PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte- type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Development*, v. 105, p. 595- 603, 1989.

HARTSHORNE, G. M. *In vitro* culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction*, v. 2, p. 94-104, 1997.

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA, K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, v. 86, p. 1182-1192, 2006.

HELDIN, C. H.; ÖSTMAN, A.; ERIKSSON, A.; SIEGBAHN, A.; CLAESSION-WELSH, L.; WESTERMARK, B. Platelet-derived growth factor: Isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. *Kidney International*, v. 41, p. 571—574, 1992.

HELDIN, C. H.; ÖSTMAN, A.; RONNSTRAND, L. Signal transduction via platelet derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1378, p. 79-113, 1998.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, v. 79, p. 1283–1316, 1999.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B. *Role of platelet-derived growth factor in vivo* (2nd ed.), edited by Clark R.A.F. New York: Plenum, 1996. pp.249–273.

HELDIN, P.; PERTOFT, H.; NORDLINDER, H.; HELDIN, C. H.; LAURENT, T. C. Differential expression of platelet-derived growth factor a- and b-receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver. *Experimental Cell Research*, v. 193, p. 364–369, 1991.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, p. 333–339, 1994.

HOCH, R. V.; SORIANO, P. Roles of PDGF in animal development. *Development*, v. 130, p. 4769-4784, 2003.

HOOSHMAND-RAD, R.; YOKOTE, K.; HELDIN, C. H.; CLAESSION-WELSH, L. PDGF alpha-receptor mediated cellular responses are not dependent on Src family kinases in endothelial cells. *Journal of Cell Science*, v. 111, p. 607–614, 1998.

HOPPE, J.; WEICH, H. A.; EICHNER, W.; TATJE, D. Preparation of biologically active platelet-derived growth factor isoforms AA and AB. Preferential formation of AB heterodimers. *European Journal of Biochemistry*, v. 187, p. 207–214, 1990.

HOSSAIN, M. Z.; AO, P.; BOYNTON, A. L. Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor. *Journal of Cell Physiology*, v. 174, p. 66–77, 1998.

HU, Y.; BETZENDAHL, I.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; EICHENLAUB-RITTER, U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Human Reproduction*, v. 16, p. 737–748, 2001.

HUGHES, A. D.; CLUNN, G. F.; REFSON, J.; DEMOLIOU-MASON, C. Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *General Pharmacology*, v. 27, p. 1079-1089, 1996.

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

HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 421–433, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. v.48, p.62.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1099-1105, 2002.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology*, v. 49, p. 1567–1577, 1998.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. *Animal Reproduction Science*, v. 44, p. 183-193, 1995.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v. 39, p. 527-535, 1993.

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

JOHANSSON, A.; HELDIN, C. H.; WASTESON, A.; WESTERMARK, B.; DEUEL, T. F.; HUANG, J. S.; SEEBURG, P. H.; GRAY, A.; ULLRICH, A.; SCRACE, G.; STROOBANT, P.; WATERFIELD, M. D. The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO Journal*, v. 3, p. 921–928, 1984.

JOLY, M.; KAZLAUSKAS, A.; FAY, F. S.; CORVERA, S. Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI-3 kinase binding sites. *Science*, v. 263, p. 684–687, 1994.

JUNGTÄUBL, H.; PEUS, D.; WLASCHEK, M.; KIRCHBERG, K.; MEYER-INGOLD, W.; PLEWING, G.; SCHARFLETTER-KOCHANNEK, K. The integrated response of human dermal fibroblasts to different cytokine combinations. *Archives Dermatological Research*, v. 286, p. 262-263, 1994.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L.; FARSKY, S. H.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 39836-39842, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. Oitava edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 332p, 2005.

KAMAT, A.; CARPENTER, G. Phospholipase C-g1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine Growth Factor Review*, v. 8, p. 109-117, 1997.

KAPUS, A.; GRINSTEIN, S.; WASAN, S.; KANDASAMY, R.; ORLOWSKI, J. Functional characterization of three isoforms of the Na⁺/H⁺ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 23544-23552, 1994.

KARLSSON, L.; BONDJERS, C.; BETSHOLTZ, C. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development*, v. 126, p. 2611-2621, 1999.

KARLSSON, L.; LINDAHL, P.; HEATH, J. K.; BETSHOLTZ, C. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR- α deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development*, v. 127, p. 3457-3466, 2000.

KELLY, J. D.; HALDEMAN, B. A.; GRANT, F. J.; MURRAY, M. J.; SEIFERT, R. A.; BOWEN-POPE, D. F.; COOPER, J. A.; KAZLAUSKAS, A. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 8987-8992, 1991.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, v. 123, p. 613, 2002.

KIM, D. H.; SEONG, H. H.; LEE, H. J. *In vitro* culture conditions for the mouse preantral follicles isolated by enzyme treatment. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 21, p. 532-537, 2008.

KNECHT, M.; CATT, K. J. Modulation of cAMP mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Biological Chemistry*, v. 258, p. 2789-2794, 1983.

KOHLER, N.; LIPTON, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental Cell Research*, v. 87, p. 297-301, 1974.

KOYAMA, H.; NISHIZAWA, Y.; HOSOI, M.; FUKUMOTO, S.; KOGAWA, K.; SHIOI, A.; MORII, H. The fumagillin analogue TNP- 470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I: possible involvement of cyclin-dependent kinase 2. *Circulation Research*, v. 79, p. 757-764, 1996.

KYPTA, R. M.; GOLDBERG, Y.; ULUG, E. T.; COURTNEIDGE, S. A. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell*, v. 62, p. 481-492, 1990.

LANE, M.; BALTZ, J. M.; BAVISTER, B. D. Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen (Na⁺/H⁺) antiporter. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1483-1490, 1998.

LAROCHELLE, W. J.; MAY-SIROFF, M.; ROBBINS, K. C.; AARONSON, S. A. A novel mechanism regulating growth factor association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain. *Genes & Development*, v. 5, p. 1191-1199, 1991.

LEE, V. H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 401-408, 2000.

LEI, H.; KAZLAUSKAS, A. Focus on molecules: platelet-derived growth factor C, PDGF-C. *Experimental Eye Research*, v. 86, p. 711-712, 2008.

LENIE, S.; CORTVRINDT, R.; ADRIAENSSENS.; SMITZ, J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1730-1738, 2004.

LEVÉEN, P.; PEKNY, M.; GEBRE-MEDHIN, S.; SWOLIN, B.; LARSSON, E.; BETSHOLTZ, C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes & Development*, v. 8, p. 1875-1887, 1994.

LI, X.; ERIKSSON, U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 14, p. 91-98, 2003.

LI, X.; PONTÉN, A.; AASE, K.; KARLSSON, L.; ABRAMSSON, A.; UUTELA, M.; BÄCKSTRÖM, G.; HELLSTRÖM, M.; BOSTRÖM, H.; LI, H.; SORIANO, P.; BETSHOLTZ, C.; HELDIN, C. H.; ALITALO, K.; ÖSTMAN, A.; ERIKSSON, U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF α -receptor. *Nature Cell Biology*, v. 2, p. 302-309, 2000.

LOPATA, A.; OLIVA, K. Chorionic gonadotrophin secretion by human blastocysts. *Human Reproduction*, v. 8, p. 932-938, 1993.

LOWENSTEIN, E.; MOHAMMADI, M.; MARGOLIS, B.; SCHLESSINGER, J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathway. *Science*, v. 260, p. 1953-1955, 1993.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 39–49, 1999.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone, *Theriogenology*, *in press*, 2010. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.004

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C. H.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v. 123, p. 23-30, 2002.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 15, p. 173–182, 2007

MATOSKOVA, B.; RORSMAN, F.; SVENSSON, V.; BETSHOLTZ, C. Alternative splicing of the platelet-derived growth factor A-chain transcript occurs in normal as well as tumor cells and is conserved among mammalian species. *Molecular and Cellular Biology*, v. 9, p. 3148, 1989.

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

MAY, J. V.; FROST, J. P.; BRIDGE A. J. Regulation of granulosa cell proliferation: facilitative roles of platelet-derived growth factor and low density lipoprotein. *Endocrinology*, v. 126, p. 2896-2905, 1990.

MCDONALD, J. A.; PINHEIRO, E. M.; MONTELL, D. J. PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development*, v. 130, p. 3469–78, 2003.

MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, v. 21, p. 200-214, 2000.

MCWILLIAM, R.; LEAKE, R. E.; COUTTS J. R. Growth factors in human ovarian follicle fluid and growth factor receptors in granulosa-luteal cells. *International Journal of Biological Markers*, v. 10, p. 216-20, 1995.

MEYER-INGOLD, W.; EICHNER, W. Platelet-derived growth factor. *Cell Biology International*, v. 19, p. 389-398, 1995.

MICHEL, U.; LIIDEMANN, S.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Effects of growth factors and hormones on basal and FSH-stimulated inhibin production by porcine granulosa cells *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 3, p. 201-13, 1991.

MONDSCHHEIN, J. S.; SCHOMBERG, D. W. Effects of partially and more highly purified platelet-derived growth factor preparations on luteinising hormone receptor induction in granulosa cell cultures. *Biology of Reproduction*, v. 30, p. 603-608, 1984.

MONDSCHHEIN, J. S.; SCHOMBERG, D. W. Platelet-derived growth factor enhances granulosa cell luteinizing hormone receptor induction by follicle-stimulating hormone and serum. *Endocrinology*, v. 109, p. 325-327, 1981.

MORI, S.; RÖNNSTRAND, L.; CLAEISSON-WELSH, L.; HELDIN, C. H. A tyrosine residue in the juxtamembrane segment of the platelet-derived growth factor b-receptor is critical for ligand-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 4917-4921, 1994.

MURRAY, A. A.; MOLINEK, M. D.; BAKER, S. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F.; HILLIER, S. G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction*, v. 121, p. 89-96, 2001.

MURUVI, W.; PICTON, H. M.; RODWAY, R. G.; JOYCE, I. M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology*, v. 64, p. 1357-1370, 2005.

NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; SALES, A.; VIANA, J. H. M. Correlação morfológica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 40, p. 126-132, 2003.

NAYUDU, P. L.; OSBORN, S. M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 95, p. 349-362, 1992.

NILSSON, E. E.; DETZEL, C.; SKINNER, M. K. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, v. 131, p. 1007-1015, 2006.

NISTER, M.; HAMMACHER, A.; MELLSTROM, K.; SIEOBACHN, A.; RÖNNSTRAND, L.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H. A gliomaderived PDGF A chain homodimer has different functional activities than a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell*, v. 52, p. 791-799, 1988.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles – a preliminary study. *Theriogenology*, v. 39, p. 811–821, 1993.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1682-1686, 2003.

OKAMURA, Y.; MYOUMOTO, A.; MANABE, N.; TANAKA, N.; OKAMURA, H.; FUKUMOTO, M. Protein tyrosine kinase expression in the porcine ovary. *Molecular Human Reproduction*, v. 7, p. 723–729, 2001.

OKTAY, 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, p. 3748–3751, 1997.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The ovary: Anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1127, p. 1–9, 2008.

OMURA, T.; HELDIN, C. H.; ÖSTMAN, A. Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 12676–12682, 1997.

ÖSTMAN A., ANDERSSON M., BETSHOLTZ C., WESTERMARK B. & HELDIN C.H. Identification of a cell retention signal in the B-chain of platelet-derived growth factor and in the long splice version of the A-chain. *Cell Regulation*, v. 2, p. 503–512, 1991.

ÖSTMAN, A.; THYBERG, J.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H. PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *Journal of Cell Biology*, v. 118, p. 509–519, 1992.

PARROTT, J. A.; SKINNER M. K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Molecular Reproduction and Development*, v. 55, p. 55-64, 2000.

PARROTT, J. A.; SKINNER M. K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v. 140, p. 4262–4271, 1999.

PENG, X.; YANG, M.; WANG, L.; TONG, C.; GUO, Z. *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 27, p. 247-57, 2010.

PESTY, A.; MIYARA, F.; DEBEY, P.; LEFEVRE, B.; POIROT, C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth *in vitro*. *Molecular Human Reproduction*, v. 13, p. 3–9, 2007.

PFEILSCHIFTER, J.; KREMPIEN, R.; NAUMANN, A.; GRONWALD, R. G.; HOPPE, J.; ZIEGLER, R. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology*, v. 130, p. 2059-2066, 1992.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, p. 703–715, 2008.

PIETROWSKI, D.; KECK, C. Differential regulation of ANG2 and VEGF-A in human granulosa lutein cells by choriogonadotropin. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 112, p. 208–214, 2004.

PINEDA, M. H. Female reproductive system. In: McDonanld L.E. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp.303-354, 1989.

PINKAS, H.; FISCH, B.; ROZANSKY, G.; FELZ, C.; KESSLER-ICEKSON, G.; KRISSE, H.; NITKE, S.; AO, A.; ABIR, R. Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their receptors in human fetal and adult ovaries. *Molecular Human Reproduction*, v. 14, p. 199–206, 2008.

RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D. F.; ROSS, R. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR. IN: SPORN M.B. & ROBERTS A.B. *Handbook of experimental pharmacology. Peptide growth factors and their receptors*. Heidelberg: Springer-Verlag, pp.173–262, 1990.

RAJARAJAN, K.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; RAO, V. H. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 204–212, 2006.

RAPPOLEE, D. A.; BREENER, C. A.; SCHULTZ, R.; MARK, D.; WERB, Z. Developmental expression of PDGF, TGF- α , and TGF- β genes in preimplantation mouse embryos. *Science*, v. 241, p. 1823-1825, 1988.

REIGSTAD, L. J.; VARHAUG, J. E.; LILLEHAUG, J. R. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS Journal*, v. 272, p. 5723-5741, 2005.

REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; DRIANCOURT, M. A. Effects of kit ligand and anti-kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 56, p. 483–494, 2000.

ROBBINS, K. C.; LEAL, F.; PIERCE, J. H.; AARONSON, S. A. The v-sis/PDGF-2 transforming gene product localizes to cell membranes but is not a secretory protein. *EMBO Journal*, v. 4, p. 1783-1792, 1985.

RORSMAN, F.; LEVEEN, P.; BETSHOLTZ, C. Characterization of the mouse PDGF A-chain gene. Evolutionary conservation of gene structure, Nucleotide Sequence and Alternative Splicing. *Growth Factors*, v. 6, p. 303-313, 1992.

ROSS, R.; GLOMSETT, J.; KARIYA, B.; HARKER, L. A. Platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial muscle cells *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 71, p. 1207-1210, 1974.

ROSS, R.; RAINES, E.; BOWEN-POPE, D. Growth factors from platelets, monocytes, and endothelium: their role in cell proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 397, p. 18-24, 1982.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA, M. V.; MARTINS, F.S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 37, p. 112-23, 2009.

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

RUBIN, K.; TINGSTRO, A. M.; HANSSON, G. K.; LARSSON, E.; RONNSTRAND, L.; KLARESKOG, L.; CLAEISSON-WELSH, L.; HELDIN, C. H.; FELLSTRO, B. M.; TERRACIO, L. Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet*, v. 1, p. 1353-1356, 1988.

SALEHI, P.; SPRATLIN, J.; CHONG, T. F.; CHUCHILL, T. A. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. *Cryobiology*, v. 48, p. 245-253, 2004.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 644-645, 2002.

SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote in press*, 2010. doi: 10.1017/S0967199410000511.

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reproductive Science*, *in press*, 2010. doi: 10.1177/1933719110379269.

SCHMAHL, J.; RIZZOLO, K.; SORIANO, P. The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages. *Genes & Development*, v. 22, p. 3255-3267, 2008.

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

SHORES, E. M.; HUNTER, M. G. The influence of blood cells and PDGF on porcine theca cell function *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v. 64, p. 247– 258, 2000.

SIEGBAHN, A.; HAMMACHER, A.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H. Differential effects of the various isoforms of platelet derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *Journal of Clinical Investigation*, v. 85, p. 916–920, 1990.

SIEGFRIED, G.; KHATIB, A. M.; BENJANNET, S.; CHRETIEN, M.; SEIDAH, N. G. The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR(86) by members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity. *Cancer Research*, v. 63, p. 1458–1463, 2003.

SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L. R.; PINTO, L. C. ; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Animal Reproduction Science*, v. 117, p. 83–89, 2010.

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, v. 81, p. 273-286, 2004a.

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

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

SKOLNIK, E. Y.; BATZER, A.; LI, N.; LEE, C. H.; LOWESTEIN, E.; MOHAMMADI, M.; MARGOLIS, B.; SCHLESSINGER, J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*, v. 260, p. 1953-1955, 1993.

SLEER, L. S.; TAYLOR, C. C. Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biology of Reproduction*, v. 76, p. 379-390, 2007a.

SLEER, L. S.; TAYLOR, C. C. Platelet-derived growth factors and receptors in the rat corpus luteum: localization and identification of an effect on luteogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 76, p. 391-400, 2007b.

SMITS, A.; HERMANSON, M.; NISTE, M. R.; KARNUSHINA, I.; HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B.; FUNA, K. Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth Factors*, v. 2, p. 1-8, 1989.

SORIANO, P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF b-receptor mutant mice. *Genes & Development*, v. 8, p. 1888-1896, 1994.

SORIANO, P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development*, v. 124, p. 2691-2700, 1997.

SORKIN, A.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C. H.; CLAESSEON-WELSH, L. Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF b-receptor. *Journal of Cell Biology*, v. 112, p. 469-478, 1991.

STROOBANT, P.; WATERFIELD, M. D. Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. *EMBO Journal*, v. 3, p. 2963-2967, 1984.

SWAN, D. C.; MCBRIDE, O. W.; ROBBINS, K. C.; KEITHLEY, D. A.; REDDY, E. P.; AARONSON, S. A. Chromosomal mapping of the simian sarcoma virus oncogene analogue in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 79, p. 4691-4695, 1982.

TAYLOR, C. C. Platelet-derived growth factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and ras-extracellular signal-regulated kinase-1/2 kinase signaling pathways via the platelet-derived growth factor-beta receptor. *Endocrinology*, v. 141, p. 1545-1553, 2000.

TELFER, E. E. *In vitro* models for oocyte development. *Theriogenology*, v. 49, p. 451-460, 1998.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, v. 23, p. 1151–1158, 2008.

TELFER, E. E.; WEBB, R.; MOOR, R. M.; GOSDEN, R. G. New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. *Animal Science*, v. 68, p. 285-298, 1999.

TWAMLEY-STEIN, G. M.; PEPPERKOK, R.; ANSORGE, W.; COURTNEIDGE, S. A. The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 90, p. 7696-7700, 1993.

UUTELA, M.; LAUREN, J.; BERGSTEN, E.; LI, X.; HORELLI-KUITUNEN, N.; ERIKSSON, U.; ALITALO, K. Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC genes. *Circulation*, v. 103, p. 2242–2247, 2001.

VALGEIRSDÓTTIR, S.; PAUKKU, K.; SILVENNOINEN, O.; HELDIN, C. H.; CLAEISSON-WELSH, L. Activation of Stat5 by platelet-derived growth factor (PDGF) is dependent on phosphorylation sites in PDGF b-receptor juxtamembrane and kinase insert domains. *Oncogene*, v. 16, p. 505–515, 1998.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VAN TOL, H. T. A.; VAN EIJK, M. J. Y.; MUMMERY, C. L.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrane granulosa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 45, p. 218-24, 1996.

VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S. J.; PANAYOTOU, G.; WATERFIELD, M. D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Science*, v. 22, p. 267–272, 1997.

VASSBOTN, F. S.; HAVNEN, O. K.; HELDIN, C. H.; HOLMSEN, H. Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor α -receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 13874–13879, 1994.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 45, p. 817-832, 1996a.

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

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

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement*, v. 61, p. 71-90, 2003.

WEST, E. R.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials*, v. 28, p. 4439–4448, 2007.

WITTE, L. D.; KAPLAN, K. L.; NOSSEL, H. L.; LAGES, B. A.; WEISS, H. J.; GOODMAN, D. S. Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells. *Circulation Research*, v. 42, p. 402-409, 1978.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 375–381, 2001.

WU, Y. T.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X. E.; XU, J.; ZHU, X. M.; LUO, Q.; HUANG H. F. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Human Reproduction*, v. 22, p. 1526-1531, 2007.

XU, M.; WEST, E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Identification of a stage specific permissive *in vitro* culture environment for follicle growth and oocyte development. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 916–923, 2006.

YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 51985–51988, 2003.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 924-932, 2006.

YAO, R.; COOPER, G. M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, v. 267, p. 2003–2006, 1995.

YE, J.; COLEMAN, J.; HUNTER, M. G.; CRAIGON, J.; CAMPBELL, K. H.; LUCK, M. R. Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and developmental potential of pig oocytes *in vitro*. *Reproduction*, v. 133, p. 877–886, 2007.

YOKOTE, K.; MORI, S.; SIEGBAHN, A.; RÖNNSTRAND, L.; WERNSTEDT, C.; HELDIN, C. H.; CLAESSON-WELSH, L. Structural determinants in the platelet-derived growth factor α -receptor implicated in modulation of chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 5101–5111, 1996.

YOON, S. J.; KIM, K. H.; CHUNG, H. M.; CHOI, D. H.; LEE, W. S.; CHA, K. Y.; LEE, K. A. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fertility and Sterility*, v. 85, p. 193–203, 2006.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, v. 184, p. 122–37, 1997.

YOUNG, R. M.; MENDONZA, A. E.; COLLINS, T.; ORKIN, S. H. Alternatively spliced platelet-derived growth factor A-chain transcripts are not tumor specific but encode normal cellular proteins. *Molecular and Cellular Biology*, v. 10, p. 6051–6054, 1990.

YU, J. C.; HEIDARAN, M. A.; PIERCE, J. H.; GUTKIND, J. S.; LOMBARDI, D.; RUGGIERO, M.; AARONSON, S. A. Tyrosine mutations within the α platelet-derived growth factor receptor kinase insert domain abrogate receptor-associated phosphatidylinositol-3 kinase activity without affecting mitogenic or chemotactic signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*, v. 11, p. 3780–3785, 1991.

YU, J. C.; MAHADEVAN, D.; LAROCHELLE, W. J.; PIERCE, J. H.; HEIDARAN, M. A. Structural coincidence of α -PDGFR epitopes binding to platelet-derived growth factor-AA and a potent neutralizing monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 10668–10674, 1994.

ZAMORANO, P. L.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. *Neuroendocrinology*, v. 63, p. 397–407, 1996.

ZHANG, P.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; HREINSSON, J.; TELFER, E. E.; HOVATTA, O. *In vitro* effect of cyclic adenosine 30,50-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 21, p. 310–306, 2004.

ZHAO, J. Development of rat preantral follicles. PhD thesis, Utrecht University, The Netherlands, 2000.

ZHAO, Y.; CHAUVET, P. J.; ALPER, S. L.; BALTZ, J. M. Expression and function of bicarbonate/chloride exchangers in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 24428–24434, 1995.

ZWERNER, J. P.; MAY, W. A. PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene*, v. 20, p. 626–33, 2001.

ANEXO A

Artigo publicado no periodico Acta Scientiae Veterinariae

Disponível em <http://www.ufrgs.br/actavet/>

Caracterização estrutural e papel do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na foliculogênese ovariana

Structural Characterization and Role of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Ovarian Folliculogenesis

Ivina Rocha Brito¹, Isadora Machado Teixeira Lima¹, Márcia Viviane Alves Saraiva¹, José Roberto Viana Silva², Ana Paula Ribeiro Rodrigues¹ & José Ricardo de Figueiredo¹

ABSTRACT

Background: The platelet-derived growth factor (PDGF) is expressed in a wide variety of cell types, exerts a potent mitogenic role and acts on the growth, differentiation and cell chemotaxis. Studies have shown that during folliculogenesis, PDGF and their receptors are expressed in oocytes, granulosa cells and thecal cells of ovarian follicles at different developmental stages in several species. Although exist many information about its expression sites, as well as about its action in different cells types, the role of PDGF on ovarian folliculogenesis remains understudied. Thus, this article aims to review issues related to PDGF, suggesting the involvement of this mitogenic factor during follicular development.

Review: Along this work, it was shown aspects related to structural characterization of PDGF and its receptors, as well as PDGF expression in different cells types, emphasizing its importance to follicular development. PDGF family is composed by four polypeptide chains (each encoded by a different gene), which are synthesized in the form of inactive pro-proteins. After a proteolytic processing, these chains undergo homo or heterodimerization, resulting in five isoforms (PDGF-AA, -BB, -AB, -CC e -DD). The cellular effects of these different PDGF isoforms are mediated by binding, with different specificities, to three transmembrane receptors isoforms of type tyrosine kinase generated by the association of subunits α e β (PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$, - $\beta\beta$). PDGF was initially purified from platelets, being later verified its production by many varieties of cell types. It acts as an important mitogenic factor, especially to cells of mesenchymal origin as fibroblasts and smooth muscle cells, and also exerts a role on cellular migration and survival. Studies with PDGF and its receptors have demonstrated its importance as a paracrine growth factor for normal embryo development and angiogenesis. Although the action of this growth factor has been shown in several cellular responses, its role in ovarian folliculogenesis of mammals is understudied. Folliculogenesis, event initiated at pre-natal life in most species, can be defined as the process of follicular formation, growth and maturation, beginning with the primordial follicle formation and resulting in preovulatory stage. Until the present moment, the different PDGF types and their receptors were detected in ovarian follicles of murines, rodents, swines and humans according to developmental stage. Evidences suggest that this growth factor may acts as a potent regulator of ovarian function, increasing DNA synthesis in granulosa cells and stimulating theca cells growth in swines. In addition, PDGF has shown benefic effects in *in vitro* maturation of bovine oocytes when associated with follicle stimulating hormone (FSH).

Conclusion: Nevertheless, the specific actions of PDGF on ovarian follicles development have not been described due to lack of data available in the literature about this subject. Therefore, this review was performed to clarify the involvement of this growth factor in the regulation of ovarian function in mammals. However, it is necessary to perform additional studies that may provide a greater understanding about the importance of PDGF during folliculogenesis.

Keywords: PDGF, folliculogenesis, mammalian, platelet, fator de crescimento, atructural characterization.

Descritores: PDGF, foliculogênese, mamíferos, plaquetas, growth factor, caracterização estrutural.