



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ROBERTA NOGUEIRA CHAVES**

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO (NGF), FATOR DE  
CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 (FGF-10) E INSULINA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS  
CAPRINOS**

**FORTALEZA**

**2011**

**ROBERTA NOGUEIRA CHAVES**

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO (NGF), FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 (FGF-10) E INSULINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor 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**

**2011**

C512e

Chaves, Roberta Nogueira

Efeito do Fator de Crescimento do Nervo (NGF), Fator de Crescimento de Fibroblasto-10 (FGF-10) e insulina sobre o desenvolvimento in vitro de folículo pré-antrais caprinos. / Roberta Nogueira Chaves. – Fortaleza, 2011.

391 p.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Tavares de Matos  
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes

1. NGF. 2. FGF-10. 3. Insulina. 4. Ovário. 5. Cabra I.  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.089

**ROBERTA NOGUEIRA CHAVES**

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO (NGF), FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO-10 (FGF-10) E INSULINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 05 / 12 / 2011

Nota: 10,0

Conceito obtido: Satisfatório e aprovada com louvor

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo  
Universidade Estadual do Ceará  
Orientador

---

Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos  
Universidade Federal do Vale do São Francisco  
Coorientadora/Examinadora

---

Profa. Dra. Juliana Jales de Hollanda Celestino  
Universidade da Integração Internacional da  
Lusofonia Afro-Brasileira  
Examinadora

---

Prof. Dr. Ciro Moraes Barros  
Universidade Estadual Paulista - Botucatu  
Examinador

Dedico,

Ao meu filho Matheus Nogueira Lima,  
que entendeu precocemente que a distância  
física pode ser superada pelo amor de uma mãe que  
aprendeu a orar com ele e busca incessantemente ser-lhe exemplo.

Ao meu esposo, Kenio Patricio Lima de Oliveira,  
mais um presente da espiritualidade para a minha vida.  
Nessas horas, sabemos que o bem que aqui fazemos,  
retorna sob a forma de alguém que amamos.

Aos meus pais, meus grandes amigos e minha família,  
por todo amor e palavras de estímulo que sempre me  
acompanharam nesta trajetória de vida repleta de aprendizados.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), à Faculdade de Veterinária (FAVET) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), em seus professores e funcionários, que juntos somam 11 anos colaborando com a minha formação profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE, por todo o suporte oferecido para realização dessa tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), muito obrigada por todo o apoio financeiro, inclusive concedido na forma de bolsa de estudo.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo suporte financeiro.

A Deus, por tornar tudo isso possível e por me mostrar através de coisas simples o Seu amor e cuidado comigo, por me abençoar em todos os dias de minha vida. E pela oportunidade de evolução.

À família que me gerou, por todo apoio, carinho e amor, especialmente à minha mãe Eurinice Nogueira Chaves e meu pai Francisco Araújo Chaves, por me ajudarem pacientemente, inclusive cuidando do meu filho nos momentos mais intensos da tese.

À família que eu gerei, onde estão inseridos os homens da minha vida: meu esposo Kenio Patricio Lima de Oliveira, com quem decidi dividir todos os momentos dessa existência e que em troca me retribui com muito amor, carinho, companheirismo e compreensão, sempre me apoiando e incentivando; e ao meu filho maravilhoso, Matheus Nogueira Chaves, por toda experiência, amadurecimento e companhia doados desde o ventre e que se propagam até hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, por compartilhar comigo seu tema de pesquisa, sendo um interlocutor disposto a oferecer estímulos, ouvir com interesse todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. E pela compreensão silenciosa dos momentos pessoais pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

Às minhas coorientadoras, Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos e Profa. Dra. Sônia Nair Bão pelo exemplo de profissional e competência, bem como por todo o acompanhamento durante todas as fases do meu doutorado e sempre me auxiliando quando eu precisei.

A Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, pela garra que demonstra diariamente para a aquisição de recursos e na organização do laboratório, além do exemplo de retidão profissional.

À Dra. Liliam Mara Trevisan Tavares, pelo carinho, amizade e incentivo inicial ao trabalho com maturação e fecundação *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Claudio Cabral Campello, por todo o apoio fornecido na elaboração dos artigos, mas acima de tudo por seu exemplo, silencioso, de humildade e caridade com o próximo.

Ao Prof. Dr. José Buratini Jr, pela disponibilidade em ajudar e orientar sempre que foi necessário, além de aceitar participar de três capítulos dessa tese.

Aos membros da banca examinadora, em especial ao Dr. Marcelo Bertolini, Dr. Ciro Moraes Barros e Dr. José Ferreira Nunes, por terem aceitado o convite e por colaborarem com o enriquecimento desse trabalho.

Aos doutores e amigos da velha guarda, Fabrício Sousa Martins, Claudio Afonso Pinho Lopes, Isabel Bezerra Lima-Verde, Juliana Jales de Hollanda Celestino, Jamily Bezerra Bruno e Márcia Viviane Alves Saraiva, por todos os momentos divertidos que passamos juntos, os quais funcionaram como um bálsamo frente às dificuldades do doutorado. Muito obrigada pela amizade!

À minha amiga, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves, que me ensinou e ensina até hoje como alguém pode gostar incondicionalmente de uma pessoa tão diferente e cheia de defeitos como eu. É muito bom poder acompanhar sua trajetória e ver, com orgulho de mãe, que para você o céu é o limite.

Às companheiras do grupo conhecido como “quarteto fantástico”, Dra. Ana Beatriz Graça Duarte, Valdevane Rocha Araújo e Gerlane Modesto Luz, pelos momentos inusitados, pelos testes desenvolvidos e pela alegria do convívio. Em especial, à minha amiga Ana Beatriz Graça Duarte, por tantos anos de convívio, pela experiência da maternidade que compartilhamos e por saber que posso contar com você sempre que necessário.

Aos companheiros do Centro Espírita de Assistência Bezerra de Menezes (CEABEM), por todo o amparo, incentivo e compreensão doada a mim e a minha família, permitindo que a base permanecesse sólida frente às adversidades dessa jornada. Esclarecendo-me que as lágrimas não substituem o suor que devo verter em benefício da minha própria felicidade.

A equipe LAMOFOPA, por dividir experiências e companhias. Com especial atenção aos pós-docs Anderson Pinto Almeida, Ticiano Franco Pereira da Silva, Edmara Chaves Rocha e Ana Kelen Lima. Aos doutorandos Valesca Barreto Luz, Rafael Rossetto, Rebeca Magalhães

Pedrosa Rocha, Isadora Machado Teixeira Lima, Giovanna Quintino Rodrigues e Luciana Rocha Faustino, pela colaboração, apoio, incentivo, troca de conhecimento e momentos de descontração. Aos mestrandos Gerlane Modesto da Silva, Francieli Osmarini Lunardi, Raphael Fernando Braga Gonçalves e Patrícia Magalhães de Andrade, por todo o apoio, ajuda e alegrias, em especial à mestranda Laritza Ferreira de Lima, com quem eu tive um maior convívio e apoio durante o doutorado. Gostaria ainda de agradecer aos alunos de iniciação científica, tanto aqueles que já passaram pelo laboratório, quanto àqueles que ainda permanecem como Mirlla Baracho Ferreira, Aglailson Silva Pinheiro, Márcio Breno Sampaio Mororó, Emmanuel Teles Sales, Victor Galindo, Paula Correia pela ajuda nas diversas tarefas do laboratório, em especial aqueles alunos de iniciação científica que me ajudaram com a tese, como Aglailson Silva Pinheiro, Mirlla Baracho Ferreira e Márcio Breno Sampaio Mororó.

A todos agradeço, profundamente, e dedico o resultado desse trabalho.



*"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."*

*Francisco Cândido Xavier*

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do fator de crescimento do nervo (NGF), fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) e insulina na sobrevivência, ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos cultivados inclusos em fragmentos de tecido ovariano, e 2) investigar os efeitos da insulina sozinha ou em combinação com o hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a sobrevivência, formação de antro, crescimento folicular e competência para a retomada da meiose de oócitos oriundos de folículos secundários caprinos isolados e crescidos *in vitro*, bem como avaliar os níveis de secreção de estradiol e RNAm para os receptores de FSH (*FSHR*), insulina (*INSR*) e aromatase P450 (*P-450AROM*) em folículos caprinos cultivados *in vitro* através da técnica de ensaio imunoenzimático e RT-PCR em tempo real, respectivamente. Para o cultivo *in situ*, fragmentos de córtex ovariano foram cultivados *in vitro* por um ou sete dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho ou adicionado de diferentes concentrações de NGF e de FGF-10 (1, 10, 50, 100 ou 200 ng/mL), bem como de insulina (5, 10 ng/mL e 5, 10  $\mu$ g/mL). Antes e após cultivo, os fragmentos foram analisados por histologia, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de fluorescência, e os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordiais, transição, primários e secundários), bem como em normais ou atresicos. Além disso, os diâmetros oocitário e folicular também foram avaliados. Com relação ao cultivo de folículos isolados, folículos secundários avançados foram microdissecados e cultivados por 18 dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> suplementado com diferentes concentrações (5, 10 ng/mL e 10  $\mu$ g/mL) de insulina contendo ou não FSH adicionado de maneira sequencial. Para os experimentos *in situ*, os resultados mostraram que após sete dias de cultivo, 1 ng/mL de NGF promoveu a manutenção da ultraestrutura folicular. A adição de 50 ng/mL de FGF-10 ao meio manteve a viabilidade e promoveu o crescimento folicular *in vitro*. Além disso, a utilização de 10 ng/mL de insulina promoveu a sobrevivência, a ativação e o crescimento folicular e oocitário. Após o cultivo dos folículos isolados, observou-se que 10 ng/mL de insulina em combinação com FSH foi mais eficiente na promoção de retomada da meiose de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, além de manter a sobrevivência, estimular o crescimento folicular e aumentar a expressão de RNAm para *INSR* e *P-450AROM* e a secreção de estradiol. Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram que a utilização de NGF (1 ng/mL), FGF-10 (50 ng/mL) e insulina (10 ng/mL) promove a manutenção da sobrevivência folicular e/ou o desenvolvimento dos folículos pré-antrais caprinos. Além disso, a associação de insulina e FSH assegurou o crescimento de folículos secundários caprinos, aumentaram os níveis de RNAm

para *INSR* e *P-450AROM*, bem como a secreção de estradiol em folículos ovarianos caprinos cultivados.

Palavras-chave: NGF. FGF-10. Insulina. Oócito. Cabra.

## ABSTRACT

The objectives of this study were: 1) to evaluate the effect of adding of different concentrations of nerve growth factor (NGF), fibroblastic growth factor-10 (FGF-10) and insulin on the survival, activation and *in vitro* growth of caprine preantral follicles cultured enclosed in the ovarian tissue fragments, and 2) to investigate the effects of insulin alone or in combination with follicle stimulating hormone (FSH) on survival, antrum formation, follicular growth and competence to resumption of meiosis in oocytes from secondary follicles isolated from goats *in vitro* grown, as well as to assess the levels estradiol secretion and of mRNA for FSH receptor (*FSHR*), insulin (*INSR*) and P450 aromatase (*P-450AROM*) in goat follicles *in vitro* culture by enzymatic immunoassay and RT-PCR in real time, respectively. To the *in situ* culture, fragments of ovarian cortex were cultured *in vitro* for one or seven days in MEM<sup>+</sup> alone or supplemented with different concentrations of NGF and of FGF-10 (1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL), as well as insulin (5, 10 ng/mL and 5, 10 µg/mL). Before and after culture, the fragments were analyzed by histology, transmission electron microscopy and fluorescent microscopy, and the follicles were classified according to their stage of development (primordial, intermediate, primary and secondary), as well as normal or atretic. Moreover, the oocyte and follicle diameters were also evaluated. With regard to isolated culture, advanced secondary follicles were microdissected and cultured for 18 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with different concentrations (5, 10 ng/mL and 10 µg/mL) of insulin with or without FSH added sequentially. To the *in situ* experiments, the results showed that after seven days of culture, 1 ng/mL NGF promoted the maintenance of follicular ultrastructure. The addition of 50 ng/mL FGF-10 to the medium maintained the viability and promoted the growth *in vitro*. Moreover, the use of 10 ng/mL insulin promoted the follicular survival, activation and follicular and oocyte growth. After culture of isolated follicles, it was observed that 10 ng/mL of insulin in combination with FSH was more efficient in promoting oocyte meiosis resumption from goat preantral follicles, besides maintaining the survival, stimulate follicular development and increase the expression of mRNA for *INSR* and *P-450AROM* and estradiol secretion. In conclusion, our results showed that the use of NGF (1 ng/mL), FGF-10 (50 ng/mL) and insulin (10 ng/mL) promote the maintenance of survival and/or development of goat preantral follicles. Furthermore, the combination of insulin and FSH ensured the growth of goat secondary follicles, increased levels for *INSR* and *P-450AROM* mRNA, as well as estradiol secretion in goats ovarian follicles cultured.

Keywords: NGF. FGF-10. Insulin. Oocyte. Goat.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

Figura 1. O ovário mamífero subdividido em região cortical e medular. Na região medular pode ser observada a presença de vasos sanguíneos e na região cortical a presença dos diferentes tipos de folículos ovarianos, desde os pré-antrais (primordial, primário e secundário) até os antrais (terciário e pré-ovulatório), além de um oócito ovulado e um corpo lúteo.....41

Figura 2. Formação de folículos primordiais. (I) Ninhos de células germinativas; (II) Invasão das células somáticas (pré-granulosa) causando o rompimento do sincício (ninho) acompanhado de intensa apoptose oocitária; (III) as células germinativas sobreviventes, no estágio de prófase I (oócitos primários), são circundadas por uma camada de células da pré-granulosa e por uma membrana basal, formando os folículos primordiais. Adaptado de EPIFANO; DEAN (2002)..44

Figura 3. Desenho esquemático dos compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa e da teca) e o estroma ovariano.....45

Figura 4. Classificação folicular de acordo com o grau de evolução, evidenciando os folículos inseridos no tecido ovariano e os isolados.....46

Figura 5. Representação dos fatores estimulatórios (em verde) e inibitórios (em vermelho) que atuam em diferentes etapas do desenvolvimento folicular (1: de primordial para primário, 2: de primário para secundário, 3: de secundário para antral e 4: destes para os folículos pré-ovulatórios).....58

### Capítulo I

Figura 1. Principais avanços obtidos com a utilização de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de mamíferos cultivados *in vitro*.....88

### Capítulo II

Figure 1. Schematic model illustrating high (TrkA) and low (p75) affinity receptors for NGF. Adapted from GRANDPRÉ et al. 2002.....117

Figure 2. Schematic representation of signaling pathways between NGF and TrkA. NGF binds to its receptor TrkA, leading to the dimerization and autophosphorylation. The Shc adaptor molecule binds to the phosphate in the receptor and to the complex Grb2-SOS. The Ras complex activates, exchanging the GDP to GTP. The activated Ras interacts directly with the Raf protein, which leads to the sequential activation of MEK and MAPK. The MAPK translocate to the nucleus, where it phosphorylates transcriptional factors, promoting the cellular differentiation. The Ras also promotes PI3K activation, which activates substances responsible for follicular survival and growth. Activation of PLC $\gamma$ 1 results in the release of Ca<sup>2+</sup> and PKC activation.....121

**Capítulo III**

Figure 1. Phylogenetic tree of the FGF family. Phylogenetic analysis suggests that 22 FGF genes can be arranged into seven subfamilies containing two to four members each. Adapted: Popovici et al. 2004.....141

Figure 2. Intracellular signaling pathways activated through FGFRs. Formation of a ternary FGF-heparin-FGFR complex leads to receptor autophosphorylation and activation of intracellular signaling cascades, including the Ras/MAPK pathway (shown in red), PI3 kinase/Akt pathway (shown in green), and the PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> pathway (shown in blue). The Ras/MAPK cascade is activated by binding of Grb2 to phosphorylated FRS2. The subsequent formation of a Grb2/SOS complex leads to the activation of Ras. Three routes by which FGFRs can activate PI3K/Akt pathway are indicated. First, Gab1 can bind to FRS2 indirectly via Grb2, resulting in tyrosine phosphorylation and activation of the PI3K/Akt pathway. Second, the PI3K-regulatory subunit p85 can bind to a phosphorylated tyrosine residue of the FGFR. Alternatively, activated Ras can induce membrane localization and activation of the p110 catalytic subunit of PI3K. DAG, diacylglycerol; IP3, inositol-1, 4, 5-triphosphate. These effectors, in turn, disseminate the receptor tyrosine kinase signals by phosphorylating many target proteins, including transcription factors in the nucleus. The PLC $\gamma$  and STAT pathways are also activated by FGF receptor signaling. Adapted: Cotton et al. 2008.....143

Figure 3. Schematic representation of cellular effects mediated by FGF-2 in different reproductive cells and tissues.....152

## Capítulo IV

Figura 1. Estrutura do FGFR e isoformas (IIIb e IIIc) geradas por *splicing* alternativo dos transcritos do FGFR. A estrutura dos FGFRs é ilustrada e inclui um peptídeo sinal (PS), três domínios Ig (D1-D3), uma caixa ácida, domínio transmembranar (DT) e um domínio tirosina quinase. As duas formas são geradas por *splicing* alternativos dos exons 8 e 9. A porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 8 para gerar a isoforma FGFRIIIb, enquanto a porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 9 para gerar a isoforma FGFRIIIc. Adaptado de Cotton et al. [43].....185

Figura 2. Estrutura esquemática do FGF-10 e FGFR. A: Estrutura da proteína FGF-10 contendo uma sequência sinal e uma região conservada que contém sítios de ligação ao receptor e aos proteoglicanos heparan sulfato (HS). B: Principais características estruturais dos FGFRs incluindo domínio Ig (1, 2, 3), caixa ácida, domínio de ligação a heparina, domínio transmembranar e um domínio tirosina-quinase.....186

Figura 3. Esquema do FGFR e suas vias de sinalização. Formação do complexo FGF-FGFR-heparina/HS leva à autofosforilação do receptor e à ativação de cascatas de sinalização intracelular das vias Ras/MAPK, PI3K/Akt (esquerda) e PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>/PKC (direita). Os receptores EphA induzem a fosforilação da tirosina dos FGFRs e FRS2 através da formação de um complexo com o FGFR. A cascata de sinalização Ras/MAPK é ativada pela ligação da Grb2 ao FRS2 fosforilado. A subsequente formação do complexo Grb2/SOS resulta na ativação da Ras. Existem duas rotas pelas quais os FGFRs são capazes de ativar a via PI3K/Akt: a PI3K pode se ligar diretamente ao resíduo de tirosina fosforilada do FGFR; ou a Ras ativada pode induzir a localização na membrana e a ativação da subunidade catalítica PI3K. A via PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> é ativada quando a autofosforilação de um resíduo de tirosina na extremidade carboxi-terminal do FGFR cria um sítio de ligação específico para o domínio SH2 da PLC $\gamma$ . Os últimos componentes ativados das cascatas de transdução de sinais mencionadas acima se translocam para o núcleo e fosforilam os fatores de transcrição específicos da família Ets, os quais, por sua vez, ativam a expressão de genes-alvo dos FGFs.....190

Figura 4. Modelo hipotético das ações mediadas pelo FGF-10 entre os diferentes tipos celulares dos folículos pré-antrais e antrais. A expressão folicular de FGF-10 seria inicialmente



proveniente do oócito de folículos primordiais e primários e teria como alvo o seu receptor, o FGFR2b, presente nas células da granulosa (CG). Posteriormente, nos folículos secundários e antrais jovens, as células da teca (CT) também assumiriam a produção de FGF-10, e atuariam conjuntamente com o oócito na indução da diferenciação das células da granulosa. Adaptado de Castilho [20].....194

## Capítulo V

Figura 1. Esquema da síntese da insulina onde: 1. Pré-proinsulina (Líder, cadeia B, cadeia C, cadeia A); 2. Pró-insulina consiste em BCA, sem L; 3. Dobra espontânea; 4. As cadeias A e B ligadas por enxofre; 5. A cadeia C é clivada; 6. Molécula de insulina final.....207

Figura 2. Receptor de insulina, sua via de sinalização para o transporte de glicose e mecanismo hipotético de estimulação ou inibição da esteroidogênese. Após a ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  de seu receptor, a subunidade  $\beta$  tirosina-quinase é ativada e então os IRS-1 e -2 são fosforilados. A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose é ativada, os transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT) são translocados para a membrana e a captação da glicose é estimulada. Um sistema de sinalização alternativo pode envolver a geração de inositolglicano na membrana da célula após a ligação da insulina ao seu receptor. Esse sistema de sinalização inositolglicano pode mediar à modulação da insulina nas enzimas esteroidogênicas como P450 ssc, P450 c17 ou aromatase P450.....209

Figura 3. Expressão de receptores de insulina em ovários humanos após a realização da técnica de hibridização *in situ*. Os dados são mostrados como marcação positiva moderada (+2) e positiva fraca (+1). Adaptado de Poretsky et al. (1999). Dados pertencentes a El-Roeiy et al. (1993) e Samoto et al. (1993).....210

## Capítulo VI

Figure 1. Histological section of ovarian fragments after periodic acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal (A) and degenerated (B) follicles after culture with 10 ng/mL NGF for 7 days. O = Oocyte; Nu = oocyte nucleus; GC = granulosa cell.....231

Figure 2. Percentage (mean  $\pm$  SD) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (noncultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of NGF (concentrations in ng/mL indicated at the bottom of the figure). \* $p < 0.05$  compared with fresh control (day 0). †  $p < 0.05$  compared with  $\alpha$ -MEM+. Different lowercase letters denote significant differences between treatment groups for the same culture period ( $p < 0.05$ ). Different capital letters denote significant differences between culture periods within each treatment group ( $p < 0.05$ ).....234

Figure 3. Percentage (mean  $\pm$  SD) of A primordial and B developing follicles (intermediate, primary and secondary) in noncultured tissue (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of NGF (concentrations in ng/mL indicated at the bottom of the figure). \* $p < 0.05$  compared with fresh control (day 0). Different lowercase letters denote significant differences between treatment groups for the same culture period ( $p < 0.05$ ). Different capital letters denote significant differences between culture periods within each treatment group ( $p < 0.05$ ).....236

Figure 4. Electron micrographs of follicles before and after 7 days of culture. (A) normal preantral follicles from non-cultured ovarian tissues (control; original magnification 3000 $\times$ ); (B) normal preantral follicles after culture in  $\alpha$ -MEM+ supplemented with 1 ng/mL NGF (original magnification 4000 $\times$ ); (C) degenerated follicles after 7 days of culture in  $\alpha$ -MEM+ alone (original magnification 4000 $\times$ ) or supplemented with (D) 10 ng/mL NGF (original magnification 4000 $\times$ ) or (E) 50 ng/mL NGF (original magnification 8000 $\times$ ) showing characteristic high levels of cytoplasmic vacuolization, lack of basal membrane integrity and disorganization of granulosa cells. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell; V: vacuoles; er: endoplasmic reticulum; m: mitochondria.....239

Figure 5. Assessment of the viability of caprine preantral follicles using fluorescent probes. Isolated control (A, B) and treated preantral follicles cultured for 7 days in medium supplemented with 1 ng/mL NGF (C, D) classified as viable since cells were labeled with calcein-AM (green fluorescence).....240

Figure 6. Assessment of the viability of caprine preantral follicles using fluorescent probes. Follicles cultured in  $\alpha$ -MEM+ alone (arrows) (A, B) or with 10 (C, D) or 50 ng/mL (E, F) NGF.

Cells were considered non-viable since they were labeled with ethidium homodimer-1 (red fluorescence).....241

## Capítulo VII

Figure 1. Representative image of goat ovarian fragments on day 0 (control - A) and after 1 or 7-day culture in the presence of 0 ng/mL (B-C) and 50 ng/mL (D-E) of FGF-10 or after 7-day culture with 100 ng/mL (F) of FGF-10. Degenerated preantral follicles often displayed oocyte retraction (F, arrow) and disorganization of granulosa cell layers. Scale bars represent 50  $\mu$ m (E) and 20  $\mu$ m (A-D; F). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells (x400), PAS-Hematoxin.....258

Figure 2. Percentage (mean  $\pm$  SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after 1 or 7 d culture with varying concentrations of FGF-10. \* Differs significantly from the fresh control ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P < 0.05$ ). <sup>^</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P < 0.05$ ).....260

Figure 3. Percentage (mean  $\pm$  SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 d in the presence of varying concentrations of FGF-10. \* Differs significantly from the fresh control ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P < 0.05$ ). <sup>^</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P < 0.05$ ).....261

Figure 4. Electron micrographs of follicles before and after 7 d of culture. (A) Morphologically normal preantral follicle from non-cultured ovarian fragments (control; original magnification 3000 $\times$ ); (B) Morphologically normal preantral follicles after culturing with 50 ng/mL FGF-10 (original magnification 3000 $\times$ ). O: oocyte; nu: nucleolus; GC: granulosa cell; ne: nuclear envelope; m: mitochondria; bm: basement membrane. Scale bars = 10  $\mu$ l.....263

Figure 5. Viability assessment of goat preantral follicles using fluorescent probes. (A) An isolated preantral follicle after culturing with 50 ng/mL FGF-10 that was classified as viable, (B) because cells were labeled by calcein-AM. Scale bars = 50  $\mu$ m.....264

## Capítulo VIII

Figure 1. Representative image of goat ovarian fragments on day 0 (fresh control, a) and after 1 or 7 d culture in the presence of 0 ng/mL (b-c) and 10 ng/mL (d-e) of insulin or after 7 d culture with 5 µg/mL (f) of insulin. Degenerated preantral follicles often displayed pyknotic nuclei (f, arrow). Scale bars represent 50 µm. O, oocyte; Nu, oocyte nucleus; GC, granulosa cells. 400x magnification, PAS-hematoxylin.....276

Figure 2. Percentage (mean ± SD) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (noncultured) and after *in vitro* culturing for 1 or 7 d with varying concentrations of insulin. \* Differs significantly from the fresh control ( $P<0.05$ ). <sup>a,b</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P<0.05$ ).....277

Figure 3. Percentage (mean ± SD) of (a) primordial and (b) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in fresh control (noncultured) and tissues cultured for 1 or 7 d in the presence of varying concentrations of insulin. \* Differs significantly from the fresh control ( $P<0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P<0.05$ ). <sup>Δ</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P<0.05$ ).....278

Figure 4. Electron micrographs of follicles before and after 7 d of culture. (a) Morphologically normal preantral follicle from noncultured ovarian fragments (fresh control; original magnification 4000x); (b) Morphologically normal preantral follicles after culture with 10 ng/mL insulin (original magnification 6000x). O, oocyte; nu, nucleolus; N, nucleus; GC, granulosa cell; ve, vesicle; ne, nuclear envelope; m, mitochondria; bm, basement membrane. Scale bars = 5 µm.....280

Figure 5. Viability assessment of goat preantral follicles using fluorescent probes. Isolated preantral follicles after *in vitro* culture in medium contend 10 ng/mL of insulin in a bright field (a) and labeled with calcein-AM (a<sub>1</sub>) and follicle noncultured (fresh control) in a bright field (b) and labeled with ethidium homodimer-1 (b<sub>1</sub>) (Scale bars = 50 µm; 400x magnification).....281

## Capítulo IX

Figure 1. Stereomicrography of normal goat ovarian follicles before culture (A) or cultured *in vitro* in the treatment group with insulin, 0 ng/ml plus FSH for 6 d (B), 12 d (C) and 18 d (D). Normal follicles from the insulin-free group (0 ng/ml insulin) with FSH after 6 d of culture showing the formation of the antral cavity (black arrow). (E) Compact cumulus-oocyte complexes obtained from 18 d cultured follicles in the presence of insulin (10 ng/ml) and (F) expansion of their cumulus cells after maturation *in vitro*. (G) Oocytes after enzymatic and mechanical stripping. (H) A follicle from a group with 5 ng/ml insulin showing an extruded oocyte after 18 d of culture. (I) Degenerated follicles after 18 d of culture in a medium containing 10 µg/ml insulin with darkening of the oocytes (white arrow). Scale bars represent 100 µm (A-D; F; H-I), 50 µm (E) and 150 µm (G). O: oocyte, CG: granulosa cells, A: antrum, cc: cumulus cells.....297

Figure 2. Survival of preantral follicles isolated from goats after *in vitro* culture in the medium without FSH (A) and with FSH (B) in the presence of different concentrations of insulin (0, 5 and 10 ng/mL or 10 µg/mL) for 18 d. <sup>A,B</sup> Comparison among treatments within the same day of culture; <sup>a,b,c</sup> Comparison between days of the same treatment ( $P<0.05$ ).....298

Figure 3. Follicular diameter of preantral follicles isolated from goats with normal morphology after *in vitro* culture in medium without FSH (A) and with FSH (B) in the presence of different concentrations of insulin (0, 5 and 10 ng/mL or 10 µg/mL) for 18 d. <sup>A,B</sup> Comparison among treatments at the same day of culture; <sup>a,b,c,d</sup> Comparison among days in the same treatment ( $P<0.05$ ).....300

Figure 4. Morphology of oocytes destined to IVM, after *in vitro* culture of goat preantral follicles in medium containing 0 ng/ml of insulin (A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>) and 10 ng/ml alone (B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>) or with FSH (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>). Bright-field visualization of oocytes (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>) and characterization of a viable oocyte after staining with calcein-AM (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>) and germinal vesicles (A<sub>3</sub>), germinal vesicle breakdown (B<sub>3</sub>) and metaphase II (C<sub>3</sub>) after Hoechst 33342 staining under fluorescence (Scale bars: 50 µm; 400x magnification).....303

Figure 5. Estradiol levels for goat ovarian follicles during culture in control medium without insulin (Control), with insulin alone at concentrations of 10 ng/ml (Ins), with FSH alone (FSH)

or with insulin and FSH (Ins + FSH) at day 18. Significant differences over time (uppercase) or between the insulin dosage groups (lowercase) are indicated by different letters ( $P < 0.05$ ).....304

Figure 6. Electron micrographs of control and cultured follicles. A: preantral follicle from the fresh control group (scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail ( $A_1$ , scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ); B: antral follicle retrieved from experimental ovaries and immediately fixed (scale bar: 5  $\mu\text{m}$ ), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail ( $B_1$ , scale bar: 5  $\mu\text{m}$ ); C: antral follicle from the 10 ng/ml insulin alone group (scale bar: 5  $\mu\text{m}$ ), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail ( $C_1$ , scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ); D: antral follicle from the 10 ng/ml insulin associated with FSH group (scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail ( $D_1$ , scale bar: 2  $\mu\text{m}$ ). Arrows indicate follicular cell processes transversally sectioned. O: oocyte; GC: granulosa cell; ZP: zona pellucida; m: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticulum; v: vesicle; fcp: follicular cell process; nu: granulosa cell nucleus; go: Golgi apparatus.....306

Figure 7. Relative expression of mRNA (means  $\pm$  SD) of (A) *FSHR*; (B) *INSR* and (C) *P-450AROM* after 18 d of culture in the control medium without insulin (Control), with insulin alone at concentrations of 10 ng/ml (Ins), with FSH alone (FSH) or with insulin and FSH (Ins + FSH). Different letters denote a significant difference ( $P < 0.05$ ).....307

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de Literatura

Tabela 1. Os genes e padrões de sinalização que estão envolvidos na formação das células germinativas. Adaptado de OKTEM; URMAN, 2010.....43

### Capítulo VI

Table 1. Caprine oocyte and follicle diameters (mean  $\pm$  SD) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of NGF.....237

### Capítulo VII

Table 1. Goat oocyte and follicle diameters (mean  $\pm$  SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 d in the absence or presence of various concentrations of FGF-10.....262

### Capítulo VIII

Table 1. Goat oocyte and follicle diameters (mean  $\pm$  SD) in fresh control (noncultured) and in tissues cultured for 1 or 7 d in the absence or presence of various concentrations of insulin. \* Differs significantly from the fresh control ( $P<0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P<0.05$ ). <sup>Δ</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P<0.05$ ).....279

### Capítulo IX

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of goat follicles.....295

Table 2. Antrum formation (%) during *in vitro* culture of goat isolated preantral follicles in medium without FSH (experiment 1) and with FSH (experiment 2) in the presence of insulin at different concentrations (0, 5 and 10 ng/mL or 10  $\mu$ g/mL) for the day 18 of treatment. <sup>a,b</sup> Different lowercase letters indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ) among days of

culture in same experiment. <sup>A,B</sup> Different uppercase letters indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ) between treatments in the same experiment.....301

Table 3. Oocyte recovery rates after culture, oocyte diameter (mean  $\pm$  SD, including the zona pellucida), percentage of viable oocytes, percentage of germinal vesicle stage oocytes, resumption of meiosis and configuration of chromatin observed in oocytes from preantral follicles grown *in vitro* in medium without (experiment 1) or with (experiment 2) FSH. <sup>A,B</sup> Different uppercase letters indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ) between treatments of the same experiment.....302



## LISTA DE QUADROS

### Revisão de Literatura

Quadro 1. Principais resultados obtidos pelo LAMOFOPA nos últimos 7 anos com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano. Adaptado de CELESTINO, 2010b. Nota: HC - histologia clássica; MET - microscopia eletrônica de transmissão; FLUO - microscopia de fluorescência.....67

Quadro 2. Principais resultados obtidos pelo LAMOFOPA nos últimos 2 anos com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados. Adaptado de CELESTINO, 2010b. Nota: MORF – morfologia; FLUO – fluorescência.....71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	: <i>Antrum</i> (antro)
Akt	: <i>Protein Kinase B</i> (proteína quinase B)
AM	: Acetoximetil
AMH	: <i>Anti-müllerian hormone</i> (hormônio anti-mülleriano)
AMPC	: <i>Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i> (adenosina-3',5'-monofosfato cíclico)
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
AP1	: <i>Activator protein 1</i> (proteína de transcrição ativadora-1)
Arg31/32/65	: Arginina 31/32/65
as	: <i>Antisense</i> (anti senso)
ATP	: <i>Adenosine-5'-triphosphate</i> (adenosina-5' - trifosfato)
BAD	: <i>Bcl-2-associated death promoter</i> (proteína promotora de morte associada ao Bcl-2)
BAX	: <i>Bcl-2 associated X protein</i> (proteína X associada ao Bcl-2)
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma protein 2</i> (linfoma de célula B2)
BDFN	: <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)
bFGF	: <i>Basic fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento fibroblástico básico)
Bid	: <i>BH3 interacting domain death agonist</i> (domínio de morte antagonista que atua com o BH3)
Bik	: <i>Bcl-2 interacting killer</i> (inibidor da Bcl-2)
bm	: <i>basement membrane</i> (membrana basal)
BMP-15	: <i>Bone morphogenetic protein-15</i> (proteína morfogenética do osso-15)
BMP-2/-4/-6	: <i>Bone morphogenetic protein-2/-4/-6</i> (proteína morfogenética do osso-2/-4/-6)
BMP-7/-8b	: <i>Bone morphogenetic protein-7/-8b</i> (proteína morfogenética do osso-7/-8b)
BrdU	: bromodeoxiuridina
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
Ca <sup>++</sup>	: <i>Calcium ion</i> (íon cálcio)
CaMK II	: <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i> (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina)
cAMP	: <i>Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i> (adenosina-3',5'-monofosfato cíclico)
CAPES	: Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior
Caspases	: <i>CysteinyI aspartic acid protease</i> (protease-cisteína que cliva após resíduos de ácido aspártico)

cc	: <i>Cumulus cells</i> (células do cumulus)
Cdc42	: Cell division cycle 42 (ciclo de divisão celular 42)
cDNA	: <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico complementar – DNA complementar)
CG	: Células da granulosa
CGP	: Células germinativas primordiais
c-Kit	: <i>Kit ligand receptor</i> (Receptor para kit ligand)
CL	: <i>Corpus luteum</i> (corpo lúteo)
c-myc	: Proteína de transcrição proto-oncogênica
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de Carbono
COCs/CCOs	: <i>Cumulus oocyte complexes</i> (complexo cumulus-oócito)
CPqAM	: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
CREB	: <i>Element binding protein</i> (proteína de ligação ao elemento)
CT	: Threshold cycle
d/D	: <i>Day</i> (dia)
D1/D2/D3	: Domínio semelhante à imunoglobulina 1/2/3
DAB	: Diaminobenzidina
DAG	: <i>Diacylglycerol</i> (diacilglicerol)
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DNAc	: DNA complementar
DNAase	: Desoxirribonuclease
DT	: Domínio transmembranar
eCG	: <i>Equine chorionic gonadotropin</i> (gonadotrofina coriônica equina)
ECM	: <i>Extracellular matrix</i> (matrix extracelular)
EDTA	: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal)
EIA	: <i>Enzymatic immunoassay</i> (ensaio imunoenzimático)
EphA	: <i>Ephrin A</i> (proteína efrim A)
er	: <i>Endoplasmic reticulum</i> (retículo endoplasmático)
ERK-1/-2	: <i>Extracellular Signal Regulated Kinase-1/-2</i> (quinase regulada por sinal extracelular -1/-2)
EthD-1	: Etídio homodímero 1

Ets	: <i>E-twenty six family</i> (fator de transcrição de eucariontos)
E <sub>2</sub>	: <i>Estradiol</i> (estradiol)
FAVET	: Faculdade de Veterinária
fcp	: <i>Follicular cell process</i> (processo de célula folicular)
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento de fibroblasto)
FGF-1/-2/-3/-4/-5/-7/-8/-9/-10/-22:	<i>Fibroblast growth factor -1/-2/-4/-5/-7/-8/-9/-10/-22</i> (fator de crescimento fibroblástico -1/-2/-4/-5/-7/-8/-9/-10/-22).
FGFBPs	: <i>FGF binding proteins</i> (proteínas de ligação ao FGF)
FGFR	: <i>FGF receptor</i> (receptor para FGF)
FGFR2	: <i>FGF receptor 2</i> (receptor 2 para FGF)
Fig.	: <i>Figure</i> (figura)
Fig1 $\alpha$	: <i>Factor in the germline alpha</i> (fator de linha germinal $\alpha$ )
FINEP	: Financiadora de Estudos e Projetos
FIOCRUZ	: Fundação Oswaldo Cruz
FIV	: Fecundação <i>in vitro</i>
FLUO	: Fluorescência
Fox12	: <i>Forkhead box L2</i> (proteína forkhead L2)
Foxo3a	: <i>Forkhead transcription factor</i> (fator de transcrição Foxo forkhead)
FRS2	: <i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i> (receptor do fator de crescimento de fibroblasto substrato 2)
FSH	: <i>Follicle stimulating hormone</i> (hormônio folículo estimulante)
FSHr	: FSH recombinante
FSHR	: <i>FSH receptor</i> (receptor de FSH)
G	: Gauge (calibre)
GAB1	: <i>GRB2-associated-binding protein 1</i> (proteína de ligação 1 associada ao GRB2)
GADPH	: <i>Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase</i> (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
GC	: <i>Granulosa cell</i> (célula da granulosa)
GDF-9	: <i>Growth differentiation factor-9</i> (fator de crescimento e diferenciação-9)
GDNF	: <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado da glia)
GDP	: <i>Guanosine diphosphate</i> (guanosina difosfato)
GEF	: <i>Guanine nucleotide exchange factors</i> (fatores de troca de nucleotídeos de guanina)
GH	: <i>Growth hormone</i> (hormônio do crescimento)

GLM	: <i>General linear models</i> (modelo linear geral)
GLUT	: <i>Glucose transporter</i> (transportador de glicose dependente de insulina)
GnRH	: <i>Gonadotropin-releasing hormone</i> (hormônio liberador de gonadotrofinas)
go	: <i>Golgi apparatus</i> (aparelho de golgi)
Grb2	: <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> (receptor do fator de crescimento ligado a proteína 2)
Grb2-SOS	: <i>Grb2-SOS complex</i> (complexo Grb2-SOS)
GSCs	: <i>Germline stem cells</i> (células-tronco germinativas)
GTP	: <i>Guanosine triphosphate</i> (guanosina trifosfato)
GV	: <i>Germinal vesicle</i> (vesícula germinal)
GVBD	: <i>Germinal vesicle breakdown</i> (quebra da vesícula germinal)
G6PDH	: Glicose 6-fosfato desidrogenase
h	: <i>Hour</i> (hora)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Peróxido de hidrogênio
HC	: Histologia clássica
hCG	: <i>Human chorionic gonadotropin</i> (gonadotrofina coriônica humana)
HE	: Hematoxilina-Eosina
hFGF	: Fator de crescimento homólogo ao FGF
HGF	: <i>Hepatocyte growth factor</i> (fator de crescimento de hepatócito)
HS	: <i>Heparan sulfato</i> (sulfato de heparina)
HSPGs	: <i>Heparan sulfate proteoglycans</i> (proteoglicanos sulfato de heparina)
IAA	: <i>Indol 3-acetic acid</i> (ácido 3-indol acético)
IBGE	: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iFGF	: fator de crescimento de fibroblasto intracelular
IGF-1/-2	: <i>Insulin like growth factor-1/-2</i> (fator de crescimento semelhante à insulina-1/ 2)
IGFBP -2/-3/-4/-5	: <i>Insulin-like growth factor-binding protein-2/-3/-4/-5</i> (proteína ligante -2/-3/-4/-5 transportadora de fator de crescimento semelhante à insulina)
IGFR1	: Receptor para IGF-1
IHQ	: Imunohistoquímica
IL	: <i>Interleucin</i> (interleucina)
IIIb,c	: <i>FGF receptor isoforms b and c</i> (Isoformas b e c para o receptor de FGF)
INRA	: <i>Institut National de la Recherche Agronomique</i> (instituto nacional da pesquisa agrônômica)
Ins	: <i>Insulin</i> (insulina)

INSR	: <i>Insulin receptor</i> (receptor de insulina)
IP3	: <i>Inositol Triphosphate</i> (inositol-3 fosfato)
IRS-1/-2	: <i>Insulin receptor substrate-1/-2</i> (substrato do receptor de insulina)
ITS	: <i>Insulin, transferrin and selenium</i> (insulina, transferrina e selênio)
IVM	: <i>In vitro maturation</i> (maturação <i>in vitro</i> )
JNK	: <i>c-Jun N-terminal kinases</i> (quinase c-Jun N-terminal)
K <sup>+</sup>	: Íon potássio
kDa	: <i>KiloDalton</i> (quiloDalton)
KGF	: <i>Keratinocyte growth factor</i> (fator de crescimento de queratinócitos)
KGF-2/-7	: <i>Keratinocyte growth factor-2/-7</i> (fator de crescimento de queratinócitos-2/-7)
KGFR	: <i>KGF receptor</i> (receptor 2b para fator de crescimento de fibroblasto)
KL	: Kit ligand
L/l	: Litro
LAMOFOPA	: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais
LH	: <i>Luteinizing hormone</i> (hormônio luteinizante)
LHX8	: <i>LIM-homeobox protein 8</i>
LIF	: <i>Leukemia inhibitory factor</i> (fator inibidor de leucemia)
Lys64	: Lisina 64
m	: <i>Mitochondria</i> (mitocôndria)
M	: Molar
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase mitogenicamente ativada)
MCI	: Massa celular interna
MEK	: <i>MAPK/extracellular protein kinase</i> (proteína quinase extracelular/MAPK)
MEM	: <i>Minimal essential medium</i> (meio essencial mínimo)
MEM <sup>+</sup>	: <i>Supplemented minimal essential medium</i> (meio essencial mínimo suplementado)
MET	: Microscopia eletrônica de transmissão
mg	: Miligrama
MI	: <i>Metaphase I</i> (metáfase I)
MII	: <i>Metaphase II</i> (metáfase II)
MMPs	: <i>Matrix metalloproteinases</i> (matriz de metaloproteinases)
min.	: <i>Minutes</i> (minutos)
MIV	: Maturação <i>in vitro</i>
mL	: Mililitro

mM	: Milimolar
mm	: Milímetros
mm <sup>3</sup>	: Milímetro cúbico
MOIFOPA	: Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
mOsm/L	: Miliosmol/litro
mRNA	: <i>Ribonucleic acid messenger</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
mTORC	: <i>Mammalian target of rapamycin complex</i> (proteína alvo da rapamicina em mamíferos)
mv	: <i>Microvilli</i> (microvilo)
N	: <i>Nucleus</i> (núcleo)
n	: Número
Na <sup>+</sup>	: Íon sódio
NCSU23	: <i>North Carolina State University Medium-23</i> (meio 23 da Universidade Estadual do Norte da Carolina)
ne	: <i>Nuclear envelope</i> ( envelope nuclear)
NFκB	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (factor nuclear kappa B)
ng	: Nanograma
NGF	: <i>Nerve growth factor</i> (fator de crescimento do nervo)
nm	: Nanômetros
Nobox	: <i>Newborn ovary homeobox gene</i> (gene Nobox)
NT	: <i>Neurotrophins</i> (neurotrofinas)
NT-3/-4	: <i>Neurotrophin-3/-4</i> (neurotrofina -3/-4)
NTF5	: <i>Neurotrophin 5</i> (neurotrofina tipo 5)
nu	: <i>Nucleolus</i> (núcleo)
Nu	: <i>Oocyte nucleus</i> (núcleo do oócito)
O	: <i>Oocyte</i> (Oócito)
OCT4	: <i>Octamer-binding transcription factor-4</i> (octâmero ligado ao factor de transcrição 4)
P < 0.05	: Probabilidade de erro menor do que 5%
P > 0.05	: Probabilidade de erro maior do que 5%
p.	: Página
p21ras	: <i>Proto-Oncogene Protein</i> (proteína oncogênica p21)
P4	: <i>Progesterone</i> (progesterona)

P-450AROM	: <i>Enzyme aromatase P450</i> (enzima P450 aromatase)
p75	: <i>Low-affinity NGF receptor</i> (receptor para NGF de baixa afinidade)
PAS	: <i>Periodic acid Schiff</i> (ácido periódico de Schiff)
PBS	: <i>Phosphate buffer solution</i> (tampão fosfato salino)
PCNA	: <i>Proliferative nuclear cell antigen</i> (antígeno nuclear de proliferação celular)
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDGF	: <i>Plaquet derived growth fator</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
Pg	: Picogramas
PGE	: Prostaglandina E
pH	: Potencial hidrogeniônico
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
PIVE	: Produção <i>in vitro</i> de embrião
PKB	: <i>Protein kinase B</i> (proteína quinase B)
PKC/ PKCδ	: <i>Protein kinase C/C delta</i> (proteína quinase C/C delta)
PLCy1	: <i>Phospholipase C-gamma1</i> (fosfolipase C-gama1)
PLCγ	: <i>Phospholipase C gamma</i> (fosfolipase C-γ)
PMCA	: <i>Plasma membrane calcium ATPase</i> (membrana plasmática cálcio ATPase)
POU5F1	: <i>Pituitary octamer neural unc domain, class 5, transcription factor 1</i> (octâmero neural-ligado ao factor de transcrição 1)
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
PS	: Peptídeo sinal
PTB	: <i>Phosphotyrosine binding</i> (fosfotirosina de ligação)
PtdIns (3,4,5)P <sub>3</sub>	: <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i> (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato)
PTEN	: <i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i> (homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10)
PTP	: <i>Protein tirosina phosphatase</i> (proteína tirosina fosfatase)
qPCR	: <i>Real-time Polymerase chain reaction</i> (reação de cadeia polimerase em tempo real)
qRT-PCR	: <i>Quantitative reverse transcription-polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia polimerase-transcrição reversa quantitativa)
Rac	: <i>Ras-related C3 botulinum toxin</i> (Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1)
Raf	: <i>Protein (Ser/Thr) kinase</i> (quinase específica para Ser/Thr)
Ras	: <i>RAT Sarcoma vírus</i> (vírus do sarcoma de ratos)



RENORBIO	: Rede Nordeste de Biotecnologia
Rho	: <i>Ras-homologous</i> (homólogo do Ras)
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RNAase	: Enzima ribonuclease
RNAm	: <i>Ribonucleic acid messenger</i> (ácido ribonucléico mensageiro)
RT	: <i>Room temperature</i> (temperatura ambiente)
RT-PCR	: <i>Reverse transcription- polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia polimerase - transcriptase reversa)
s	: <i>Sense</i> (senso)
SAS	: Statistical analysis system (sistema de análise estatística)
SBAC	: Solução a base de água de coco
SD	: <i>Standard deviation</i> (desvio padrão)
SEM	: <i>Standard error of means</i> (erro padrão da média)
ser	: <i>Smooth endoplasmic reticulum</i> (retículo endoplasmático liso)
Ser	: <i>Serine</i> (serina)
SH2	: <i>Src homology 2 domain</i> (domínio Src de homologia 2)
SH3	: <i>Src homology 3 domain</i> (domínio Src de homologia 3)
Shc	: <i>Insulin binding molecule</i> (molécula de ligação da insulina)
SMADs	: <i>Downstream intracellular signalling molecules</i> (moléculas de sinalização intracelular)
SNK	: <i>Student's-Neuman-Keuls</i>
SNT	: <i>Suc1-associated neurotrophic factor target</i> (proteína alvo Suc1 associada ao fator neurotrófico)
SOF	: <i>Synthetic oviductal fluid</i> (fluido sintético do oviduto)
SOS	: <i>Son of sevenless</i> (fator de troca do nucleotídeo guanina)
Src	: Proteína tirosina-quinase citoplasmática
STMN1	: <i>Stathmin 1/oncoprotein 18</i> (oncoproteína 18 stathmin 1)
tc	: <i>Theca cells</i> (células da teca)
TCM 199	: <i>Tissue Culture Medium 199</i> (meio de cultivo tecidual 199)
TEM	: <i>Transmission electron microscopy</i> (microscopia eletrônica de transmissão)
TGF- $\alpha$	: <i>Transforming growth factor-<math>\alpha</math></i> (fator de crescimento transformante- $\alpha$ )
TGF- $\beta$	: <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> (fator de crescimento transformante- $\beta$ )
Thr	: <i>Threonine</i> (treonina)
TNF	: <i>Tumor necrosis fator</i> (fator de necrose tumoral)

Trk	: <i>Tyrosine kinase</i> (tirosina quinase)
TrkA/B	: <i>Tyrosine kinase receptor A/B</i> (receptor tirosina quinase A/B)
TSC1	: <i>Tuberous sclerosis protein 1</i> (proteína de esclerose tuberosa 1)
TSC2	: <i>Tuberous sclerosis protein 2</i> (proteína de esclerose tuberosa 2)
T1/2/3	: Tratamento 1/2/3
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
UFC	: Universidade Federal do Ceará
UI	: Unidades internacionais
UnB	: Universidade de Brasília
UNESP	: Universidade Estadual Paulista
USA	: <i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
V	: <i>Vacuoles</i> (vacúolos)
v:v	: volume/volume
v/ve	: <i>Vesicles</i> (vesículas)
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento do endotélio vascular)
VG	: Vesícula germinativa
VIP	: <i>Vasoactive intestinal peptide</i> (peptídeo intestinal vasoativo)
x	: Vezes (aumento)
y	: <i>Year</i> (ano de idade)
ZP	: <i>Zona pellucida</i> (zona pelúcida)
$\alpha$	: <i>Alpha</i> (alfa)
$\alpha 2\beta 2$	: Proteína heterotetramérica
$\alpha$ -MEM	: <i>Alpha minimal essential medium</i> (meio essencial mínimo alfa)
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	: <i>Supplemented alpha minimal essential medium</i> (meio essencial mínimo alfa suplementado)
$\beta$	: <i>Beta</i>
$\gamma$	: <i>Gamma</i> (gama)
$\mu$ M	: Micromolar
%	: <i>Percentage</i> (porcentagem)
$\mu$ g	: Micrograma
$\mu$ L	: Microlitro
$\mu$ m	: Micrômetro
~	: Aproximadamente
<	: Menor que

> : Maior que  
± : Mais ou menos  
°C : Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>40</b>
2.1. O ovário de mamíferos.....	40
2.2. Células germinativas primordiais: a origem dos oócitos.....	41
2.3. Caracterização estrutural dos folículos ovarianos e regulação da foliculogênese.....	45
2.3.1. Formação de folículos primordiais.....	47
2.3.2. Transição de folículos primordiais para primário.....	49
2.3.3. Progressão do folículo primário para secundário.....	52
2.3.4. Progressão do folículo secundário para terciário (antral).....	55
2.3.5. Crescimento folicular após estágio antral e o processo de seleção e dominância.....	56
2.4. População e atresia folicular.....	58
2.5. MOIFOPA – Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	61
2.5.1. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de córtex ovariano.....	64
2.5.2. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos isolados.....	68
2.6. Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais em diferentes espécies.....	72
2.7. Importância da composição do meio de cultivo no desenvolvimento de folículos pré-antrais.....	73
2.8. Técnicas para análise folicular após cultivo <i>in vitro</i> .....	74
2.8.1. Histologia clássica.....	74
2.8.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	75
2.8.3. Microscopia de fluorescência.....	75
2.8.4. Biologia molecular.....	76
2.8.5. Dosagem de estradiol.....	77
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>79</b>
<b>4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>82</b>
5.1. Objetivo geral.....	82
5.2. Objetivos específicos.....	82

<b>6. CAPÍTULO I</b>	
Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos.....	83
<b>7. CAPÍTULO II</b>	
Papel do fator de crescimento do nervo e seus receptores na foliculogênese.....	112
<b>8. CAPÍTULO III</b>	
A família do fator de crescimento de fibroblasto: Estrutura e propriedade biológica na reprodução de fêmeas mamíferas.....	136
<b>9. CAPÍTULO IV</b>	
Caracterização estrutural do fator de crescimento de fibroblasto-10 e seu papel na fisiologia folicular ovariana.....	179
<b>10. CAPÍTULO V</b>	
Implicações da insulina na função ovariana e desenvolvimento embrionário.....	203
<b>11. CAPÍTULO VI</b>	
Fator de Crescimento do Nervo promove a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos cultivados <i>in vitro</i> .....	225
<b>12. CAPÍTULO VII</b>	
Fator de Crescimento de Fibroblasto-10 mantém a sobrevivência e promove o crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados.....	250
<b>13. CAPÍTULO VIII</b>	
Como a concentração de insulina afeta o desenvolvimento de folículos pré-antrais em cabras.....	271
<b>14. CAPÍTULO IX</b>	
Os efeitos da insulina e FSH durante desenvolvimento <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos, e a expressão relativa de RNAm para os receptores de insulina e FSH e do citocromo P450 aromatase em folículos cultivados.....	285
<b>15. CONCLUSÕES.....</b>	318
<b>16. PERSPECTIVAS.....</b>	319
<b>17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	320

## 1. INTRODUÇÃO

O rebanho de caprinos no Brasil atinge a cifra de 9.450.312 cabeças, sendo destas 8.788.790 (93%) localizadas na região Nordeste do país (IBGE, 2009). Apesar de deter praticamente todo o rebanho caprino, o Nordeste ainda necessita de pesquisas e tecnologia para minimizar a relação custo/benefício do sistema de produção, estimulando o desenvolvimento da caprinocultura e criando novas possibilidades de agronegócio. Nesse sentido, as pesquisas realizadas durante as duas últimas décadas têm criado oportunidades extraordinárias para a reprodução animal e proporcionado uma grande revolução na multiplicação de animais de elevado potencial econômico.

As biotécnicas reprodutivas, tais como a inseminação artificial, sincronização de estro, fecundação *in vitro* e transferência de embriões são as mais largamente conhecidas e utilizadas (TROUNSON et al., 1998). No entanto, essas biotécnicas utilizam apenas uma pequena parcela de todo o potencial reprodutivo de que uma fêmea dispõe, uma vez que o ovário mamífero mantém a sua fertilidade na forma de um estoque de oócitos imaturos inclusos em milhares de folículos pré-antrais, que na grande maioria irão se tornar atrésicos durante as fases de crescimento e maturação, caso nenhuma medida interventiva seja adotada. Desta forma, com o propósito de melhorar o aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas é que vem sendo aprimorada e difundida nos últimos anos a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), também denominada de ovário artificial (FIGUEIREDO et al., 2008). A biotécnica de MOIFOPA compreende as etapas de isolamento, preservação (resfriamento e congelamento) e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e tem o objetivo de recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação (FIGUEIREDO et al., 1997). Além disso, em associação com outras tecnologias reprodutivas como a fecundação *in vitro* e a transferência de embriões, a MOIFOPA poderá não somente otimizar, como também conservar o material genético de animais valiosos e espécies em vias de extinção (CELESTINO et al., 2009a).

Visto que os caprinos são considerados economicamente atrativos para a região Nordeste, por serem importantes fontes de alimento e renda, a proposta para o desenvolvimento de um sistema de cultivo folicular bem estabelecido nesta espécie, bem como o estudo de fatores envolvidos neste processo é de fundamental importância. Esse sistema de cultivo permitirá a manutenção da fertilidade das fêmeas, através do fornecimento de oócitos para tecnologias de reprodução assistida, bem como para aprofundar a compreensão das interações oócito/células somáticas em espécies de crescimento folicular prolongado (McLAUGHLIN et

al., 2010). Desta forma, a identificação de fatores produzidos localmente em folículos ovarianos caprinos, bem como a avaliação do efeito destes fatores sobre o crescimento e a maturação oocitária poderá contribuir para uma melhor compreensão da foliculogênese. Várias pesquisas com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais revelaram importantes fatores de crescimento e hormônios envolvidos no desenvolvimento folicular (NILSSON; DETZEL; SKINNER, 2006; PICTON et al., 2008). Dentre estes, destacam-se o fator de crescimento do nervo (NGF), o fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) e a insulina. Diversas pesquisas, em outras espécies, têm sugerido que essas substâncias exercem importantes papéis no controle da foliculogênese inicial, atuando na esteroidogênese (GREISEN; LEDET; OVESEN, 2001), ativação (SKINNER, 2005), crescimento (OJEDA et al., 2000) e/ou inibição da atresia folicular (FORTUNE, 2003). Assim, a elucidação dos efeitos dessas substâncias sobre o desenvolvimento folicular em caprinos tornou-se o alvo de estudo da presente tese.

No decorrer deste trabalho, serão abordados aspectos relacionados à foliculogênese, classificação dos folículos ovarianos, população e atresia folicular, cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (modelo de cultivo de folículos *in situ* e isolados), sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos, estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, principais técnicas para avaliação dos folículos cultivados e importância da composição do meio de cultivo sobre o desenvolvimento folicular, com enfoque para os fatores e hormônios avaliados na presente tese, que serão melhor detalhados nos capítulos subsequentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *O ovário de mamíferos*

O ovário mamífero é um órgão pertencente ao sistema reprodutor feminino e constituído por duas regiões distintas: a medular e a cortical. A região medular é responsável pela sustentação e nutrição do ovário, e na maioria das espécies, consiste na porção interna do ovário, sendo composta por tecido conjuntivo, nervos, artérias e veias. A região cortical, por sua vez, apresenta uma composição altamente organizada de células germinativas (oócitos) e células somáticas (células da granulosa, da teca e do estroma), cujas interações determinam a formação e o desenvolvimento dos folículos (Figura 1; McGEE; HSUEH, 2000). Outra estrutura que se localiza na região cortical é o corpo lúteo, que se forma a partir do folículo ovariano após a ovulação (RICHARDS; PANGAS, 2010). Todas estas células trabalham em conjunto para promover um ambiente ideal para que o ovário exerça as suas funções exócrina (liberação de oócitos maduros) e endócrina (produção de hormônios esteroides) (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Assim, as diversas funções do ovário de mamíferos estão integradas no processo contínuo de desenvolvimento folicular, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo, dirigidos por mecanismos de retroalimentação entre o hipotálamo e a hipófise (GOUGEON, 2004; LEITÃO et al., 2009).



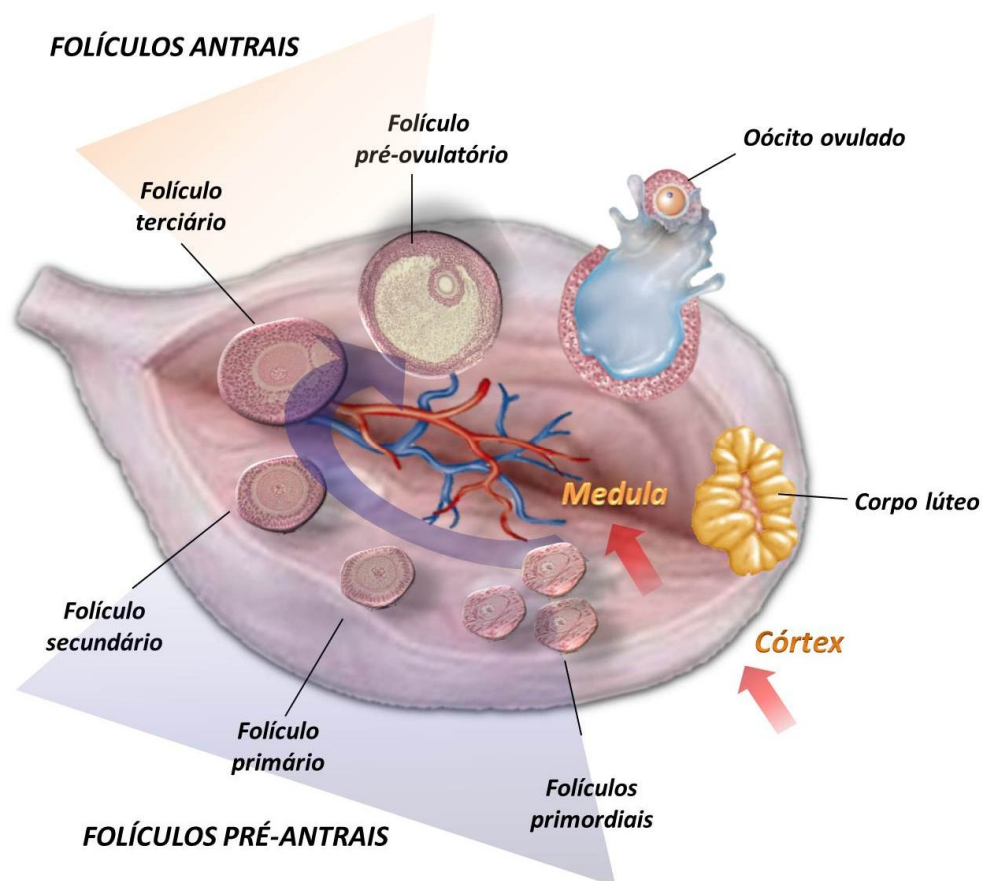


Figura 1. O ovário de mamífero subdividido em duas regiões distintas: córtex e medula. Na região medular pode ser observada a presença de vasos sanguíneos e, na região cortical, a presença dos diferentes tipos de folículos ovarianos, desde os pré-antrais (primordial, primário e secundário) até os antrais (terciário e pré-ovulatório), além de um oócito ovulado e um corpo lúteo.

## 2.2. Células germinativas primordiais: a origem dos oócitos

Os oócitos de mamíferos se desenvolvem a partir de células germinativas primordiais (CGP), as quais migram durante o desenvolvimento da gônada primitiva para se tornarem oogônias (McLAUGHLIN; McLVER, 2009).

As CGP são recrutadas a partir do epiblasto proximal para o ectoderma extraembrionário sob influência de sinais provenientes de substâncias produzidas localmente como as proteínas morfogenéticas ósseas -4 e -8b (BMP-4 e BMP-8b), e ainda da proteína morfogenética óssea -2 (BMP-2), derivada do endoderma extraembrionário (YING; ZHAO, 2001; YING et al., 2001; OHINATA et al., 2009). Além das BMPs, as moléculas sinalizadoras dos ligantes das BMPs (SMADs 1 e 5) e do fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ),

(SMADs 2 e 3), o fator inibidor de leucemia (LIF) e outros fatores repressores e reguladores transcricionais estão envolvidos na formação e proliferação das CGPs (OKTEN, URMAN, 2010). O aparecimento da competência das CGP é marcado pela expressão, sobre as células germinativas, de uma proteína transmembranar interferon-induzível denominada *fragilis*. A proteína *fragilis* posteriormente induz a expressão do gene *stella*, que é expresso exclusivamente em uma linhagem restrita de células germinativas. O gene *stella* permite então que as CGP escapem do destino de se diferenciarem em células somáticas e assim mantenham sua capacidade de pluripotência à medida que migram através do mesentério do intestino posterior até chegar à gônada primitiva (SAITOU; BARTON; SURANI, 2002; LANGE et al., 2003). Os genes, fatores de transcrição e vias de sinalização que estão envolvidos na formação das células germinativas são resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Os genes e padrões de sinalização que estão envolvidos na formação das células germinativas.

<b>Genes</b>	<b>Papel</b>	<b>Função</b>
<b>Bmp-2</b>	Fator de crescimento extracelular	Formação das CGP (Ying et al., 2001)
<b>Bmp-4</b>	Fator de crescimento extracelular	Formação das CGP (Ying et al., 2001)
<b>Bmp-8B</b>	Fator de crescimento extracelular	Formação das CGP (Ohinata et al., 2009)
<b>Fragilis</b>	Gene indutor de interferon	Competência das CGP (Lange et al., 2003)
<b>Stella</b>	Proteína	Retenção das CGP e pluripotência (Saitou et al., 2002)
<b>Smad-1</b>	Molécula sinalizadora de ligantes TGF- $\beta$	Formação das CGP (Tremblay et al., 2001)
<b>Smad-5</b>	Molécula sinalizadora de ligantes TGF- $\beta$	Formação das CGP (Chang e Matzuk, 2001)
<b>Nanos3</b>	Proteína de ligação ao RNA	Manutenção das CGP durante a migração (Tsuda et al., 2003)
<b>Prdm1</b>	Repressor transcricional	Formação das CGP (Ohinata et al., 2005)
<b>Prdm14</b>	Regulador transcricional	Formação das CGP (Yamaji et al., 2008)
<b>Tiar</b>	Proteína de ligação ao RNA	Formação das CGP (Beck et al., 1998)
<b>Stra8</b>	Fator citoplasmático	Síntese DNA premeiótico e progressão meiótica (Baltus et al. 2006)

Adaptado de OKTEM; URMAN, 2010.

Uma vez na gônada, as CGP sofrem uma intensa proliferação devido a sua alta taxa de mitose oogonial. No entanto, no final do período gestacional, a taxa de mitose reduz progressivamente e de forma concomitante com o aumento na taxa de atresia oogonial. Hipoteticamente, de 1 milhão de células germinativas presentes em um ovário de uma fêmea recém-nascida, somente 3.000 – 4.000 chegarão à puberdade. A grande maioria das CGP sofrerá atresia, e menos de 1% (~ 300 folículos) atingirá o estado ovulatório antes do esgotamento da reserva ovariana (OKTEM; OKTAY, 2008).

Quando as CGP chegam às gônadas primitivas ocorre o aumento da atividade mitótica das mesmas, as quais se diferenciam em oogônias. Essas oogônias passam por várias divisões mitóticas antes de iniciar a meiose. A atividade mitótica das oogônias é o principal determinante do *pool* de oócitos e junto com a atresia oogonial determinam a formação da reserva ovariana final. Nas últimas divisões mitóticas, antes do início da meiose, ocorre a formação de um sincício (ninhos de oogônias), em que as oogônias são interligadas umas as outras por suas membranas celulares e por uma ponte citoplasmática, a qual é formada por uma citocinese incompleta durante a divisão celular. Quando as oogônias estão conectadas por essas

pontes citoplasmáticas, a meiose se inicia simultaneamente, o que sugere que o início da meiose ocorre devido a uma melhor propagação do sinal favorecido pela formação dessas pontes. O início da síntese de DNA premeiótico marca o fim do estágio oogonial, e após esse evento as células germinativas passam a ser chamadas de oócitos primários (OKTEM; URMAN, 2010). Vale ressaltar que a entrada do oócito na primeira divisão meiótica começa bem antes da formação do folículo ovariano.

Em seguida, os oócitos perdem suas pontes intercelulares e são circundados por uma camada de células da pré-granulosa, as quais podem ser derivadas do mesonefro ou do epitélio da superfície ovariana (McNATTY et al., 2000). Uma vez que o oócito é circundado pelas células somáticas, ocorre uma parada da meiose no estágio de diplóteno da prófase I, também conhecido como estágio de vesícula germinativa da prófase I (oócito primário; PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998; SUH et al., 2002). Nessa fase as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência (SAWYER et al., 2002) juntamente com o oócito, dando início à foliculogênese, com a formação dos primeiros folículos ovarianos (Figura 2). A progressão da divisão meiótica ocorre somente na puberdade, com a liberação do pico pré-ovulatório de LH, formação dos oócitos secundários e outra parada da meiose na fase de metáfase II (HUTT; ALBERTINI, 2007). A meiose será retomada novamente somente após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, originando o oócito haploide fecundado, e marcando assim o fim da oogênese (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; FIGUEIREDO et al., 2008).

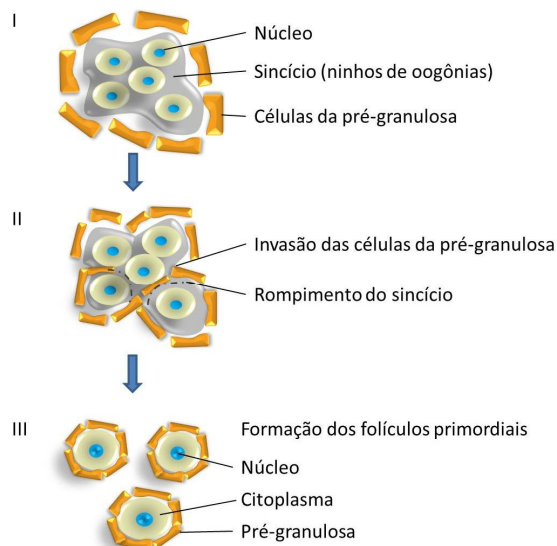


Figura 2. Formação de folículos primordiais. (I) Ninhos de células germinativas; (II) Invasão das células somáticas (pré-granulosa) causando o rompimento do sincício (ninho) acompanhado

por uma intensa apoptose oocitária; (III) as células germinativas sobreviventes, no estágio de prófase I (oócitos primários), são circundadas por uma camada de células da pré-granulosa e por uma membrana basal, formando os folículos primordiais. Adaptado de EPIFANO; DEAN, 2002.

### 2.3. Caracterização estrutural dos folículos ovarianos e regulação da foliculogênese

Como visto anteriormente, a unidade folicular é constituída por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e/ou tecais), que interagem entre si, promovendo a funcionalidade do folículo (Figura 3; EPPIG; WIGGLESWORTH; PENDOLA, 2002; MATZUK et al., 2002). Esse folículo é a unidade morfológica e funcional do ovário mamífero, o qual proporciona um ambiente ideal para a manutenção da sobrevivência, o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT; SMITZ, 2001).

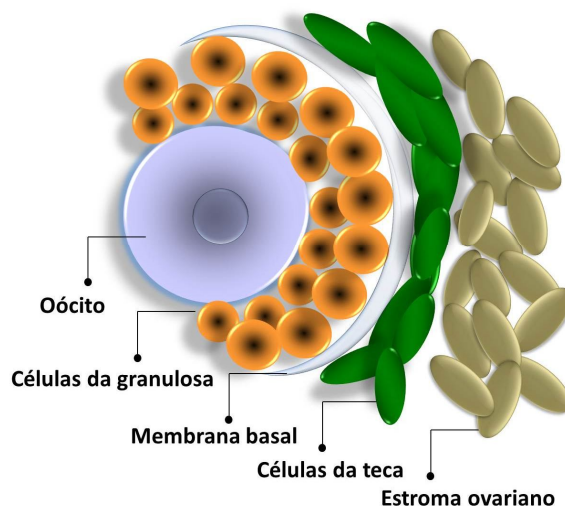


Figura 3. Desenho esquemático dos compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa e da teca) e o estroma ovariano.

Na maioria das espécies mamíferas, o desenvolvimento de folículos e oócitos passam por uma sequência de eventos característicos que inicia com a formação do ovário logo após a concepção e termina com a ovulação de um oócito fertilizável com núcleo em metáfase II após a puberdade, em um processo denominado foliculogênese (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; GOUGEON, 2010; ZHANG et al., 2010b).

Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e as células circundantes se multiplicam e diferenciam (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006), dando origem a diferentes tipos foliculares. De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados como pré-antrais ou não cavitários (primordiais, transição, primários e secundários) e antrais ou cavitários (terciários e pré-ovulatórios) (Figura 4; DRIANCOURT, 2001; SILVA et al., 2005). Vale ressaltar que os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular e são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006). A regulação do desenvolvimento folicular consiste hoje em um dos maiores enigmas relacionados à reprodução, haja vista que este é um evento complexo que envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Esses fatores são coordenados de maneira estágio-específica a fim de melhorar o entendimento da fisiologia ovariana e controlar os vários processos fisiológicos, entre eles a proliferação e diferenciação de células foliculares, esteroidogênese, vascularização e atresia folicular (WEBB et al., 2003; ACOSTA; MIYAMOTO, 2004; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

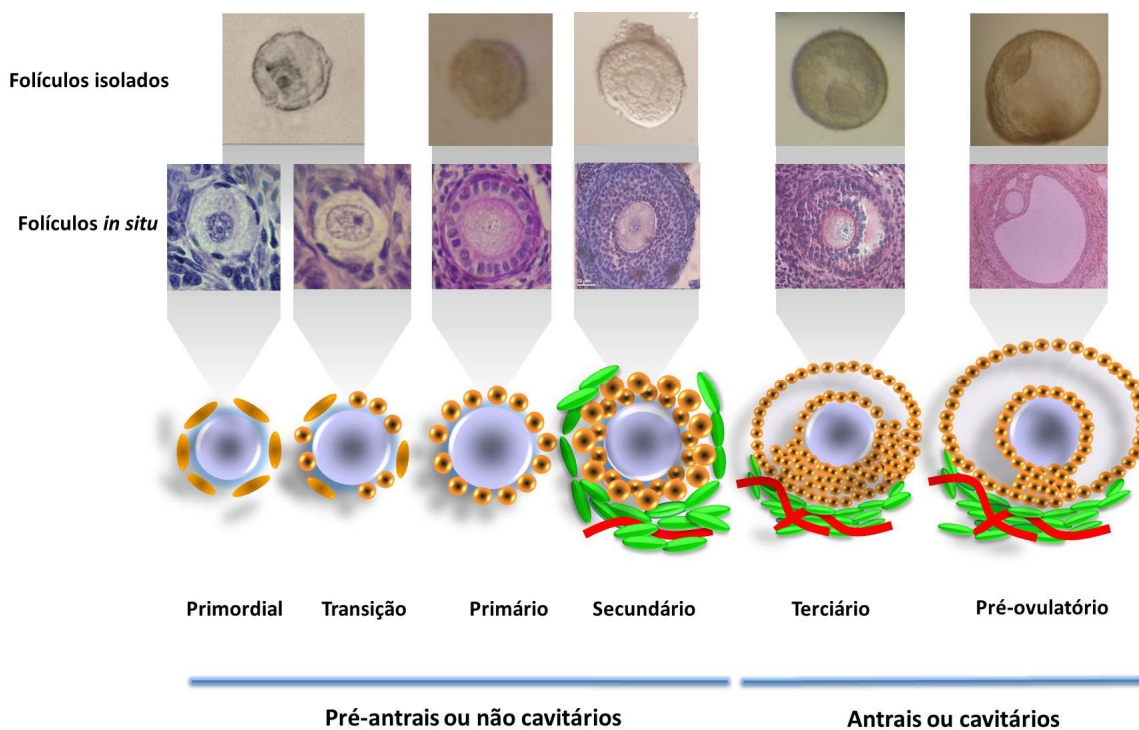


Figura 4. Classificação folicular de acordo com o grau de evolução, evidenciando os folículos inseridos no tecido ovariano (*in situ*) e os isolados.

Ao longo das últimas décadas, uma série de estudos trouxe avanços na compreensão da biologia das células germinativas e somáticas que compõem os folículos ovarianos. Tais estudos têm mostrado que o desenvolvimento folicular pode ser subdividido em fases distintas, caracterizadas por mudanças morfológicas, e por alterações no padrão de sinalização e de expressão gênica que determinam as diferentes necessidades foliculares em cada fase: a) de primordial para primário, b) de primário para secundário, c) de secundário para folículo terciário e d) destes para os folículos pré-ovulatórios.

### 2.3.1 Formação do folículo primordial

A foliculogênese se inicia com o recrutamento de células da pré-granulosa para o oócito, a fim de formar os primeiros folículos que aparecem nos ovários de mamíferos, os quais são denominados folículos primordiais (McLAUGHLIN; McLVER, 2009). Os folículos primordiais consistem de um oócito que se encontra na fase de diplóteno da meiose I, que é circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa (ADHIKARI; LIU, 2009). Estudos transcriptômicos em roedores têm identificado uma variedade de genes envolvidos na formação do folículo primordial, tais como o fator de linhagem germinal alfa (*Figa* ou *Fig1a*), as proteínas zona, as enzimas meiose-específicas e os fatores neurotróficos (OKTEM; URMAN, 2010).

O gene *Fig1a* é expresso pelo oócito durante o estágio embrionário (SOYAL; AMLEH; DEAN, 2000). Estudos mais recentes têm revelado que o *Fig1a* regula a foliculogênese inicial aumentando diversos outros genes, incluindo o *POU5F1*. O *POU5F1* (ou *OCT4*) é um fator transcricional cujo principal alvo não é conhecido e o papel dele na oogênese tem sido recentemente descrito (PANGAS; RAJKOVIC, 2006). Ele é expresso nas CGP até elas migrarem para a gônada primitiva e a expressão é então reprimida após o início da prófase I meiótica no oócito, voltando a ser reexpresso após o nascimento, o que coincide com o período de crescimento do oócito (PARFENOV et al., 2003). Pouco é conhecido sobre o papel do *POU5F1* no ovário pós-natal, contudo camundongos nocauteados para esse fator nas CGP demonstraram a sua importância na sobrevivência dessas células, uma vez que na sua ausência nenhum folículo foi encontrado no ovário, o que foi atribuído a uma apoptose prematura das CGP antes da colonização da gônada (KEHLER et al., 2004). Outro fator que vem demonstrando importância neste processo é o *LHX8*. Esse fator está envolvido no padrão de formação e sobrevivência do folículo primordial, sendo preferencialmente expresso no oócito

de camundongos fêmeas. Foi observado que camundongos fêmeas nocauteadas para esse fator perderam todos os folículos primordiais na primeira semana de vida (CHOI et al., 2008).

Outras substâncias importantes e que podem estar envolvidas na sinalização entre CGP e células somáticas no momento da formação dos folículos primordiais são as neurotrofinas. Essa afirmativa está baseada nas mudanças observadas no padrão de expressão da neurotrofina 4 e do seu receptor de alta afinidade (Trk) ao longo do desenvolvimento em oócitos de humanos e ovários murinos (ANDERSON et al., 2002). Estudos *in vitro* têm sugerido que o fator de crescimento do nervo (NGF) pode estar envolvido não apenas na inervação ovariana, mas também na formação folicular em ratas e camundongos fêmeas (OJEDA et al., 2000). Além disso, o NGF participa do processo de diferenciação de células mesenquimais, as quais darão origem aos folículos primordiais em camundongos fêmeas (DISSEN et al., 2001). A revisão de literatura apresentada no Capítulo 2 desta Tese abordará os detalhes sobre a ação do NGF na foliculogênese inicial.

Ainda não está completamente esclarecido a respeito de quando os folículos primordiais aparecem pela primeira vez no ovário. No entanto, alguns relatos mostraram que o primeiro folículo primordial em fetos humanos é formado em torno de 15-22 semanas de gestação, quando os oócitos são delimitados por uma única camada de células da pré-granulosa (MAHESHWARI; FOWLER, 2008). Este processo continua até logo após o nascimento (McGEE; HSUEH, 2000), e os oócitos que não estão inclusos em folículos primordiais são perdidos, presumivelmente por apoptose (PEPLING; SPRADLING, 2001).

Em ruminantes e primatas, a formação de folículos primordiais, os quais representam 95% do total de folículos pré-antrais presentes no ovário, começa durante o desenvolvimento fetal e ocorre durante um longo período de tempo (FORTUNE et al., 2000; SMITZ; CORTVRINDT, 2002). Em caprinos especificamente, esse processo ocorre por volta do 62º dia de vida fetal (JUENGEL et al., 2002a). Em contraste, em ratos e camundongos, a formação de folículos primordiais ocorre dentro de poucos dias após o nascimento (HIRSHFIELD, 1991).

A ativação de alguns folículos primordiais começa logo após a sua formação, o que dá origem a primeira onda de folículos antrais por volta do 15º dia pós-parto em ratos e camundongos (HIRSHFIELD, 1991). Segundo ADHIKARI; LIU (2009), embora teoricamente todos os folículos primordiais tenham o potencial para crescer, amadurecer e ovular, isto não acontece na realidade, uma vez que cada folículo primordial pode ter três destinos possíveis: (i) permanecer em repouso, ou seja, em estágio de quiescência por diferentes períodos de tempo durante a vida reprodutiva, em que as células da pré-granulosa param de se multiplicar, até receberem estímulos para entrar no *pool* de crescimento, (ii) ser ativado e entrar para o *pool* de



folículos em crescimento, podendo numa fase posterior do desenvolvimento sofrer atresia ou ovulação; ou (iii) sair da quiescência direto para a atresia, contribuindo para o envelhecimento reprodutivo feminino (McGEE; HSUEH, 2000; BROEKMANS et al., 2007). Uma vez formado, o *pool* de folículos primordiais serve como uma fonte de desenvolvimento de folículos e oócitos que declina com a idade (HANSEN et al., 2008).

### 2.3.2. Transição de folículos primordiais para primário

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da passagem dos folículos quiescentes para as diferentes fases de crescimento (transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório) (RÜSSE, 1983), sendo considerado o maior evento biológico que controla o potencial reprodutivo das fêmeas (McLAUGHLIN; McIVER, 2009). As características morfológicas que marcam o início do crescimento dos folículos primordiais incluem o aumento do diâmetro oocitário, proliferação das células da granulosa e transformação da morfologia destas células de pavimentosas para cúbicas. Durante esta fase, os folículos que apresentam uma camada com células da granulosa pavimentosas e cúbicas são denominados folículos de transição (SILVA et al., 2004b). A diferença na morfologia das células da granulosa pode ser devido à sua origem, isto é, originadas a partir do epitélio germinativo ou mesonefro (McNATTY et al., 2000; JUENGEL et al., 2002b) ou mesmo do processo de ativação folicular. Quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos são denominados primários (GOUGEON; BUSSO, 2000). As substâncias e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais são pouco conhecidos. Acredita-se que este processo seja regulado por um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios originários do ovário (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

O recrutamento inicial do folículo primordial do *pool* de reserva é um processo independente de gonadotrofinas, em que o folículo poderá se desenvolver até o estágio antral, no qual se tornará dependente de FSH. Diversos estudos moleculares com supressão de genes e ainda, avaliações no transcriptoma de ovários em diferentes estágios de desenvolvimento, têm dado suporte ao fato de que mecanismos de supressão do crescimento folicular influenciam a manutenção da dormência dos folículos primordiais (FORTUNE et al., 1998; O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; SCHMIDT et al., 2004). Dentre os fatores estudados, podem ser citados um supressor de tumor chamado TSC1 que está envolvido na manutenção da quiescência do folículo primordial. A proteína TSC1 é parte de um heterodímero (TSC1/TSC2)

que inibe a ativação de um complexo de proteínas quinase (mTORC) que por sua vez, atua no crescimento celular (ADHIKARI et al., 2010). A supressão da atividade do complexo mTORC pelo gene *TSC1-TSC2* nos oócitos, é essencial para a manutenção da quiescência. Por outro lado, a elevada atividade do mTORC1 no oócito é necessária para a ativação folicular em camundongos fêmeas (ADHIKARI; WALL; ADAMS, 2009). De maneira semelhante ao TSC1, o PTEN (homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10) foi identificado como inibidor da ativação de folículos primordiais. Este fator atua como regulador negativo da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), a qual está relacionada com o crescimento folicular (REDDY et al., 2008). Além destes, outros fatores supressores de tumores parecem estar envolvidos, como o *Foxo3a* (*Forkhead transcription factor*) (LIU et al, 2007) e o *Foxl2* (*Forkhead box L2*), que é importante para a diferenciação de células da pré-granulosa em células da granulosa durante a ativação folicular (REDDY; ZHENG; LIU, 2010), e o hormônio Anti-Mülleriano (AMH).

O AMH é um membro da superfamília do fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que tem sido correlacionado com o número de folículos antrais no ovário e o número de oócitos recuperados nos programas de reprodução assistida em humanos sendo, portanto, considerado um importante marcador da reserva ovariana (EBNER; MOSER; TEWS, 2006). O AMH é liberado a partir de células da granulosa de folículos em crescimento e promove a inibição, mas não o bloqueio completo, da ativação de folículos primordiais para o *pool* de folículos em crescimento (DURLINGER; VISSER; THEMME, 2002). Essa hipótese foi confirmada quando se verificou que em camundongos fêmeas, a supressão do gene para AMH promoveu uma depleção significativa dos folículos primordiais (DURLINGER et al., 1999).

Além dos sinais inibitórios que bloqueiam a ativação prematura dos folículos primordiais, existem outros sinais que estimulam a transição de folículos primordiais para primário, como o gene *Nobox* (*newborn ovary homeo-box*), o qual é expresso em células germinativas (RAJKOVIC et al., 2004). Um estudo utilizando ratas com nocaute para o gene *Nobox* indicou a importância desse gene na ativação, uma vez que sua ausência interrompeu a transição dos folículos primordiais para o estágio primário (RAJKOVIC et al., 2004). Com ações coordenadas e sinérgicas, os sinais decorrentes dos diferentes compartimentos foliculares, como oócitos e células somáticas (granulosa e teca), e ainda do estroma ovariano, iniciam o crescimento dos folículos primordiais. Isto pode explicar o motivo pelo qual os folículos primordiais não sobrevivem quando cultivados isoladamente, mas crescem quando cultivados inclusos no tecido ovariano (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003).

Dentre os fatores estimulatórios, o Kit ligand (KL) produzido pelas células da granulosa e seu receptor c-kit, expresso no oócito e células da teca (NILSSON; KEZELE; SKINNER, 2002; NILSSON; SKINNER, 2004), compõem um sistema de grande importância para a promoção da ativação folicular. Além de estimular a ativação, o KL promove o crescimento do oócito, bem como o recrutamento e a proliferação das células da teca do estroma circundante (NILSSON; SKINNER, 2004). O papel do sistema KL na ativação folicular foi confirmado após a injeção de anticorpos contra o c-kit (YOSHIDA et al., 1997) em camundongos fêmeas recém-nascidas em que o crescimento folicular foi inibido, bem como após o cultivo de ovários de ratas na presença do KL ou de anticorpos contra o c-kit (PARROTT; SKINNER, 1998). Aliado a isto, um estudo recente realizado na espécie caprina evidenciou o papel do KL (50 ng/mL) na ativação folicular, bem como na manutenção da integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro* (CELESTINO et al., 2010a). Além destas evidências, tem sido descrito que o AMH reduz a expressão de c-kit em ratas (NILSSON; ROGERS; SKINNER, 2007), mostrando que o sistema KL/c-kit desempenha um papel fundamental, se não central, no início do crescimento folicular.

Da mesma forma, vários membros da superfamília TGF- $\beta$ , como as proteínas morfogenéticas ósseas -4, -7 e -15 (BMP-4, -7 e -15) expressas por células do estroma ovariano e/ou células da teca (LEE et al., 2001; NILSSON; SKINNER, 2003) e o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) expresso em oócitos (VITT et al., 2000) tem um papel importante na ativação folicular, uma vez que seu efeito tem sido demonstrado sobre a transição de folículos primordiais para primários em camundongos fêmeas (MOORE; SHIMASAKI, 2005) e cabras (CELESTINO et al., 2011). Além disso, estudos têm mostrado que injeções de BMP-7 na bursa ovariana de ratas reduziram o número de folículos primordiais e concomitantemente aumentaram o número de folículos primários, secundários e antrais (LEE et al., 2004). Tendo em vista que a BMP-7 é produzida pelas células da teca, tais resultados deixam clara sua ação parácrina sobre as células da granulosa de folículos em crescimento. Ovelhas com mutações inativadoras no gene *Bmp-15* são inférteis, tendo o desenvolvimento bloqueado em estágio de folículo primordial (HANRAHAN et al., 2004). As células tecais/intersticiais produzem BMP-4 e a exposição de ovários a anticorpos neutralizantes para BMP-4 resultou em redução do volume dos ovários, acompanhada da perda progressiva de folículos primordiais, e aumento da apoptose celular (NILSSON; SKINNER, 2003).

Outros fatores de crescimento e citocinas que atuam a nível parácrino na formação de folículos primários, tais como o fator inibidor de leucemia (LIF), expresso em células da granulosa e agem sobre o oócito, bem como sobre outras células da granulosa (NILSSON;

KEZELE; SKINNER, 2002). LIF também pode estimular a proliferação das CGP, o crescimento do oócito e recrutamento das células da teca do tecido circundante do estroma (NILSSON; KEZELE; SKINNER, 2002; NILSSON; SKINNER, 2004).

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF, também conhecido como fator de crescimento de fibroblastos-7, FGF-7) derivado das células da teca e estroma e o FGF-2 (também conhecido como fator de crescimento de fibroblastos básico) têm sido implicados como reguladores positivos da transição dos folículos primordiais para primários, em que exercem seus efeitos regulando a expressão de KL nas células da granulosa (NILSSON; SKINNER, 2004; KEZELE; NILSSON; SKINNER, 2005). Além dessas, outras substâncias, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF; NILSSON; DETZEL; SKINNER, 2006), ativina (OKTAY et al., 2000), o fator neurotrópico derivado da glia (GDNF, DOLE; NILSSON; SKINNER, 2008), as neurotrofinas (NGF, neurotrofina tipo 5 [NTF5] e fator neurotrófico derivado do cérebro [BDFN]; ROMERO et al., 2002; SPEARS et al., 2003; PAREDES et al., 2004; DOLE; NILSSON; SKINNER, 2008), o fator de crescimento epidermal (EGF; CELESTINO et al. 2009b) e o hormônio insulina (KEZELE; NILSSON; SKINNER, 2002) podem estimular o início do crescimento folicular. Nesse contexto, as revisões de literatura apresentadas nos Capítulos 3 e 5 desta tese abordarão os detalhes sobre a ação da família FGF e da insulina, respectivamente, na foliculogênese inicial.

### *2.3.3. Progressão do folículo primário para secundário*

Com a expansão mitótica das células da granulosa, o folículo primário com uma única camada de células de formato cúbico é transformado em folículos com multicamadas de células da granulosa de morfologia cúbica circundando o oócito, também conhecido como folículo secundário. No entanto, a passagem de folículo primário para secundário não é caracterizada apenas pela proliferação das células da granulosa, mas por uma série de outros eventos como o aumento no tamanho e conteúdo proteico do oócito, formação de lâmina basal, da zona pelúcida e da camada de células da teca (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; KNIGHT; GLISTER, 2006). Durante esta fase, o diâmetro do folículo aumenta de 40-60  $\mu\text{m}$  no estágio primário para 120-150  $\mu\text{m}$  no estágio secundário. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia. Com o desenvolvimento dos folículos, também aumenta o número de microvilos e inicia-se a formação da zona pelúcida (LUCCI et al., 2001). Neste estágio, o oócito entra em fase de crescimento intensivo aumentando seu volume como resultado do acúmulo de água, íons, carboidratos, proteínas e lipídeos (FAIR et al., 1997), as

células da granulosa ao redor se proliferam e uma camada de células da teca se desenvolve em torno das células da granulosa, a partir de células do estroma intersticial. Após a formação da camada da teca, já se inicia a formação de vasos sanguíneos. Além disso, ocorre a formação de uma extensiva rede de junções do tipo *gap*, que são canais membranários que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundo mensageiros e pequenos metabólitos entre as células da granulosa e os oócitos, projetando-se através da zona pelúcida, chegando à membrana plasmática do oócito (JUENEJA et al., 1999; KIDDER; MHAWI, 2002). Uma complexa organização citoplasmática é necessária e depende tanto da formação de produtos de genes novos e organelas, como da modificação e redistribuição daquelas já existentes (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). Dessa forma, como consequência do aumento da síntese de RNAm e de proteínas, o número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas celulares aumentam nos oócitos em crescimento. Além disso, muitas organelas mudam sua aparência e se movem para a periferia do oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Essa progressão parece ser controlada, tanto por peptídeos e hormônios esteroides, bem como por fatores de crescimento intraovarianos (FORTUNE, 2003; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

À medida que o folículo cresce, a camada de células da teca se estratifica e se diferencia em duas partes. A parte externa, denominada teca externa, é composta de células não diferenciadas, enquanto que as células localizadas mais internamente formam a teca interna, na qual algumas células precursoras de fibroblastos diferenciam-se e passam a secretar esteróides (GOUGEON, 2010). As células da teca interna são definidas quando os folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa (LUCCI et al., 2001). Desta forma, o surgimento da camada de célula da teca no estágio de folículo secundário é um importante evento fisiológico para o desenvolvimento folicular inicial, evidenciado por: (i) concomitante organização da camada de células da teca e crescimento do folículo além de adquirir resposta esteroidogênica às gonadotrofinas (WANDJI; EPPIG; FORTUNE, 1996; GUTIERREZ et al., 2000); (ii) aumento no suprimento sanguíneo pelas células da teca o qual contém reguladores ovarianos para o desenvolvimento do folículo (GOUGEON, 1996; BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997); e (iii) aumento na produção de andrógenos pela aromatização tecal para biossíntese de estrógeno pelas células da granulosa e teca (VENDOLA et al., 1998; WEIL et al., 1999; WANG et al., 2001).

Em primatas e ruminantes, o desenvolvimento de um folículo secundário é um processo demorado que leva meses para ser concluído. Este lento processo, parece não ser mediado pela ação das gonadotrofinas, mas existe uma grande divergência sobre este fato. Embora folículos primários e secundários já expressem os receptores para FSH nas células da granulosa

(OKTAY; BRIGGS; GOSDEN, 1997), essa gonadotrofina desempenha apenas um papel responsivo, ao invés de essencial, ao desenvolvimento desses folículos. Por outro lado, o FSH aumentou a sobrevivência de enxertos de ovário transplantado em camundongos hipogonadais imunodeficientes e induziu o crescimento folicular até o estágio antral (OKTAY et al., 1998).

O GDF-9 e a BMP-15 têm se mostrado essenciais para formação de folículos secundários, uma vez que animais geneticamente deficientes para esses fatores apresentaram um bloqueio do desenvolvimento folicular além do estágio de primário (McNATTY et al., 2007; GOUGEON, 2010). Na espécie caprina, estudos recentes em folículos pré-antrais confirmaram a importância da atuação tanto da BMP-15 (CELESTINO et al., 2011) como do GDF-9 (MARTINS et al., 2008) na progressão de folículos primários até o estágio secundário *in vitro*, destacando ainda os efeitos positivos destes dois fatores de crescimento sobre a manutenção da viabilidade folicular durante essa fase.

Outras substâncias ainda têm se mostrado importantes para essa fase. YANG; FORTUNE (2007) mostraram após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos, que a testosterona e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) também podem influenciar a transição de folículos primários para secundários. Dentre as neurotrofinas, o NGF parece ser um bom candidato para estimular o desenvolvimento folicular inicial, inclusive de folículos secundários. Na presença de FSH em níveis normais no soro, ovários de camundongos fêmeas deficientes para o NGF exibiram uma marcada redução no número de folículos primários e secundários, sendo a proliferação das células da granulosa extremamente reduzida após cultivo *in vitro* de biópsias ovarianas desses camundongos fêmeas (DISSEN et al., 2001).

Conforme observado em folículos primordiais, o AMH parece desempenhar um papel inibitório no desenvolvimento de folículos primários e secundários. De fato, em camundongos fêmeas, o AMH inibiu o crescimento *in vitro* de folículos secundários induzido pelo FSH (DURLINGER et al., 2001). Além disso, estudos em humanos demonstraram que a expressão do AMH é primeiramente detectada em células da granulosa de folículos primários e que o maior nível de expressão deste hormônio é observado em células da granulosa de folículos secundários e pequenos folículos antrais ( $\leq 4$  mm de diâmetro) (VISSER; THEMME, 2005), sugerindo um efeito negativo do AMH no desenvolvimento do folículo secundário (OKTEM; URMAN, 2010).

#### 2.3.4. Progressão do folículo secundário para terciário (antral)

Após os folículos secundários atingirem um diâmetro de 200  $\mu\text{m}$ , normalmente, eles entram na fase antral. É nesta fase que o folículo começa a exibir alguns espaços cheios de líquido entre as camadas das células da granulosa, que vão se unir para formar a cavidade antral. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. Aliado a isso, ocorrem o aumento da vascularização da camada da teca, o crescimento contínuo dos oócitos e a proliferação de células da granulosa e da teca (KNIGHT; GLISTER, 2006). O fluido folicular que caracteriza os folículos antrais pode servir como uma importante fonte de substâncias regulatórias ou moduladoras derivadas do sangue ou das secreções de células foliculares, como por exemplo, água, gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanos e lipoproteínas, dentre outras substâncias (BARNETT et al., 2006). Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento no número e na permeabilidade dos vasos sanguíneos foliculares. Contudo, embora alguns dos mecanismos de desenvolvimento da cavidade antral sejam conhecidos, os sinais para formação do antro ainda não foram plenamente elucidados (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

O crescimento dos folículos secundários é primariamente controlado pelos reguladores intraovarianos (fatores de crescimento, citocinas e esteroides gonadais) e não são dependentes de gonadotrofinas (HALPIN et al., 1986). Apesar destes folículos possuírem RNAm para receptores de FSH nas células da granulosa e vários experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstrarem que o número de folículos secundários, seu tamanho, número de células e taxa de atresia são influenciados pelas gonadotrofinas (VAN DEN HURK et al., 2000; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Diversos fatores locais, como ativina (YOKOTA et al., 1997), EGF (ROY; TREACY, 1993), TGF- $\beta$  (LIU et al., 1999), FGF-2 (PARROTT et al., 1994), VEGF (BRUNO et al., 2009a), fator de crescimento de hepatócitos (HGF; PARROTT et al., 1994), GDF-9 (HAYASHI et al., 1999), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I; MARTINS et al., 2010a) e BMPs (OTSUKA et al., 2000) foram considerados estimuladores da sobrevivência e desenvolvimento de folículos secundários em várias espécies de roedores e animais domésticos, já que a supressão destes favorece a apoptose celular e interfere na proliferação e diferenciação das células da granulosa em estudos *in vitro* (VAN DEN HURK et al., 2000; ZHAO, 2000; CAMPBELL, 2009).

O hormônio do crescimento (GH) é outro fator endócrino que pode promover o desenvolvimento de folículos secundários. A presença de RNAm para o receptor de GH tem sido detectada em todos os compartimentos de folículos pré-antrais de ratas (ZHAO et al.,

2002). Estudos *in vitro* usando GH têm demonstrado que esse fator desempenha um importante papel controlando as fases iniciais do desenvolvimento folicular. A adição de GH ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais estimulou a produção de estradiol e a proliferação das células da granulosa e da teca em murinos (KOBAYASHI et al., 2000), além de promover um aumento no diâmetro de folículos pré-antrais de camundongos fêmeas cultivados *in vitro* (KIKUCHI et al., 2001). Recentemente, MAGALHÃES et al. (2011) demonstraram que o GH estimula o desenvolvimento de folículos secundários caprinos, favorecendo a formação do antro e a posterior maturação oocitária.

#### 2.3.5. Crescimento folicular após estágio antral e o processo de seleção e dominância

O desenvolvimento dos folículos antrais pode ser subdividido nas fases de recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade nas fêmeas (DRUMMOND, 2006). O crescimento cíclico de uma coorte de pequenos folículos antrais é conhecido como recrutamento folicular. Esse recrutamento dos folículos antrais e o seu crescimento sincronizado em ondas foliculares são induzidos pelas gonadotrofinas (FORTUNE et al., 2001). A emergência de cada onda folicular é precedida por um aumento no FSH circulante, que pode ser uma onda que culmine ou não com a ovulação (onda ovulatória ou não ovulatória), a depender da fase do ciclo estral em que ocorre o aumento do FSH (BAERWALD et al., 2009).

Com a progressão do desenvolvimento dos folículos antrais, o FSH torna-se criticamente determinante para o crescimento e a sobrevivência dos folículos, os quais passam a ser dependentes desta gonadotrofina. A partir deste ponto, será a concentração de FSH circulante disponível que determinará se o folículo sofrerá atresia ou continuará o seu desenvolvimento até os estágios antrais tardios. Este é o primeiro processo de seleção no qual o folículo é submetido após sair do estágio quiescente (BAKER; SPEARS, 1999). No entanto, como o número de folículos que continuam o desenvolvimento após a seleção ainda é maior do que o número que irá ovular, outro processo seletivo deverá ocorrer. O novo desafio que o folículo será submetido envolve o surgimento de um folículo dominante entre a coorte de folículos em desenvolvimento (BAERWALD et al., 2003).

Nessa fase final do desenvolvimento folicular, ocorre uma diminuição dos níveis circulantes de FSH em resposta ao alto nível de estradiol e inibina produzidos pelo folículo e observa-se então a formação do folículo pré-ovulatório, o qual é caracterizado por um oócito



circundado por células da granulosa especializadas, denominadas de células do cumulus e com um maior número de receptores para FSH. Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente durante a puberdade (DRIANCOURT, 2001). As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao hormônio luteinizante (LH) e iniciam o programa final de diferenciação. Algumas horas antes da ovulação e, em resposta a fatores angiogênicos (WULFF et al., 2001), as células da granulosa murais, que eram avasculares, começam a ser invadidas por vasos sanguíneos provenientes da teca. Além disso, o LH (pico pré-ovulatório) provoca um declínio significativo nas junções *gap* (AMSTERDAM, 1987), e em associação com a prostaglandina E (PGE), BMP-15 e GDF-9 leva à dissociação entre as células da granulosa murais e as células do cumulus, culminando com a expansão do complexo cumulus-oócito (CCO) e a maturação oocitária (HERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2006; GUERIPPEL; BRUN; GOUGEON, 2006; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

Dessa forma, o destino dos folículos ovarianos durante todo o desenvolvimento folicular é determinado pelo equilíbrio entre diversos processos estimulatórios e inibitórios. A Figura 5 ilustra resumida e esquematicamente os diferentes fatores envolvidos na formação e no crescimento folicular.

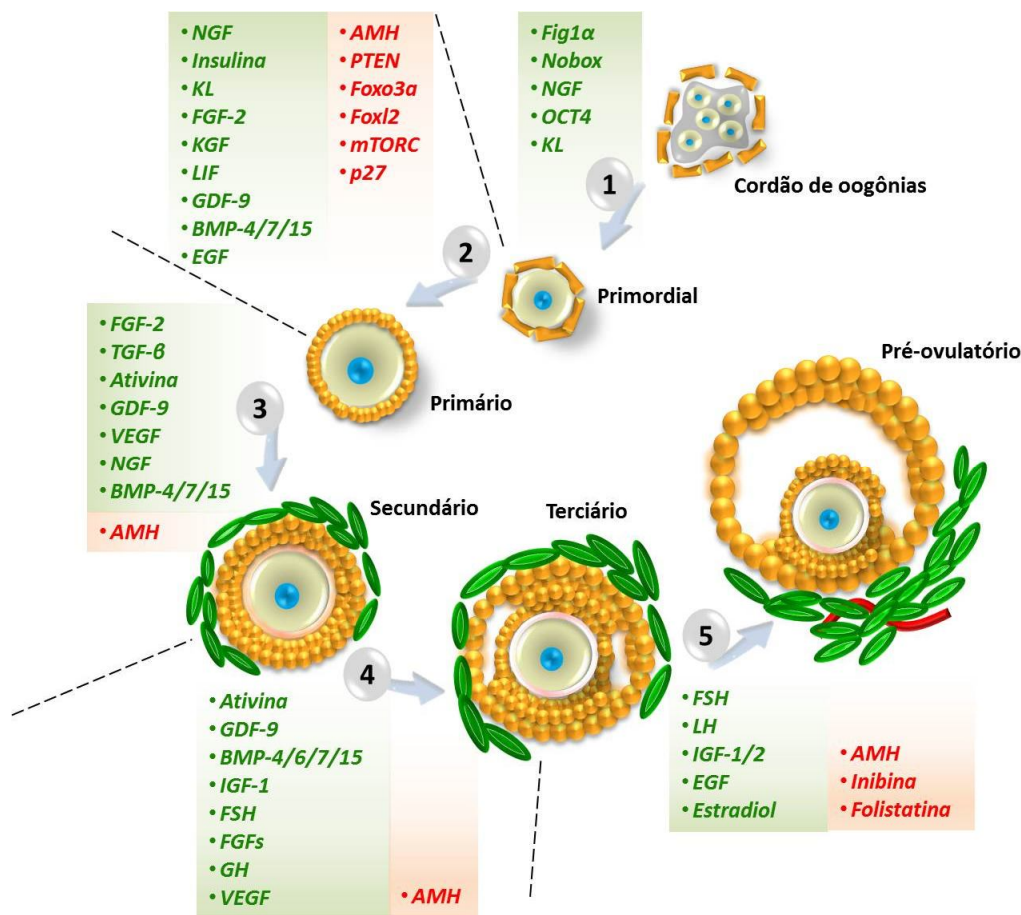


Figura 5. Representação dos fatores estimulatórios (em verde) e inibitórios (em vermelho) que atuam em diferentes etapas do desenvolvimento folicular: 1) formação dos folículos primordiais, 2) de primordial para primário, 3) de primário para secundário, 4) de secundário para antral e 5) destes para os folículos pré-ovulatórios).

#### 2.4. População e atresia folicular

A quantidade total de folículos presente no ovário de um mamífero é definida na vida intrauterina em primatas e ruminantes (KNIGHT; GLISTER, 2006) ou em breve período após o nascimento em roedores (OJEDA et al., 2000). Apesar de este conceito ter sido descrito desde 1870 por Waldeyer e vigorar há mais de 150 anos (BYSKOV et al., 2005), trabalhos desenvolvidos na última década têm demonstrado mecanismos envolvidos na formação, após o nascimento, de novas células germinativas e folículos na mulher (BUKOVSKY et al., 2005) e camundongos fêmeas adultas (JOHNSON et al., 2004). Esses autores demonstraram indícios da continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, pela atuação de células-tronco. Para BUKOVSKY et al. (2005), a renovação folicular pós-natal ocorre regularmente em

mulheres, mas a origem das células-tronco para tal não seria a medula óssea, e sim células germinativas presentes na superfície do epitélio ovariano. No entanto, devido aos resultados controversos até o momento, mais trabalhos sobre esse assunto são necessários para esclarecer esse fenômeno.

Independente disto, a população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma forte variação individual (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), sendo de aproximadamente 1.500 em camundongo fêmea (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000); 20.000 na cabra (BEZERRA et al., 1998); 33.000 na ovelha (AMORIM et al., 2000) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). Durante a vida reprodutiva das fêmeas, ocorre uma redução ordenada no número de folículos pré-antrais (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000). Essa redução é devido a dois fenômenos que ocorrem naturalmente no ovário: (i) a ovulação e (ii) a atresia ou morte folicular. Somente uma pequena parte (0,1%) dos folículos primordiais chega à ovulação (NUTTINCK et al., 1993), pois a maioria (99,9%) torna-se atrésica durante as fases de crescimento e maturação oocitária (OTALA et al., 2002).

O processo de atresia usualmente ocorre de forma diferenciada entre folículos pré-antrais e antrais. Em folículos pré-antrais, os primeiros sinais de morte folicular surgem no oócito, onde se pode observar a retração da cromatina nuclear e a fragmentação oocitária (SILVA et al., 2002). Após a formação do folículo antral ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa (JORIO et al., 1991).

A atresia, apesar de causar a perda de vários folículos ovarianos, é um evento crucial para manutenção da homeostase ovariana em mamíferos (para revisão veja CELESTINO et al., 2009a), assegurando a ciclicidade dos animais e prevenindo o desenvolvimento de múltiplos embriões durante a gestação (AMSTERDAM et al., 2003). É um fenômeno natural, comum a todas as espécies domésticas, e acomete folículos em qualquer fase do desenvolvimento, sendo mais comum nos estágios antrais mais avançados (GLAMOCLIJIA et al., 2005) e pode ocorrer por via apoptótica ou degenerativa (MARKSTRÖM et al., 2002).

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo determinado geneticamente, ou seja, depende da expressão de genes pró- e antiapoptóticos e tem como característica marcante a fragmentação do DNA a cada 180-200 pares de base e a formação de corpos apoptóticos (RACHID et al., 2000; HUSSEIN, 2005). De acordo com o estímulo inicial, a apoptose pode ocorrer através de receptores de superfície celular (receptores de morte), constituindo a via extrínseca, ou ainda através da mitocôndria com liberação de

citocromo c, constituindo esta a via intrínseca (JOZA et al., 2002). Independente da via, duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: a família das caspases e a família Bcl-2. As caspases são consideradas as executoras principais da via apoptótica e atuam ativando DNases, que são endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal a cada 180-200 pares de bases.

A progressão da apoptose pode ser dividida nas fases de iniciação, execução e terminação. A fase de iniciação pode ser promovida por fatores extrínsecos, tais como citocinas, ativação de genes promotores de apoptose e proteínas virais ou pela remoção de fatores de crescimento. A morte celular também pode ser induzida por fatores intrínsecos, tais como o estresse oxidativo ou irradiação. Independentemente dos tipos de fatores envolvidos, ocorre o envolvimento de uma ou mais caspases de iniciação (caspase 8 e 9) (JOHNSON; BRIDGHAM, 2002). A fase de execução é caracterizada por mudanças na membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação do DNA. Esta fase é considerada irreversível e ocorre devido à ativação das caspases efetoras (caspase 3, 6 e 7). Finalmente, a fase de terminação consiste na fagocitose de corpos apoptóticos fragmentados através de um processo não inflamatório (CELESTINO et al., 2009a). No sentido de evitar a morte celular por apoptose, existem processos de sobrevivência celular que promovem a transcrição de várias proteínas anti-apoptóticas, tais como alguns membros da família Bcl-2, que bloqueiam a progressão da apoptose em diferentes etapas ao longo deste processo (JOHNSON, 2003). A família Bcl-2 compreende tanto membros anti-apoptóticos, como o Bcl-2 e membros pró-apoptóticos, incluindo Bax, Bid, Bik (MARKSTROM et al., 2002).

A degeneração por necrose é considerada uma forma não programada de morte celular, iniciada devido a algum estímulo intenso e de curta duração que resulta na quebra da homeostasia celular (BRAS et al., 2005). Ocorre por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência de níveis de ATP (BATHIA, 2004) ou trauma, levando a danos irreversíveis na célula (McCULLY et al., 2004). Em injúrias isquêmicas e/ou hipóxicas, a depleção de energia ocorre devido a uma produção de ATP deficiente associada a um rápido consumo dessa molécula pelas bombas  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , bem como devido à sua hidrólise e perda. O aumento do volume celular associado com a morte por necrose é iniciado com a entrada de  $\text{Na}^+$  e liberação de ATP devido à ruptura da membrana folicular (PADANILAM, 2003). Severas depleções de ATP levam a falhas no mecanismo de balanço da bomba de íons, levando a um influxo de  $\text{Na}^+$  e água, o qual resulta no aumento do volume intracelular, cariólise e lise da célula. Em virtude do envolvimento de elevado número de grupos celulares e da perda precoce dos componentes

citoplasmáticos para o espaço extracelular, a necrose geralmente resulta em resposta inflamatória intensa (CARINI et al., 1995).

Diante disso, visando evitar a enorme perda folicular pela atresia, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários modelos de cultivo *in vitro* que possibilitam o estudo dos fatores que controlam a atresia e estimulam o crescimento folicular.

## 2.5. MOIFOPA - Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A MOIFOPA é uma biotécnica da reprodução que vem sendo aprimorada nos últimos tempos e consiste numa das principais ferramentas utilizadas atualmente para a elucidação da foliculogênese inicial. 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 e possibilitando sua utilização em outras biotécnicas como FIV, transgênese e clonagem (FIGUEIREDO et al., 2008). Para alcançar esse objetivo é necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular, considerando o sistema de cultivo a ser empregado, o método utilizado para o isolamento folicular, a espécie animal selecionada para o estudo, bem como a composição do meio.

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, também conhecido como ovário artificial, é uma importante etapa da MOIFOPA que vem sendo largamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes fases do desenvolvimento folicular, a fim de mimetizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário durante a foliculogênese (BOLAND et al., 2001; FORTUNE, 2003). Além disso, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma ferramenta que permite aperfeiçoar o conhecimento básico sobre os mecanismos envolvidos na foliculogênese ovariana (FIGUEIREDO et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2009; ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010).

Dessa forma, diversos sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos no sentido de promover o crescimento e garantir a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais *in vitro* (VAN DEN HURK et al., 2000b). Nesses sistemas de cultivo *in vitro*, os folículos ovarianos podem ser cultivados inclusos no próprio tecido ovariano (cultivo *in situ*) ou na forma isolada (cultivo isolado). Aliado a isto, pode ainda ser realizado um cultivo de dois passos associando esses dois sistemas de cultivo, em que é inicialmente realizado o cultivo dos folículos primordiais inseridos em fragmentos de tecido ovariano até a formação dos folículos

secundários e em seguida esses folículos secundários são isolados e cultivados *in vitro* até a formação dos folículos antrais (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; TELFER et al., 2008).

O cultivo de folículos pré-antrais no órgão inteiro foi descrito pela primeira vez em camundongos fêmeas. EPPIG; SCHROEDER (1989) comprovaram a eficácia deste sistema cultivando folículos de camundongos fêmeas em estágios iniciais por 10 dias antes da maturação *in vitro*, com obtenção de um animal nascido. 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). O'BRIEN et al., (2003) realizaram cultivo em dois passos e alcançaram uma taxa de 62% de retomada da meiose e 44% de metáfase II. Inicialmente, os folículos primordiais inclusos no ovário inteiro foram cultivados *in vitro* por 8 dias, e posteriormente os folículos crescidos após esse período foram isolados e cultivados até estágio antral, caracterizando desta forma o cultivo em dois passos. Estes autores obtiveram grande sucesso com a ativação *in vitro* de folículos primordiais e a partir de então, o modelo de cultivo em dois passos tem sido avaliado por diferentes grupos de pesquisadores (TELFER et al., 2008; JIN et al., 2010). Nesta espécie, o cultivo em dois passos possibilita a manutenção da interação celular entre o estroma e os folículos nos estágios mais iniciais garantindo uma boa ativação (JIN et al., 2010) e fornecendo em seguida um maior número de folículos secundários para a utilização em cultivos isolados (SMITZ et al., 2010).

Por outro lado, as grandes dimensões dos ovários de animais domésticos de médio e grande porte, não permite que estes sejam cultivados inteiros. Para estes animais, a primeira etapa do cultivo em dois passos pode ser mimetizada através o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano (TELFER; McLAUGHLIN, 2011), rico em folículos primordiais, uma vez que esse sistema tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos primordiais em diferentes espécies como caprinos (SILVA et al., 2004), bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) e humanos (SCOTT et al., 2004). Embora o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos seja prático, não requeira muito tempo para execução, mantenha a arquitetura tridimensional do folículo e preserve as interações entre folículos e células do estroma circundantes, o tecido cortical pode agir como uma barreira à perfusão do meio de cultivo, resultando em um crescimento de folículos primordiais somente até o estágio de folículo secundário (FORTUNE, 2003; MARTINS et al., 2008).

Já o cultivo *in vitro* de folículos isolados permite um monitoramento individual dos folículos ao longo do cultivo, além de favorecer uma melhor perfusão do meio para o folículo. No entanto, é um procedimento demorado que pode ser afetado pelo método de isolamento folicular (mecânico ou enzimático), além de ser aplicado normalmente para folículos

secundários e não para os folículos menores (primordiais e primários) (FIGUEIREDO et al., 2011b). Este sistema pode ser realizado de forma bidimensional (camundongo: 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 de tridimensional, na qual o folículo é incluso em uma matriz, como por exemplo, o colágeno (HIRAO et al., 1994) e o alginato (XU et al., 2006; WEST et al., 2007). O cultivo bidimensional pode ser realizado em microgotas de meio sob óleo mineral ou em placas de multiposos que requerem maior volume de meio, porém dispensam o uso de óleo. Já o cultivo tridimensional (em esferas) deve assegurar a manutenção da arquitetura tridimensional do folículo durante seu desenvolvimento *in vitro*, ser permeável ao meio permitindo o acesso dos hormônios e fatores de crescimento às células foliculares e ainda, permitir o crescimento folicular sem prejudicar sua forma (SMITZ et al., 2010).

Para ambos os sistemas de cultivo 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; camundongos fêmeas: PESTY et al., 2007). Apesar do método enzimático de isolamento ser mais prático, o método mecânico tem sido mais comumente adotado para o isolamento de folículos pré-antrais de ovários bovinos (ITOH et al., 2002), caprinos (ARUNAKUMARI et al., 2007), ovinos (AMORIM et al., 2000), ratas (ZHAO, 2000) e camundongos fêmeas (PESTY et al., 2007). Tal método tem proporcionado à recuperação de um grande número de folículos pré-antrais, sendo mais utilizado o isolamento pelo *tissue chopper* para recuperação de folículos menores que 150 µm de diâmetro (MARTINEZ-MADRID et al., 2004), a microdissecção para obtenção de folículos com diâmetro igual ou superior a 150 µm (LEE et al., 2007) ou ainda a associação de ambas as técnicas (GUPTA et al., 2008). Além disso, o isolamento mecânico mantém a integridade da estrutura folicular, a membrana basal permanece intacta após o procedimento e as interações oócito-células da granulosa-teca são mantidas (DEMEESTERE et al., 2002).

Embora diversos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tenham sido estabelecidos, em todos os protocolos, algumas características são comuns para otimizar o crescimento *in vitro*: o fornecimento de nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento (PICKTON et al., 2008). Diante disso, nossa equipe vem testando uma série de substâncias no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

### 2.5.1. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de córtex ovariano

Os primeiros estudos realizados com o cultivo *in situ* de folículos pré-antrais caprinos tiveram o intuito de estabelecer um meio de base que atendesse as necessidades dessa espécie. Uma solução a base de água de coco (SBAC), Meio Essencial Mínimo (MEM) e adição dessas duas substâncias foi inicialmente empregada para o cultivo de folículos pré-antrais caprinos, em que foi verificado que o MEM apresenta as melhores taxas de sobrevivência e ativação folicular (SILVA et al., 2004a). Ainda nesse estudo de SILVA et al., (2004a), foi observado que a adição de suplementos ao meio de base MEM, como hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina, e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio) foram considerados importantes para manter a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

Posteriormente, MATOS et al., (2006) testaram somente a auxina presente na água de coco, denominado ácido 3-indol acético (IAA), sobre os parâmetros de sobrevivência, ativação e crescimento de folículos de folículos pré-antrais caprinos. Embora o IAA a 20 ou 40 ng/mL tenha aumentado a ativação de folículos primordiais, estudos ultraestruturais não confirmaram a manutenção da integridade morfológica (MATOS et al., 2006).

Durante estes experimentos observou-se uma clara necessidade em determinar a melhor temperatura e tempo de transporte para ovários caprinos visando um posterior cultivo *in vitro*, em virtude do tempo gasto entre a coleta dos ovários e a chegada ao laboratório. CHAVES et al. (2008) ao testar diferentes tempos e temperaturas de transporte, verificaram que o transporte de fragmentos ovarianos resfriados a 4 °C por até 4 h mantêm a viabilidade e assegura o crescimento folicular durante o cultivo *in vitro* em comparação às temperaturas mais altas (20 e 35 °C).

A importância do uso de antioxidantes tais como o  $\alpha$ -tocoferol, ternatina e ácido ascórbico também foram investigados. Quando o  $\alpha$ -tocoferol e a ternatina foram estudados nas concentrações de 0, 5, 10 ou 15  $\mu$ M, verificou-se que esses antioxidantes não mantiveram a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados por 5 dias, bem como não tiveram efeito adicional sobre a ativação e o crescimento folicular (LIMA-VERDE et al., 2009). Por outro lado, o ácido ascórbico mostrou ser um importante antioxidante para o cultivo *in vitro* de folículos caprinos por um longo período (14 dias). Quando testado o ácido ascórbico em diferentes concentrações (50 ou 100  $\mu$ g/mL), sozinho ou associado ao FSH (50 ng/mL), foi verificado que a adição de 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico associado ao FSH manteve a



integridade folicular, além de promover a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos (ROSSETTO et al., 2009).

Devido ao fato de o soro ser uma substância rica em nutrientes, hormônios e fatores de crescimento, foi investigada a importância de diferentes origens (soro fetal bovino, soro de cabra em estro e em diestro) e concentrações (10 ou 20%) desta substância, no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Independente da origem ou concentração, o soro não manteve a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* por 7 dias, além de não ter mostrado efeitos adicionais sobre a ativação e o crescimento folicular (BRUNO et al., 2008).

Diante da importância dos hormônios e fatores de crescimento ovarianos para a regulação da foliculogênese, seus efeitos também foram investigados em muitos experimentos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Uma das substâncias mais estudadas em diversos grupos de pesquisa é a gonadotrofina FSH. Essa gonadotrofina na concentração de 50 ng/mL demonstrou manter a integridade morfológica, além de estimular a ativação de folículos primordiais e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos após 7 dias de cultivo (MATOS et al. 2007a). No entanto, o tipo e a origem do FSH podem influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular em caprinos. MAGALHÃES et al. (2009a) constataram que o Stimufol (Universidade de Liège, Liège, Bélgica) é capaz de preservar a ultraestrutura folicular, enquanto o Folltropin (Tecnopec, São Paulo, Brasil) é eficiente na promoção do crescimento folicular. Em outro estudo, as diferentes origens de FSH (pituitário e recombinante) em diferentes concentrações foram comparadas. Verificou-se que o FSH recombinante (FSHr) foi mais eficiente do que pFSH, uma vez que 50 ng/mL de FSHr manteve a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos, e ainda promoveu a ativação dos folículos primordiais e o posterior crescimento dos folículos cultivados por 7 dias (MAGALHÃES et al., 2009b). SARAIVA et al. (2008) demonstraram que o FSH (50 ng/mL) associado com uma baixa concentração de LH (1 ng/mL) também manteve a integridade ultraestrutural, mas altas concentrações de LH (5 ng/mL) associadas ou não ao FSH induziram a atresia.

Além das gonadotrofinas, outros hormônios como o estradiol (1, 5, 10, 20, 40 pg/mL; LIMA-VERDE et al., 2010a), GH (10 ng/mL; MARTINS et al., 2010b), insulina (10 ng/mL; CHAVES et al., 2011) apresentaram efeitos benéficos sobre a sobrevivência e o desenvolvimento folicular. Por outro lado, a androstenediona (1, 10, 50, ou 100 ng/mL) sozinha ou adicionada de FSH não apresentou nenhum efeito adicional sobre a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos (LIMA-VERDE et al., 2010b).

A influência de vários fatores de crescimento intraovarianos no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos também foi reportado. Muitas das moléculas sinalizadoras implicadas na regulação do início da foliculogênese já foram testadas por nossa equipe. Muitos desses fatores de crescimento são pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformante  $\beta$  (ativina, a folistatina, as BMPs -6, -7 e -15 e GDF-9), a família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-2, FGF-7 e FGF-10), neurotrofinas (VIP e NGF), além do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), KL, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator inibidor de leucemia (LIF). Os principais resultados obtidos com essas substâncias no cultivo de folículos pré-antrais caprinos foram sumarizados no quadro 1. Como podemos observar, apesar de folículos inclusos em tecido ovariano serem mantidos saudáveis, ativarem e crescerem, poucos desses folículos progridem até o estágio de folículo secundário. Na tentativa de melhorar tais resultados, outras substâncias, isoladamente ou em associação, por longo período de cultivo (16 dias) e de forma dinâmica vêm sendo testadas.

Quadro 1. Principais resultados obtidos pelo LAMOFOPA com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano.

Tratamento (substância/condição)	Duração do cultivo	Técnica para avaliação	Efeito/concentração	Referência
Água de coco	5 d	HC	Ausente	Silva et al., 2004b Martins et al., 2005
EGF + pFSH	5 d	HC e IHQ	Ausente	Silva et al., 2004a
IAA	5 d	HC e MET	Ativação e crescimento: 20 ng/ml	Matos et al., 2006
Ativina	5 d	HC	Sobrevivência e crescimento: 100 ng/ml	Silva et al., 2006
FGF-2	5 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 50 ng/ml	Matos et al., 2007a
FSH	7 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 50 ng/ml	Matos et al., 2007b
Soro fetal bovino/cabra estro	7 d	HC e MET	Ausente	Bruno et al., 2008
GDF-9	7 d	HC e MET	Sobrevivência e ativação: 200 ng/ml/ Folículos secundários (23%)	Martins et al., 2008
LH ou LH + pFSH	7 d	HC e MET	Sobrevivência e crescimento: 1 ng/ml (LH) ou 1 ng/ml (LH) + 50 ng/ml (FSH)	Saraiva et al., 2008
Temp. transporte (4, 20, 35°C)	7 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 4 °C por até 4 h	Chaves et al., 2008
A-tocoferol e ternatina	5 d	HC e MET	Ausente	Lima-Verde et al., 2009
VEGF	7 d	HC e MET	Sobrevivência: 200 ng/ml e Crescimento: 10 ng/ml	Bruno et al., 2009
EGF	7 d	HC e MET	Sobrevivência e ativação: 1 ou 10 ng/ml	Celestino et al., 2009
Ácido ascórbico com ou sem pFSH	14 d	HC e FLUO	Sobrevivência, ativação e crescimento: 50 µg/ml ácido ascórbico + FSH	Rossetto et al., 2009
FSH porcino x FSH recombinante	7 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 50 ng/ml FSHrec	Magalhães et al., 2009
KL	7 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 50 ng/ml	Celestino et al., 2010
VIP	7 d	HC e MET	Sobrevivência e crescimento: 10 ng/ml	Bruno et al., 2010
Estradiol sem ou com pFSH	7 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 1pg/ml estradiol + FSH	Lima-Verde et al., 2010a
IGF-1	7 d	HC e FLUO	Sobrevivência e ativação: 50 ng/ml	Martins et al., 2010b
GDF-9 + IGF-1 + GH	7 d	HC e FLUO	Sobrevivência, ativação e crescimento: interação GDF-9 (200 ng/ml); IGF-1 (50 ng/ml); GH (100 ng/ml)	Martins et al., 2010a
BMP-7	7 d	HC e MET	Sobrevivência: 1 ng/ml	Araújo et al., 2010
Androstenediona	7 d	HC e FLUO	Sobrevivência e ativação: 50 ng/ml	Lima-Verde et al., 2010b
NGF	7 d	HC, MET e FLUO	Sobrevivência: 1 ng/ml	Chaves et al., 2010a
FGF-10	7 d	HC, MET e FLUO	Sobrevivência e crescimento: 50 ng/ml	Chaves et al., 2010b
BMP-15	7 d	HC, MET e FLUO	Sobrevivência e crescimento: 100 ng/ml/ Folículos 2º (17%)	Celestino et al., 2011
KGF (FGF-7)	7 d	HC e MET	Sobrevivência: 1 ng/ml	Faustino et al., 2011
LIF	7 d	HC e FLUO	Sobrevivência e ativação: 10 e 50 ng/ml	Nobrega Jr. et al., 2011
Meio dinâmico: KL + FSHrec	16 d	HC e MET	Sobrevivência, ativação e crescimento: 50 ng/ml (ambos)	Lima et al., 2011
FGF-2 + pFSH	21 d	HC e MET	Sobrevivência e ativação: FSH (28 d; 50 ng/ml) Integridade ultraestrutural: FSH ou FSH + FGF-2 (7 d; 50 ng/ml)	Matos et al., 2011

Adaptado de CELESTINO, 2010b.

Nota: HC - histologia clássica; MET - microscopia eletrônica de transmissão; FLUO - microscopia de fluorescência.

### 2.5.2. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados

Paralelo aos experimentos com cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos, experimentos voltados para o cultivo de folículos pré-antrais isolados em categorias mais avançadas vêm sendo realizados, com o objetivo de manter a viabilidade, promover a formação da cavidade antral, estimular o crescimento e capacitar os oócitos inclusos nesses folículos a serem maturados e fecundados *in vitro*. Embora o número de resultados obtidos até o momento com esse sistema e nesta espécie ainda seja pequeno, bons resultados têm sido alcançados, inclusive com a obtenção dos primeiros embriões caprinos gerados a partir de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*.

Até pouco tempo, os melhores resultados haviam sido demonstrados por ZHOU; ZHANG (2000), que mostraram ser possível cultivar folículos primários e secundários caprinos isolados (50-150  $\mu\text{m}$  de diâmetro) até o estágio secundário e antral, respectivamente. Posteriormente, RAJARAJAN et al. (2006) demonstraram que o FSH estimulou o desenvolvimento de pequenos folículos pré-antrais, enquanto EGF, TGF- $\alpha$  e IGF-II estimularam o crescimento de pequenos (40–60  $\mu\text{m}$ ) e grandes (61–100  $\mu\text{m}$ ) folículos pré-antrais caprinos. No entanto, os avanços mais significativos no que se refere ao cultivo de folículos secundários caprinos (diâmetro  $\geq 150 \mu\text{m}$ ) foram obtidos recentemente através de estudos realizados pela equipe de FIGUEIREDO et al. (2011a). Tais resultados se encontram resumidos no quadro 2.

Os primeiros trabalhos executados por nossa equipe foram direcionados para o desenvolvimento de um meio de cultivo *in vitro* adequado para o crescimento dos folículos secundários e posterior maturação de seus oócitos, visando à produção de um grande número de oócitos aptos a serem fertilizados e produzirem embriões saudáveis. Para tanto, inúmeras substâncias foram testadas simultaneamente, de modo que os avanços obtidos eram incorporados imediatamente aos trabalhos em curso. De forma gradativa, foram obtidos resultados satisfatórios, os quais implicaram inicialmente na definição da melhor tensão de oxigênio (20%; SILVA et al., 2010) e no melhor intervalo de trocas de meio (a cada 2 dias para a espécie caprina; MAGALHÃES et al., 2011). A partir destes resultados, foi possível a obtenção de antro, crescimento folicular e oocitário e retomada de meiose dos oócitos provenientes de folículos pré-antrais caprinos (SILVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011).

Outro estudo testou ainda a influência de diferentes condições de troca de meio sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos cultivados por 18 dias. Nesse estudo

foi testado três diferentes regimes de troca: T1 (remoção de meio seguida da adição do mesmo volume de meio fresco a cada troca); T2 (somente adição de meio fresco a cada troca) e T3 (remoção de meio seguida da adição de 5 µl a mais de meio fresco a cada troca, ou seja, aumento de 5 µl do volume final em cada troca). Como conclusão, foi observado que embora o T3 tenha sido tão bom quanto o T2 no parâmetro de crescimento folicular, o T2 (adição periódica de meio) foi o procedimento recomendado por ser mais prático, manter a sobrevivência, além de promover o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, com uma superior percentagem de oócitos destinados à MIV quando comparado às demais condições (ARAÚJO et al., 2011).

A utilização do ácido ascórbico (50 µg/mL) também se mostrou muito importante para a manutenção da viabilidade e desenvolvimento após cultivo. Além disso, esse antioxidante pode ter participado do processo de remodelamento da membrana basal, devido a sua ação regulatória sobre a metaloproteinase 9 (SILVA et al., 2011). A albumina sérica bovina na concentração de 3 mg/mL foi responsável pela formação da cavidade antral, melhor desenvolvimento folicular e oocitário, com oócitos meioticamente competentes após 24 dias de cultivo *in vitro* (RODRIGUES et al., 2010b).

Outras formas de cultivo também foram testadas (individual ou em grupo, com ou sem FSH, na presença ou ausência de folículos antrais). DUARTE et al. (2010) observaram que na ausência do FSH, o cultivo de folículos pré-antrais em grupo (3 folículos por microgota) aumentou as taxas de sobrevivência e crescimento em relação aos folículos cultivados individualmente por 24 dias. Por outro lado, na presença de FSH (1000 ng/mL), esses parâmetros não foram afetados, mas foi observado um incremento no número de oócitos crescidos e que retomaram a meiose quando os folículos foram cultivados em grupo. Finalmente, na presença do FSH (1000 ng/mL), o cocultivo de um folículo pré-antral com um folículo antral afetou negativamente a sobrevivência e o crescimento folicular. Por outro lado, o cultivo de folículos pré-antrais em grupo mostrou taxas superiores de sobrevivência e crescimento em relação aos folículos cultivados individualmente, além de 9.1% de retomada da meiose. No entanto, essa percentagem também foi muito baixa, o que refletiu a necessidade de melhorar tal sistema de cultivo. Utilizando ainda esse hormônio, em outro estudo foi verificado que o FSH na presença de 10% de soro fetal bovino teve um importante papel no crescimento folicular, não só na espécie caprina, mas também na espécie ovina, após 18 dias de cultivo (RODRIGUES et al., 2010b).

Na tentativa de melhorar o sistema até então empregado, e sabendo que os folículos possuem diferentes níveis de exigências nos diferentes estágios de desenvolvimento, foi

desenvolvido um meio de cultivo sequencial utilizando FSH. Esse hormônio foi utilizado em concentrações crescentes ao longo do cultivo (FSH 100 ng/mL- dia 0 a 6; FSH 500 ng/mL- dia 6 a 12; FSH 1000 ng/mL- dia 12 a 18) e resultou em melhores taxas de sobrevivência e formação do antro, além de reduzir as taxas de extrusão precoce de oócitos (SARAIVA et al., 2011). Diante desse resultado promissor, novos experimentos foram delineados utilizando o meio com adição de FSH sequencial como base.

Outro estudo recente demonstrou que EGF e o FSH promoveram o crescimento de folículos secundários caprinos isolados cultivados por 6 dias (CELESTINO et al., 2011). Aliado a esse estudo, a adição de LH nas concentrações de 50 e 100 ng/mL ao meio de base (sequencial) foi testada, e foi detectado que as duas concentrações melhoram as taxas de retomada da meiose em relação ao controle (meio sequencial sozinho) (SARAIVA et al., dados não publicados). De fato, a partir da utilização de um meio de base que continha FSH sequencial suplementado com LH (100 ng/mL) e EGF (100 ng/mL) (SARAIVA et al., 2010) ou GH (50 ng/mL) (MAGALHÃES et al., 2011), foi possível a obtenção dos primeiros embriões caprinos oriundos de folículos secundários isolados crescidos, maturados e fecundados *in vitro*.

Apesar desses resultados promissores, novos ajustes devem ser realizados nesse protocolo visando aumentar o número de oócitos maturados para serem empregados em outras biotecnologias. Nesse sentido, foi observado que estudos com folículos pré-antrais em diferentes espécies vêm empregando concentrações mais baixas de insulina (próximas à fisiológica) (SMITZ et al., 2010; McLAUGHLIN et al., 2010; ROMERO et al., 2011). Em caprinos, verificou-se que a utilização de insulina a 10 µg/mL (ITS) não foi capaz de manter a ultraestrutura folicular após 7 dias de cultivo *in situ* (CHAVES et al. 2010a; FAUSTINO et al. 2011). Além disso, ACEVEDO; DING; SMITH, (2007) afirmaram que concentrações suprafisiológicas de insulina prejudicam o desenvolvimento oocitário. Diante disso, surgiu o questionamento se uma concentração mais baixa de insulina seria capaz de manter a ultraestrutura folicular em caprinos e não prejudicar a competência oocitária. A idealização deste estudo tornou-se um dos focos da presente tese resultando no trabalho que constitui o capítulo 9 da mesma. Nesse estudo, observou-se que o emprego de uma concentração 1000 vezes mais baixa de insulina (10 ng/mL) adicionada com FSH sequencial foi melhor para manter a sobrevivência, estimular o crescimento folicular e aumentar as taxas de retomada da meiose quando comparada a concentração utilizada no ITS (10 µg/mL) e dos demais tratamentos testados nesse estudo (CHAVES et al., dados não publicados). Essa descoberta ajudará a melhorar os resultados com o cultivo folicular, sem prejudicar o desenvolvimento do oócito e reduzindo os custos com a preparação do meio.

Apesar dos grandes avanços obtidos, o rendimento referente à produção de oócitos maduros, bem como a obtenção de embriões a partir de folículos pré-antrais caprinos isolados ainda é extremamente baixo, o que reforça a necessidade de melhorar tal sistema de cultivo.

Quadro 2. Principais resultados obtidos pelo LAMOFOPA com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

Tratamento (substância/condição)	Duração do cultivo	Técnica para avaliação	Efeito/concentração	Referência
5 ou 20 % Oxigênio	18 d	MORF e FLUO	Formação de antro, crescimento e retomada da meiose: 20% O <sub>2</sub>	Silva et al., 2010
Regime de troca (2 ou 6 d)	24 d	MORF e FLUO	Viabilidade, formação de antro e crescimento oocitário : troca a cada 2 d	Magalhães et al., 2010
BSA (1,25 ou 3 mg/ml)	24 d	MORF e FLUO	Formação de antro, desenvolvimento folicular e oócitos maturados: 3 mg/ml	Rodrigues et al., 2010
Cultivo individual ou grupo, com ou sem FSH e/ou folículo antral	24 d	MORF e FLUO	Viabilidade e crescimento: em grupo, sem FSH e com antral Retomada da meiose: grupo, com FSH	Duarte et al., 2010
FSH sequencial (T1: 100, 500, 1000 ng/ml e T2: 100 e 500 ng/ml)	18 d	MORF e FLUO	Viabilidade, formação de antro e retomada da meiose: T1 (D0-6: 100 ng/ml; D6-12: 500 ng/ml; D12-18: 1000 ng/ml FSH)	Saraiva et al., 2010
LIF (10 ou 50 ng/ml) na ausência ou presença de FSH	18 d	MORF e FLUO	Sobrevivência e formação de antro: LIF (10 ng/ml) Retomada da meiose e maturação: LIF (50 ng/ml) + FSH	Luz et al., 2010
FSH sequencial (T1) + EGF + LH	18 d	MORF e FLUO	Retomada meiose e obtenção de mórula: FSH sequencial + EGF + LH (100 ng/ml)	Saraiva et al., 2010
FSH sequencial (T1) + GH (10 ou 50 ng/ml)	18 d	MORF e FLUO	Retomada da meiose e obtenção de mórula: FSH sequencial + GH (50 ng/ml)	Magalhães et al., 2010
FGF-2	12 d	Morfológica	Crescimento folicular: 50 ng/ml	Almeida et al., 2011a
GDF-9 (100 ou 200 ng/ml), na ausência ou presença de FSH	18 d	MORF e FLUO	Viabilidade, formação de antro e retomada da meiose: GDF-9 (100 ng/ml) sem FSH	Almeida et al., 2011b
Regimes de troca de meio (T1: remoção e adição; T2: adição de 5 µl; T3: remoção e adição com 5 µl a	18 d	MORF e configuração da cromatina	Viabilidade, crescimento e retomada da meiose: T2 (adição periódica de meio)	Araújo et al., 2011
EGF (10 ng/ml) na ausência ou presença de FSHrec (100 ng/ml)	6 d	Morfológica	Formação de antro, crescimento: EGF + FSH	Celestino et al., 2011
KL (50 ou 100 ng/ml) na ausência ou presença de FSH sequencial	18 d	MORF e FLUO	Viabilidade, formação de antro e retomada da meiose: KL (50 ou 100 ng/ml) sem FSH	Lima et al., 2011
Momento da adição de LH 100 ng/ml (0, 6 ou 12 d)	18 d	MORF e FLUO	Viabilidade e retomada da meiose: adição LH a partir do dia 6 de cultivo	Silva et al., 2011
Ácido ascórbico (50 ou 100 ng/ml)	18 d	MORF, FLUO, PCR	Viabilidade, formação de antro, crescimento, aumento da expressão de metaloproteínas: AA 50 ng/ml	Silva et al., 2011

Adaptado de CELESTINO, 2010b.

Nota: MORF – morfologia; FLUO – fluorescência.

## 2.6. Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies

Um 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 camundongos fêmeas, 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., 2011; MAGALHÃES et al., 2011), 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. Na espécie 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; ULLMANN, 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.

O limitado conhecimento sobre a regulação das diferentes etapas da foliculogênese e das condições necessárias para o crescimento, diferenciação e maturação dos oócitos são as principais causas do limitado sucesso na obtenção de crias a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* em animais domésticos. Uma revisão mais detalhada sobre a maturação oocitária é apresentada no capítulo 1 da presente tese. O presente desafio é determinar condições de cultivo apropriadas para dar suporte à transição de folículos primários para secundários *in vitro*, visto que esta fase apresenta alta sensibilidade à degeneração em virtude da alta atividade biosintética e consumo de nutrientes, sendo a composição do meio um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (WANDJI et al., 1997).



## 2.7. Importância da composição do meio de cultivo no desenvolvimento de folículos pré-antrais

A eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais pode ser afetada por diversos fatores, incluindo a espécie animal, tipo de sistema de cultivo (bi ou tridimensional), pH, temperatura, tensão de oxigênio e principalmente pela composição do meio, o qual deve garantir o fornecimento adequado de nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, fatores de crescimento e hormônios (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 de base utilizados para folículos pré-antrais, destacam-se o Meio Essencial Mínimo (MEM) (SILVA et al., 2004b; MATOS et al., 2007a), o Meio de Cultivo Tecidual 199 (TCM 199) (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), aumentou o percentual de folículos morfológicamente normais e estimulou o crescimento folicular (SILVA et al., 2004b; DEMEESTERE et al., 2005). A insulina é normalmente adicionada ao meio de cultivo como fator de sobrevivência, permitindo um melhor aproveitamento das fontes de energia do meio e aumentando os precursores metabólicos como aminoácidos e glicose (LIU et al., 2002). Os antioxidantes, selênio e transferrina, são relatados como importantes substâncias a serem adicionadas ao meio. Alguns autores sugerem que o processo de maturação folicular está relacionado aos altos níveis de transferrina e seus receptores na célula e que o selênio pode ser adicionado ao meio de cultivo para ativar enzimas envolvidas na detoxificação e eliminação de radicais livres (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.

Diante dessa complexidade de eventos durante a foliculogênese, em que é possível observar a participação de diferentes substâncias, diversas pesquisas têm sido realizadas em diferentes espécies. Essas pesquisas objetivam determinar o melhor modelo de cultivo *in vitro*, baseado na morfologia, ultraestrutura e viabilidade dos folículos pré-antrais, podendo dispor de várias técnicas de análise folicular. Nesse contexto, e com o intuito de estudar o efeito de importantes fatores de crescimento no desenvolvimento folicular em caprinos, experimentos

com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais foram realizados nesta espécie utilizando as substâncias NGF, FGF-10 e insulina, os quais serão abordados nos Capítulos 6 a 9 desta tese.

## 2.8. *Técnicas para análise folicular após cultivo in vitro*

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 *in vitro*, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais. Dentre as diferentes técnicas disponíveis, podemos destacar aquelas que permitem a avaliação da qualidade folicular, como por exemplo, a histologia clássica (HC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de fluorescência. Além disso, existem ainda as técnicas de biologia molecular que permitem o estudo da expressão de genes que codificam ligantes e/ou receptores de diferentes substâncias importantes para a foliculogênese, contribuindo para uma melhor elucidação desse processo. A seguir, será abordada brevemente cada uma dessas técnicas.

### 2.8.1. *Histologia clássica*

A histologia clássica (HC) é uma técnica importante para avaliação de folículos pré-antrais antes e após cultivo *in vitro*, pois além de permitir uma análise quantitativa, ou seja, de um grande número de folículos cultivados, permite ainda verificar a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, por ocasião da ativação folicular, além de analisar a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa (MATOS et al., 2007b). Tal técnica emprega normalmente a coloração com hematoxilina-eosina ou ácido periódico de Schiff-hematoxilina e permite a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário ou secundário), e ainda quanto às suas características de integridade morfológica (normais ou atrésicos). Entretanto, a HC possui como desvantagens não permitir a avaliação da integridade de membranas e das organelas citoplasmáticas (GOSDEN, 2000). Vale salientar que tal técnica pode ser realizada tanto em folículos inclusos em fragmentos de córtex ovariano, como em folículos isolados. Nesse último caso, para que os folículos isolados não sejam perdidos durante o processamento histológico, uma opção seria que os mesmos fossem previamente encapsulados em uma matriz de alginato e em seguida corados com azul de alcian para marcação de glicoproteínas (PARSHAD; KAURR; NATT, 2008).

Estudos realizados mostraram que a HC pode dar resultados similares aos de viabilidade folicular utilizando marcadores fluorescentes como a calceína e o corante azul de tripan (AMORIM et al., 2003; ROSSETTO et al., 2009). Além disso, outro estudo relatou ainda que a HC pode ser utilizada para avaliar a morte da célula por necrose, através da visualização da presença de vacúolos (MARTINEZ-MADRID et al., 2007).

### 2.8.2. *Microscopia eletrônica de transmissão*

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é um equipamento versátil que permite a obtenção de informação estrutural e química de amostras diversas. Um feixe de elétrons atravessa uma amostra ultrafina e gera partículas e radiação que podem ser usadas para formar uma imagem ampliada (superiores a  $10^6$  vezes) ou realizar análise química da amostra (JUNQUEIRA, 2004). Desta forma, a MET é considerada uma técnica qualitativa e acurada, capaz de permitir a avaliação da integridade de membranas celulares e organelas citoplasmáticas (SALEHNIA; MOGHADAM; VELOJERDI, 2002).

A MET se mostra como uma ferramenta valiosa para detectar modificações morfológicas iniciais devido à atresia, as quais podem ser observadas apenas a nível ultraestrutural, antes de se tornarem mais visíveis e possíveis de serem identificadas por microscopia óptica. Tal técnica é, portanto capaz de verificar a qualidade do oócito e das células da granulosa (LUCCI et al., 2001; LOPES et al., 2009; CHAVES et al., 2010a). Com esta técnica, é possível ainda avaliar a atresia, ou seja, a morte do folículo tanto por apoptose (STALDEMANN; LASSMAN, 2000) como pelo processo degenerativo de necrose (MARTINEZ-MADRID et al., 2007).

### 2.8.3. *Microscopia de fluorescência*

Outra técnica empregada para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* é a microscopia de fluorescência, 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). A microscopia de fluorescência é considerada uma técnica confiável, prática e rápida (LOPES et al., 2009). Recentemente, estudos vêm sendo realizados empregando a técnica de fluorescência para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* (ROSSETTO et al., 2009; SILVA et al., 2010; BRUNO et al., 2010). Nesses trabalhos, os folículos e/ou oócitos foram analisados por fluorescência tendo

como base a detecção simultânea de células vivas e mortas marcadas por calceína acetoximetil (calceína-AM) e pelo etídio homodímero-1 (EthD-1), respectivamente.

A calceína-AM é um diéster fluorogênico que atravessa passivamente a membrana celular, quando então é convertido por esterases intracelulares (ativas somente em células íntegras), a seu análogo negativo, impermeável e de fluorescência verde, também conhecido como calceína (DE CLERCK et al., 1994). Com a perda da integridade ou aumento da permeabilidade da membrana, a atividade esterásica cessa e o EthD-1 reage com os ácidos nucléicos, produzindo fluorescência vermelha (VAN DEN HURK et al., 1998). Assim, a calceína permite a verificação da viabilidade celular através da diminuição da atividade esterásica, enquanto EthD-1 permite constatar as alterações físicas e químicas na membrana celular verificadas na membrana danificada, com elevação de 40 vezes em sua fluorescência à medida que se associa a ácidos nucléicos (LOPES et al. 2009).

A microscopia de fluorescência é ainda 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* (DUARTE et al., 2010). Para tal finalidade, utiliza-se marcador Hoechst 33342, que penetra nas células e se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA.

#### 2.8.4. *Biologia molecular*

As técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas antes, durante e após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, com o intuito de identificar e quantificar o local de atuação e produção de cada substância (ligante e receptor) envolvida nas diferentes etapas do desenvolvimento folicular. De fato, muitos papéis das células foliculares ovarianas relacionados à sobrevivência, ao crescimento e à diferenciação são refletidos na alteração dos padrões da expressão gênica. Desta forma, a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos é fundamental para qualquer investigação das funções foliculares (ZAMORANO; MAHESH; BRANN, 1996). Seu conjunto de técnicas fundamenta-se principalmente no estudo das interações entre os vários mecanismos celulares, partindo da relação entre o DNA, o RNA e a síntese de proteínas, e o modo como essas interações são reguladas.

Dentre as técnicas de biologia molecular, podem ser citadas aquelas que detectam, localizam ou identificam os ácidos nucléicos (hibridização *in situ*, *Southern* e *Northern Blotting*) ou proteínas (*Western Blotting*), as que podem efetuar a quantificação do DNA (Reação de Cadeia de Polimerase - PCR) ou do RNA (Reação de Transcriptase Reversa de

Cadeia de Polimerase - RT-PCR), as que permitem a quantificação da expressão do RNAm mesmo em uma mistura complexa de RNA total (ensaios de proteção de ribonuclease) ou que possibilitam a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente (Microarranjos de DNA) (ALMEIDA et al., 2010). No entanto, estes métodos têm sua utilização limitada devido ao elevado custo (BUCHER, 1999).

Apesar dos custos, dois desses métodos desenvolvidos para mensurar os transcritos têm adquirido muita popularidade e são frequentemente aplicados. A análise de microarranjos, que permite uma análise em paralelo de milhares de genes em duas populações de RNA marcados (SCHENA et al., 1995), e o RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), que fornece uma mensuração simultânea da expressão gênica em diferentes amostras para um número limitado de genes, e é especialmente desejável quando apenas um pequeno número de células está disponível (KREUZER; MASSEY, 2002). Ambas as técnicas tem a vantagem da velocidade e alto potencial de automação quando comparada a métodos tradicionais de quantificação, como as análises de *Northern blotting*, hibridização *in situ* e ensaio de proteção de ribonuclease (ALMEIDA et al., 2010).

Após a extração do RNAm a partir de folículos ovarianos, e sua posterior conversão em DNA complementar (DNAc), a DNA polimerase realiza a síntese de milhões de cópias deste DNAc através de ciclos com diferentes etapas térmicas, caracterizando o princípio fundamental da técnica que é a amplificação do DNA. Esse método utiliza um sistema fluorescente em plataforma, capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação de um determinado gene no momento real da amplificação (BUSTIN, 2002). Através da técnica de qRT-PCR e da RT-PCR convencional, já foi possível identificar a presença de diferentes substâncias, como hormônios e fatores de crescimento, presentes em folículos ovarianos caprinos (SILVA et al., 2004b, 2005, 2006; CELESTINO et al., 2010a, 2011; SARAIVA et al., 2011).

#### 2.8.5. Dosagem de estradiol

O 17 $\beta$ -estradiol é o estrógeno biologicamente ativo produzido pelo ovário apresentando controle, através do hipotálamo, sobre a liberação de FSH e LH. O estradiol é sintetizado por enzimas esteroidogênicas como o citocromo P450<sub>scc</sub> nas células da teca e pelo citocromo P450<sub>aromatase</sub> nas células da granulosa. Essas enzimas realizam a conversão de colesterol a pregnenolona e a síntese de estradiol a partir de precursores de andrógenos, respectivamente (TAMURA et al., 2007).

Em ruminantes, a androstenediona é o substrato preferido para produção de estradiol, e é convertido pelo complexo enzimático P450 aromatase (P-450AROM) (CONLEY; BIRD, 1997). Em bovinos, a expressão do RNAm para *P-450AROM* foi amplamente detectada especificamente em células da granulosa de folículos antrais saudáveis. Essa expressão aumenta ao longo do desenvolvimento folicular e diminui drasticamente em folículos atrésicos (BAO et al., 1997). Estudos *in vitro* com células da granulosa de bovinos cultivados em meio livre de soro demonstram a capacidade do FSH em aumentar tanto a produção de estradiol quanto a expressão do RNAm da aromatase (SILVA; PRICE, 2000), e este efeito é amplificado pela presença do hormônio insulina (SILVA; PRICE, 2002). Desta forma, a concentração de estradiol no meio de cultivo está correlacionada com o número de folículos em crescimento, sobrevivência e funcionalidade folicular (BEN SAÏD et al., 2007), sendo, portanto, considerado como uma importante técnica de avaliação do cultivo folicular.

### 3. JUSTIFICATIVA

A caprinocultura nos últimos anos vem despontando no agronegócio brasileiro como uma opção de diversificação da produção, gerando oportunidades de emprego, renda e fixação do homem no campo, o que demonstra seu importante papel no contexto da pecuária brasileira. Dentre vários aspectos, a exploração de caprinos no Nordeste brasileiro destaca-se pelo seu efetivo, uma vez que mais de 90% do rebanho nacional são explorados nessa região e por apresentar material genético com bom potencial para produção de pele, carne e leite. No entanto, ainda é insatisfatório o nível de desfrute, produtividade e articulação do setor primário da cadeia produtiva em questão. Esse fato dificulta as melhorias de competitividade e remuneração dos próprios produtores, ameaçando o pleno desenvolvimento e a sustentabilidade da atividade. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de uma cultura de cooperação entre os diversos setores da cadeia produtiva, inclusive nos segmentos de pesquisa científica fundamental e aplicada. Esses segmentos visam compreender melhor a fisiologia, especialmente a reprodução, promovendo o desenvolvimento e aplicação de biotécnicas que possibilitem uma rápida multiplicação de animais geneticamente superiores e, conseqüentemente, um aumento na produtividade animal, o que irá melhorar significativamente a qualidade de vida da população rural dessa região. Nesse contexto, surge a importância da aplicabilidade da biotécnica de MOIFOPA, que visa recuperar um grande número de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, resgatando-os da atresia, a fim de promover o seu crescimento e completa maturação por meio do uso de sistemas de cultivo *in vitro*.

A exequibilidade da biotécnica de MOIFOPA para a produção de animais viáveis a partir do crescimento e maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais já foi demonstrada na literatura. Apesar da obtenção de produtos viáveis a partir de folículos pré-antrais já ter sido relatada em animais de laboratório, em animais de produção este objetivo ainda não foi alcançado. O fator limitante para a produção *in vitro* de embriões a partir de folículos pré-antrais de animais domésticos é a ausência de um meio de cultivo eficaz que assegure a manutenção da viabilidade, crescimento e completa maturação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Além disso, os fatores que regulam o crescimento de folículos pré-antrais de animais de produção ainda são pouco compreendidos. Portanto, o desafio atual dos pesquisadores que trabalham nesta área é o desenvolvimento de um meio de cultivo dinâmico (ovário artificial) que atenda a estes requisitos.

Desta forma, com o intuito de elaborar um sistema eficiente de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, diferentes formas de cultivo (*in situ* e/ou isolado) e substâncias (fatores de

crecimento e/ou hormônios) vêm sendo testadas no cultivo de folículos pré-antrais de animais de laboratórios e domésticos. Contudo, o efeito do NGF, FGF-10 e da insulina sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos ainda não havia sido avaliado. Dessa forma, este trabalho poderá contribuir para o fornecimento de importantes informações a fim de reduzir as grandes perdas foliculares *in vivo*, possibilitando o fornecimento de um maior número de oócitos caprinos aptos a serem maturados *in vitro*. Para este fim, além da técnica de histologia clássica, foi empregada a microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de fluorescência para determinar a qualidade de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos ovarianos ou isolados cultivados *in vitro* e, conseqüentemente, melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivo testados. Além disso, foram realizadas provas de funcionalidade, as quais foram avaliadas por dosagem hormonal e expressão gênica em folículos isolados cultivados.



#### 4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) O NGF, o FGF-10 e a insulina mantêm, de uma maneira concentração-dependente, a viabilidade folicular e influenciam positivamente a ativação e o crescimento de folículos primordiais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano cultivados *in vitro*.
- 2) A insulina, associada ou não ao FSH, afeta positivamente a sobrevivência, a formação de antro, o crescimento, os níveis de estradiol e a expressão do RNAm para os receptores de FSH, insulina e P450 aromatase em folículos secundários caprinos isolados, permitindo que seus oócitos se tornem meioticamente competentes.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral:

- 1) Avaliar o efeito do NGF, FGF-10 e insulina sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

### 5.2 Objetivos Específicos:

- 1) Estabelecer a curva concentração-resposta de NGF, FGF-10 e insulina no cultivo de folículos primordiais caprinos inclusos no tecido ovariano, tendo como parâmetros as taxas de sobrevivência, ativação e crescimento folicular.
- 2) Estabelecer a curva concentração-resposta de insulina no cultivo de folículos secundários caprinos isolados, através das taxas de sobrevivência, formação de antro, crescimento folicular e oocitário, bem como a retomada da meiose em oócitos oriundos de folículos pré-antrais.
- 3) Verificar o efeito da insulina, na presença ou ausência de FSH, sobre os níveis de expressão relativa de RNAm para os receptores de FSH, insulina e P450 aromatase em folículos ovarianos caprinos após 18 dias de cultivo.
- 4) Analisar a viabilidade folicular através de parâmetros morfológicos, ultraestruturais e por marcação fluorescente dos folículos pré-antrais caprinos cultivados inclusos no tecido ovariano na presença de NGF, FGF-10 e insulina, bem como de folículos secundários isolados cultivados na presença da insulina, com ou sem FSH, além da análise da funcionalidade dos folículos isolados através da dosagem de estradiol no meio de cultivo.

## 6. CAPÍTULO I

---

**Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos**

*(Systems in vitro development of immature oocytes of mammals)*

**Periódico:** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34: 37-49, 2010.

## **Resumo**

O ovário mamífero possui um grande estoque de folículos primordiais, que é uma fonte potencial de oócitos para a produção *in vitro* de embriões. Sendo assim, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que explorem o grande número de oócitos imaturos oriundos de folículos pré-antrais de ovários mamíferos torna-se importante para maximizar o potencial reprodutivo das fêmeas. A presente revisão aborda os aspectos relacionados aos sistemas de cultivo *in vitro* para desenvolvimento de oócitos imaturos oriundos de folículos pré-antrais, bem como às técnicas para analisar sua eficiência.

**Palavras-chave:** competência meiótica, crescimento folicular, oócito.

## **Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos**

(Systems *in vitro* development of immature oocytes of mammals)

Roberta Nogueira *Chaves*<sup>\*a</sup>, Ana Beatriz Graça *Duarte*<sup>a</sup>, Maria Helena Tavares *Matos*<sup>a</sup>, José Ricardo de *Figueiredo*<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará - UECE, 60740-000, Fortaleza, Ceará.

\* Correspondência para: rncvet@gmail.com

### **Resumo**

O ovário mamífero possui um grande estoque de folículos primordiais, que é uma fonte potencial de oócitos para a produção *in vitro* de embriões. Sendo assim, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que explorem o grande número de oócitos imaturos oriundos de folículos pré-antrais de ovários mamíferos torna-se importante para maximizar o potencial reprodutivo das fêmeas. A presente revisão aborda os aspectos relacionados aos sistemas de cultivo *in vitro* para desenvolvimento de oócitos imaturos oriundos de folículos pré-antrais, bem como às técnicas para analisar sua eficiência.

Palavras-chave: Oócito, competência meiótica, crescimento folicular.

### **Abstract**

*The mammalian ovary has a large population of primordial follicles, which is a potential source of oocytes useful for embryo in vitro production. Due to this potential, the development of in vitro culture systems to exploit the large number of immature oocytes from the preantral follicles in the mammalian ovary becomes very important to maximize the female reproductive potential. The present review approaches related aspects of in vitro culture systems for the development of immature oocytes originated from the preantral follicles, as well the techniques to analyze their efficiency.*

*Keywords: Oocyte, meiotic competence and follicular growth.*

## Introdução

A disponibilidade de oócitos é um fator limitante no desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas (Smitz e Cortvrindt, 2002). Os métodos atuais para a produção *in vitro* de embriões são dependentes de uma oferta de oócitos competentes, oriundos de grandes folículos antrais ou pré-ovulatórios, que estão presentes no ovário em número relativamente reduzido (Telfer, 1998). Sabe-se que os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, armazenando assim a maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos (Silva et al., 2003). Dessa forma, a possibilidade de desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* que explorem o grande número de oócitos imaturos provenientes de folículos pré-antrais de ovários mamíferos deve ser considerada. Atualmente, há um crescente interesse em compreender os mecanismos envolvidos na ativação e posterior crescimento folicular até a maturação dos seus oócitos (Hemamalini et al., 2003).

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica que consiste na obtenção, sob condições artificiais, da maturação de oócitos, preparando-os para a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2008). A maturação e fecundação *in vitro* de oócitos originados de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* tem resultado na produção de embriões em suínos (Wu e Tian, 2007) e bubalinos (Gupta et al., 2008) e no nascimento de camundongos (O' Brien et al., 2003).

Este trabalho irá rever aspectos relacionados ao crescimento oocitário, sistemas de cultivo *in vitro* para o crescimento de folículos pré-antrais, princípios e sistemas para maturação *in vitro*, e técnicas para avaliar a eficiência da maturação oocitária.

### Características do crescimento folicular e oocitário

Ao longo do desenvolvimento folicular, os oócitos passam por diversas modificações morfológicas e bioquímicas. Tais eventos, que iniciam com a formação do folículo primordial e continuam até o momento da ovulação, tornam o oócito competente (Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001). A aquisição da competência ocorre de maneira gradual e sincronizada com os eventos foliculares (Bevers et al., 1997), visto que o desenvolvimento do folículo e seu oócito são eventos paralelos e relacionados funcionalmente (Aguillar et al., 2001).

Durante o estágio de folículo pré-antral, os oócitos aumentam o volume, passando de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro no folículo primordial para 120  $\mu\text{m}$  no folículo pré-ovulatório (Salha et al., 1998), o que está correlacionado com o incremento do conteúdo

proteico (Schultz e Wassarman, 1977) e acúmulo de substâncias essenciais para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário pré-implantação (Eppig, 1994). A formação do embrião é diretamente dependente dos transcritos produzidos pelo oócito durante os eventos antes da concepção. Durante o crescimento, o oócito acumula muitos RNAs mensageiros que irão atuar no desenvolvimento embrionário (Nogueira et al., 2006; Feuerstein et al., 2006). As células da granulosa multiplicam suas camadas e as células tecais se diferenciam do estroma circundante e ocorre a formação das junções *gap* entre o oócito e as células da granulosa. No citoplasma, desenvolve-se o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático liso e as gotículas lipídicas, que assumem uma localização periférica, além da formação da zona pelúcida e dos grânulos corticais (Van Weeler e Rodgers, 1996).

Apesar de todos esses eventos, os oócitos de folículos pré-antrais ainda são incapazes de retomar o desenvolvimento. Entretanto, é nesta fase que são sintetizadas moléculas essenciais para o reinício da meiose e de componentes do fator promotor da meiose (Goudet et al., 1998). Além disso, a capacidade dos oócitos de completar todas as etapas do desenvolvimento está diretamente relacionada com o tamanho do folículo (Crozet et al., 1995) e do próprio oócito (Hyttel et al., 1997). Desta forma, o desenvolvimento de sistemas *in vitro* que suportem o crescimento do oócito ajudaria a identificar alguns fatores essenciais para a aquisição de competência do desenvolvimento.

### **Sistemas *in vitro* para crescimento dos folículos pré-antrais**

Diferentes métodos de cultivo *in vitro* têm sido desenvolvidos a fim de se manter a viabilidade, promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* e obter oócitos maduros para produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Fig. 1).


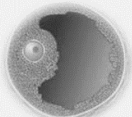


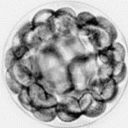







ESPÉCIE	Crescimento	Antro	Embrião	Nascimento
<b>GATA</b> Jewgenow et al., 1998				
<b>MACACA</b> Nayudu et al., 2003				
<b>CADELA</b> Serafim et al., 2010				
<b>VACA</b> McCaffery et al., 2000				
<b>VELHA</b> Arunakumari et al., 2010				
<b>CABRA</b> Magalhães et al., 2010				
<b>PORCA</b> Wu et al., 2001				
<b>BÚFALA</b> Gupta et al., 2008				
<b>CAMUNDONGA</b> O'Brien et al., 2003				

Figura 1. Principais avanços obtidos com a utilização de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de mamíferos cultivados *in vitro*.

Variações nos sistemas de cultivo são adotadas, no entanto, em termos de morfologia folicular e do tipo de contato do folículo com o substrato (plástico da placa; ágar; componentes da matriz extracelular - colágeno, fibronectina, laminina, matrigel; monocamada de células somáticas) eles podem ser divididos em: (i) cultivos em que o objetivo é manter a estrutura esférica do folículo intacta, através da internalização do folículo no substrato (sistema tridimensional), e (ii) cultivos que permitem que os folículos sejam remodelados, uma vez que o folículo fica sobre o substrato (sistema bidimensional) (Demeestere et al., 2002; Pangas et al., 2003; Basso et al., 2007; Figueiredo et al., 2008).

Em cultivos bidimensionais, mesmo que os componentes individuais permaneçam funcionais, a arquitetura folicular não pode ser mantida, devido à aderência e achatamento dos folículos ao substrato (Gomes et al., 1999). Como alternativa, pode-se utilizar um sistema tridimensional, como por exemplo, o cultivo de ovário inteiro ou de seus fragmentos visando manter a arquitetura tridimensional, preservar a integridade estrutural do tecido e permitir as interações entre os folículos, que são essenciais para desenvolvimento normal (Abir et al., 2006). No entanto, estes sistemas podem ter significativas limitações de nutrientes quando a



massa de tecido se desenvolve, ou o estroma pode exercer controle inibitório sobre o início do crescimento dos folículos primordiais (Wandji et al. 1996).

A escolha do sistema de cultivo será ditada pelos objetivos do estudo. Quando o objetivo é usar as células somáticas no cocultivo de oócitos, um melhor rendimento é obtido quando se emprega um sistema bidimensional. Quando o objetivo é determinar as relações fisiológicas intrafoliculares, é melhor manter os folículos encapsulados no substrato, utilizando um sistema tridimensional (Smitz e Cortvrindt, 2002).

Outro aspecto muito importante do sistema *in vitro* para o crescimento de folículos pré-antrais é a composição do meio de cultivo (Smitz e Cortvrindt, 2002). Várias substâncias adicionadas podem influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular, incluindo os antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos, vitaminas, monossacarídeos, etc.), diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e diversos fatores de crescimento (Figueiredo et al., 2008). A escolha do sistema de cultivo e a adição de fatores que promovam o crescimento e obtenção de oócitos competentes para produção de embriões *in vitro* podem variar de acordo com a classe e tamanho do folículo e ainda, com a espécie em estudo. No entanto, é conhecido que o crescimento oocitário em folículos pré-antrais é estimulado por fatores de crescimento como Kit Ligand (ovino: Driancourt et al., 2000), fator inibidor de leucemia (camundongo: Reynaud et al., 2000), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (caprinos: Zhou e Zhang, 2005), fator de crescimento epidermal (caprinos: Silva et al., 2004) e pela gonadotrofina FSH (caprinos: Matos et al., 2007). Entretanto, um sistema que suporte todo o desenvolvimento folicular desde o estágio primordial ainda não foi alcançado em animais domésticos até o momento (Picton et al., 2008).

### **Princípios da maturação oocitária**

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica reprodutiva que permite que os oócitos atinjam a metáfase II *in vitro* e adquiram a competência para serem fecundados e iniciem a embriogênese (Smitz et al., 2004). Na maioria das espécies, os oócitos inclusos em folículos primordiais presentes no ovário se encontram em estágio quiescente, além de serem pequenos e imaturos. Contudo, em intervalos regulares, certo número deles começa a crescer e maturar, mas de todo esse potencial *in vivo*, somente um oócito será ovulado e o restante sofrerá atresia (Hardy et al., 2000). Assim, a MIV tem o potencial de resgatar uma grande quantidade de oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até a maturação (Gilchrist et al., 2008).

No entanto, os oócitos maturados *in vitro* não têm o mesmo potencial de desenvolvimento que os oócitos maturados *in vivo* (Chian et al., 2004).

O processo de maturação oocitária consiste em uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos (Fissore et al., 2002). Este processo é composto por inúmeras modificações estruturais e moleculares no citoplasma (maturação citoplasmática) que culminam com a configuração cromossômica em metáfase II (maturação nuclear) precedendo a penetração do espermatozoide e sua ativação para fecundação (Roth e Hansen, 2005). Atualmente, evidências disponíveis indicam que as condições de cultivo adequadas suportam a maturação nuclear, mas frequentemente não conseguem sustentar a maturação citoplasmática (Combelles et al., 2002). A natureza desta deficiência ainda está sujeita à especulação (Vanhoutte et al., 2007).

Os folículos em crescimento e/ou dominantes apresentam oócitos que permanecem bloqueados no estágio de diplóteno da prófase meiótica. *In vivo*, a retomada da meiose é iniciada por uma onda pré-ovulatória de LH e acontece somente em oócitos de folículos dominantes (pré-ovulatórios), totalmente crescidos e meioticamente competentes (Van Der Hurk e Zhao, 2003). Além dos eventos fisiológicos, a retomada da meiose pode ocorrer como consequência da atresia, quando a qualidade do folículo e o controle meiótico estão comprometidos (Downs, 1993). Ocorrendo também naqueles oócitos retirados de folículos terciários ou após a ovulação que perderam o contato com o fator inibidor da meiose presente no folículo e nos quais a maturação nuclear passa a ocorrer espontaneamente (Sirard e Coenen, 1993).

Antes e durante o período da onda de LH, o oócito é circundado por uma camada compacta de células do cumulus. Das células mais internas do cumulus, numerosas projeções penetram na zona pelúcida e atingem o oolema com junções *gap*. Pouco antes da onda de LH, ocorre uma quebra dessas junções. Então, durante o período entre a onda de LH e a ovulação, o oócito sofre alterações marcantes, que culminam com a maturação oocitária (Richards et al., 2002).

O oócito é então considerado o “regente” porque, desde o período de organização folicular e progressão até a ovulação, ele coordena o desenvolvimento do folículo. Além de controlar a proliferação e diferenciação de células da granulosa em células que produzam proteínas e esteroides. Essa característica leva ao aumento da responsividade às gonadotrofinas, diferenciação de células da teca e expansão do cumulus até a ruptura da parede folicular (Van Der Hurk et al., 2000). Porém, algumas características macroscópicas do folículo também são importantes para determinar o potencial da maturação nuclear e citoplasmática do oócito.

## **Maturação nuclear**

A maturação nuclear é caracterizada pelo oócito em estágio de metáfase II. A quebra da vesícula germinativa é o primeiro sinal visível de retomada da meiose e pode ocorrer, na espécie caprina, dentro de 3 horas após o oócito ter sido colocado em meio de maturação (Crozet et al., 1995; Sharma et al., 1996). A maturação nuclear de oócitos pré-ovulatórios é regulada por fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos e células foliculares, bem como por fatores endócrinos, tais como as gonadotrofinas (Kim et al., 2008). Oócitos provenientes de folículos pré-antrais e antrais iniciais adquirem capacidade de quebra da vesícula germinativa apenas quando atingem um determinado diâmetro de acordo com a espécie (maior que 75  $\mu\text{m}$  para camundongos e maior que 110  $\mu\text{m}$  para ruminantes (Eppig e Schroeder, 1989; Fair et al., 1995; Anguita et al., 2007).

Em bovinos, oócitos de 115  $\mu\text{m}$  podem alcançar a quebra da vesícula germinativa, mas para adquirir capacidade de desenvolvimento embrionário devem estar com diâmetro superior a 120  $\mu\text{m}$  (Pavlok, et al., 1992). Em suínos, a maturação nuclear melhora conforme aumento do diâmetro do oócito e este, por sua vez, cresce conforme aumento do tamanho folicular e permanece constante quando o folículo atinge 2,8 mm, o que corresponde a oócitos de 120  $\mu\text{m}$  (Bagg et al., 2004). Em caprinos, o diâmetro do oócito está positivamente correlacionado com a percentagem de oócitos que alcançam a metáfase II e que são capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Em oócitos caprinos, a competência meiótica é adquirida quando o diâmetro do oócito é maior do que 136  $\mu\text{m}$  tanto em fêmeas adultas quanto pré-púberes (Anguita et al., 2007).

Durante o crescimento do oócito dentro do folículo, muitas proteínas são sintetizadas. Algumas dessas proteínas, como o fator promotor de meiose no citoplasma são essenciais no processo de desenvolvimento do oócito antes e após a ativação do genoma do zigoto (Krisner, 2004). Esse fator é uma proteína quinase constituída por uma subunidade catalítica (p34) e outra regulatória (ciclina B) (Gautier e Maller, 1991). É mediada por eventos de fosforilação e desfosforilação, e sua atividade aumenta no estágio de quebra da vesícula germinativa, com alta atividade em metáfase I, decrescendo em anáfase e telófase e alcançando outro pico em metáfase II. Além disso, está relacionado com a retomada da meiose, que é mantida por altos níveis deste fator no citoplasma do oócito, o qual é também descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (Crozet et al., 2000).

O bloqueio meiótico no estágio de vesícula germinativa é mantido pelas altas concentrações do AMP cíclico que são produzidos pelas células da granulosa e transportados

para o oócito via junções *gap*. Após a puberdade, uma onda de LH causa o declínio do AMP cíclico, primeiro pelo desligamento das junções *gap* entre oócito e células da granulosa e também pela redução da sua produção pela granulosa (Kawamura et al., 2004). O declínio do AMP cíclico provoca a desfosforilação e consequente ativação do complexo fator promotor da meiose, que por sua vez está envolvido com a quebra do envelope nuclear, condensação de cromatina, reorganização do citoesqueleto e bloqueio da atividade transcricional (Miller e Russell, 1992).

A quebra da vesícula germinativa consiste na condensação da cromatina, aparecimento de estruturas denominadas cinetócoros (pontos de ancoragem dos cromossomos aos microtúbulos) e na dissolução da membrana nuclear. Ocorre duplicação dos centríolos, e os cromossomos em pares diploides, que se encontram livres no citoplasma, migram para a região equatorial caracterizando a metáfase I (Mermillod e Lannou, 1999). O oócito primário sofre divisão meiótica, originando duas células filhas, sendo que uma delas contém a maior parte do citoplasma e constitui o oócito propriamente dito. A outra parte, muito menor, é expulsa para o espaço perivitelino, sendo denominada corpúsculo polar, que, além de cromossomos, possui uma variedade de organelas, incluindo mitocôndrias, ribossomos e grânulos corticais. Nesse momento, o oócito é considerado secundário, e os cromossomos se alinham no centro do fuso, caracterizando o estágio de metáfase II (Sirard et al., 1992). Em diferentes espécies, varia o tempo requerido para o oócito atingir a metáfase II (Thibault et al., 1987). Oócitos de algumas espécies, inclusive em humanos, quando cultivados *in vitro* podem sofrer parada em metáfase I e se tornarem incapazes de alcançar a metáfase II (Hardy et al., 2000). Esta condição poderia ocorrer pelo fato do oócito ainda não ter atingido sua competência meiótica, ou por erros ocorridos na recombinação genética que, sob condições normais, ocorre na fase de prófase I no estágio de paquíteno. Isto indica que a recombinação genética é um fator chave para que o oócito retome a meiose. Outros fatores responsáveis pelo funcionamento do fuso meiótico exercem uma função importante na transição de metáfase I para metáfase II. Os microfilamentos agem na migração dos cromossomos e alterações na sua estrutura podem levar à parada em metáfase I. Mesmo quando fecundados, oócitos com defeitos no fuso meiótico frequentemente resultam em embriões com poliploidia (Mrazek e Fulka, 2003).

Em ratos, a pró-metáfase I com condensação dos cromossomos e formação da placa metafásica dura cerca de 6 horas e a metáfase I cerca de 4 horas. Esta duração é importante para a síntese e formação do fuso meiótico, já que a passagem pela anáfase e telófase I é relativamente rápida (Mermillod e Lannou, 1999). Estudos em oócitos humanos com falha após FIV apresentaram anormalidades no fuso em metáfase II com alta probabilidade de sofrer

parada nesta fase da meiose devido a alterações na ativação do oócito. Mesmo após a fecundação, falhas na ativação podem ocorrer e impedir a formação dos pró-núcleos, com consequente descondensação da cromatina do espermatozoide. Outras falhas como a não extrusão do segundo corpúsculo polar podem ocorrer, devido a erros na localização do fuso e ainda, por ativação partenogenética, estes oócitos podem clivar ou apresentar dois pró-núcleos com apenas um corpúsculo polar (Mrazek e Fulka, 2003).

### **Maturação citoplasmática**

A maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito de mamíferos passa para se tornar uma célula capaz de fecundar e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial. Estas mudanças dizem respeito à redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, estocagem de proteínas e RNAm, desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (Anguita et al., 2007). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na competência do oócito ainda não são bem descritos.

A maturação citoplasmática é necessária para a obtenção de condições de bloqueio da polispermia, para descondensar o núcleo do espermatozoide que penetrou e formar o pró-núcleo masculino após a fecundação. Inclui ainda a redistribuição das organelas celulares, com a migração das mitocôndrias para a posição perinuclear e acúmulo de grânulos na extensão do oolema (Picton et al., 1998). Um oócito que não completou ainda sua maturação citoplasmática possui baixa qualidade e é incapaz de se desenvolver normalmente (Krisher, 2004).

A competência meiótica é gradualmente adquirida durante o período final da oogênese. O estágio final para um bom desenvolvimento, antes da ovulação, requer sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática (Eppig et al., 1994). Oócitos de muitas espécies que completaram seu desenvolvimento, quando liberados do folículo, podem maturar espontaneamente. Acredita-se que prolongando a parada meiótica *in vitro* por bloqueio temporário da maturação nuclear, com uma técnica denominada “cultivo pré-maturação” pode-se estimular a sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática. Este bloqueio pode dar tempo para que ocorram as mudanças estruturais e bioquímicas (transcrição de RNAm, modificações de proteínas, relocação e modificações de organelas) que o oócito necessita para se tornar capaz de ser fecundado e desenvolver o embrião com sucesso (Dieleman et al., 2002; Vanhoutte et al., 2007). Algumas substâncias podem ser utilizadas para prolongar esse bloqueio da meiose *in vitro* (Nogueira et al., 2003). Estas substâncias manipulam as concentrações de

AMP cíclico intraoocitários pela inibição de fosfodiesterases específicas no citoplasma do oócito e o mantém parado no estágio de vesícula germinativa (Nogueira et al., 2006). As fosfodiesterases exercem uma função no controle da maturação nuclear do oócito, sendo responsáveis pela degradação do AMP cíclico que está ligado à retomada da meiose (Feuerstein et al., 2006).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa vêm trabalhando com o intuito de aprimorar a maturação citoplasmática *in vitro* e, conseqüentemente, melhorar a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Fatores de crescimento produzidos pelas células durante o desenvolvimento folicular tais como, fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) já foram testados durante maturação *in vitro* e melhoraram a capacitação dos oócitos (Gonçalves et al., 2007).

Atualmente, a maturação nuclear, a retomada da meiose e a finalização da primeira divisão meiótica ocorrem *in vitro* para todas as espécies estudadas. Números significativos de oócitos imaturos que são maturados até metáfase II e em seguida são submetidos à fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário até a formação de um indivíduo viável variam de acordo com a espécie. No entanto, alterações na maturação citoplasmática são mais aparentes nos estágios finais do desenvolvimento embrionário (Trousou et al., 2001). Além disso, os baixos resultados da produção *in vitro* de embriões podem ser seguramente atribuídos a dois principais fatores: as condições de cultivo *in vitro* (Russel et al., 2006) e a qualidade dos oócitos selecionados para a maturação *in vitro* (Camargo et al., 2006).

### **Qualidade do oócito**

O oócito adquire sua capacidade para fecundação e desenvolvimento após longo período de crescimento. Este processo envolve tanto a síntese de componentes citoplasmáticos como o rearranjo e redução no número de cromossomos. Estes dois eventos são interligados e sua cronologia é determinante para assegurar que o oócito atinja a maturação nuclear e citoplasmática simultaneamente. O desenvolvimento embrionário é diretamente comprometido se a maturação do oócito não for completa (Hunter, 2000).

Existem grandes variações quanto aos padrões morfológicos dos oócitos entre as espécies. Oócitos de camundongos e ruminantes apresentam ooplasma claro e quase ausente de granulações, enquanto em equinos, suínos e caninos observa-se ooplasma escuro e com

granulações. Essas podem se apresentar de forma heterogênea, devido à quantidade e à distribuição dos lipídeos citoplasmáticos (Carneiro et al., 2002). Desta forma, o oócito pode ter seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado pela aparência do complexo cumulus-oócito. A classificação dos oócitos pode ser realizada em uma escala de 1 a 4, sendo, Qualidade 1: Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Qualidade 2: Cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida. Qualidade 3: Cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino. Qualidade 4: Oócito sem cumulus, também conhecido como oócito desnudo (Gonçalves et al., 2008).

Diferente da maturação *in vivo*, os oócitos maturados *in vitro* frequentemente têm seu metabolismo alterado e um potencial de desenvolvimento reduzido. Este fato pode ser devido a deficiências no meio de maturação, a uma habilidade intrínseca do oócito, ou ambos. A regulação na disponibilidade de nutrientes e de enzimas pode ocorrer em diversos níveis (Krisher et al., 2004). Para folículos pré-antrais, o cultivo pode apresentar vantagens provocando alterações significativas no microambiente do folículo e do oócito antes e durante os processos de maturação. Além disso, pode ser útil para explorar as diferentes respostas do oócito e das células somáticas do folículo quando submetidos a diferentes ambientes e concentrações de moléculas e fatores (Sun et al., 2004). Assim, a qualidade do ambiente onde o oócito foi produzido parece ser de vital importância para o desenvolvimento de sua competência. Muitos estudos têm avaliado as diferentes características foliculares, que podem apresentar fatores associados com o aumento da competência oocitária. Algumas características como tamanho e integridade folicular, homogeneidade do ooplasma, perfil hormonal e status ovariano possivelmente influenciam o desenvolvimento da competência oocitária (Oussaid et al., 2000).

## Sistemas *in vitro* para maturação oocitária

O sistema *in vitro* ideal para o desenvolvimento oocitário seria aquele em que oócitos isolados atingissem o crescimento e a competência para maturação em um meio definido sem a unidade folicular (Telfer, 1998). Os oócitos isolados de folículos pré-antrais e cultivados sem suas células da granulosa ou em cocultivo com células da granulosa não apresentam um crescimento significativo (Eppig, 1994). Entretanto, oócitos cultivados com junções *gap* intactas entre o oócito e células da granulosa crescem e tornam-se competentes para se submeterem à maturação nuclear. Por isso, as ligações fisiológicas íntimas entre os oócitos e as células somáticas no folículo são indispensáveis para o desenvolvimento normal do oócito (Matzuk et al., 2002).

Recentemente, vários sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos para permitir o crescimento *in vitro* de oócitos. A natureza do sistema de cultivo depende do estágio inicial do folículo, o qual tem influência sobre o número de folículos disponíveis, a capacidade de desenvolvimento e a taxa de crescimento e a duração do cultivo. O ideal seria que esse cultivo iniciasse com folículos primordiais, porque eles são mais abundantes, mas tem como desvantagem o fato do crescimento desta categoria folicular ser mais lento (Eppig, 2001). No entanto, este procedimento aumentaria drasticamente o potencial reprodutivo das espécies mamíferas (Eppig, 2001). Além disso, o tempo requerido para maturação *in vitro* pode variar entre as diferentes espécies (Mingoti, 2005), sendo de 18-24 horas para bovinos (Merton et al., 2003), 28-36 horas para equinos (Carneiro, 2002), 30 horas para caprinos (Sharma et al., 1996) e de 48 horas em suínos (Somfai et al., 2005).

*In vitro*, diferentes condições de cultivo e protocolos já foram testadas para a maturação de oócitos, vários meios de maturação, tais como fluído sintético de oviduto (SOF; Gandhi et al., 2000), DMEM, Ham's F-10, Ham's F-12 (Smetanina et al., 2000) e meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199), têm sido utilizados. O TCM 199 proposto por Moor et al. (1984) é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro* sendo, geralmente, suplementado com soro fetal bovino, FSH, LH, piruvato, glutamina e antibiótico e/ou outros fatores. Esta suplementação tem o objetivo de estimular o desenvolvimento *in vitro* (Guixue et al., 2001). Entretanto, existem variações entre os diferentes protocolos de PIVE.

Os efeitos moleculares que mediam a influência positiva destes suplementos não estão completamente esclarecidos, mas dados recentes suportaram o possível envolvimento dos fatores de crescimento influenciando a MIV e melhorando a competência oocitária elevando significativamente o número de blastocistos produzidos (Carneiro et al., 2003). As substâncias



como fatores de crescimento, gonadotrofinas, soros específicos e diferentes condições de cultivo revelaram algum efeito nas taxas de produção e qualidade embrionária, mas nunca ao ponto de todos os oócitos responderem a estas condições (Sirard et al., 1998). Por essa razão, é evidente que as condições de cultivo têm um efeito significativo em permitir ao oócito expressar seu potencial, mas os constituintes originais do oócito controlam a sua habilidade de responder às melhores condições (Sirard, 2001).

A MIV é comumente realizada utilizando meio coberto por óleo de parafina ou óleo mineral para evitar a evaporação (Shimada et al., 2001). No entanto, o óleo pode absorver rapidamente os hormônios esteroides adicionados ao meio ou aqueles secretados pelas células do cumulus (Gonçalves et al., 2008) podendo limitar a competência de desenvolvimento de oócitos suínos. Segundo Shimada et al. (2002), a exposição de oócitos suínos ao óleo mineral durante a MIV reduz consideravelmente as taxas de maturação meiótica nessa espécie.

Além da utilização de substâncias reconhecidamente reguladoras da maturação nuclear de oócitos em mamíferos como as citadas anteriormente, outros fatores também estão envolvidos no processo de foliculogênese como o fluido folicular e o cocultivo com células da granulosa (Carneiro, 2007). O fluido folicular tem sido utilizado com relativa eficiência, com exceção do fluido folicular proveniente de folículos atrésicos. O uso de fluido folicular nos meios de maturação em suínos é utilizado com sucesso, pois contém substâncias que agem na expansão do cumulus-oócito, na maturação nuclear e na fecundação, por conter altas concentrações da enzima superóxido dismutase, que exerce função importante na proteção do oócito ao estresse oxidativo (Tatemoto et al., 2004). Ali et al. (2004) observaram que a adição de fluido folicular de folículos maiores que 8 mm ao meio de maturação foi capaz de aumentar a produção de embriões. A importância das células somáticas durante o processo de maturação *in vivo* é clara e tem sido positiva nos sistemas de cultivo para MIV em bovinos (Squires, 1996). Segundo Matzuk et al. (2002), as células da granulosa são indispensáveis para o crescimento folicular, diferenciação, estágio nuclear meiótico, maturação citoplasmática e atividade transcricional genômica. Sendo constatado que, quando atingem um diâmetro limite, os oócitos suprimem a habilidade das células da granulosa em promover a continuidade de seu crescimento, indicando que o oócito determina não somente o crescimento folicular, mas também indiretamente o seu próprio crescimento.

Marques et al. (2007) avaliaram a maturação *in vitro* em oócitos suínos em dois diferentes meios (TCM 199 e NCSU23) suplementados com fluido folicular, álcool polivinílico e diferentes suplementações de hormônios, fator de crescimento epidermal (EGF), gonadotrofina coriônica humana e equina (hCG e eCG). Esses pesquisadores verificaram maior

eficiência na maturação quando utilizaram o TCM 199 suplementado com EGF (10 ng/mL), hCG (10 UI/mL) e eCG (10 UI/mL). O EGF é um fator de crescimento bastante utilizado em meios de maturação e o seu principal efeito é estimular a síntese de glutatona intracelular no oócito. A glutatona protege o DNA, age na síntese de proteínas e transporte de aminoácidos, regula a maturação oocitária através do estímulo para a quebra da vesícula germinativa e expansão das células do cumulus-oócito (Buccione et al., 1990), além de promover a formação do pró-núcleo masculino durante a fecundação (Whitaker e Knight, 2004). Yoshida et al. (1993) reportaram que o cultivo de oócitos suínos com meio suplementado com cisteína promoveu a formação do pró-núcleo masculino após FIV. A cisteína é um aminoácido que compõe a glutatona. Essa glutatona também tem função importante na ação contra os efeitos tóxicos dos danos oxidativos, inclusive causados pelo metabolismo da glicose no oócito, pois a maturação induzida pelo FSH parece estimular enzimas que aumentam o metabolismo da glicose e a quebra da vesícula germinativa (Downs et al., 1998). No entanto, o metabolismo da glicose é dependente tanto da tensão de oxigênio utilizada para o cultivo como também da concentração de espécies reativas de oxigênio no oócito. O estresse oxidativo excessivo contribui para redução no desenvolvimento do oócito e dos embriões *in vitro* (Tatemoto et al., 2001).

Carneiro et al. (2001) determinaram que o IGF-I (200 ng/mL) incrementa os índices de maturação nuclear em equinos. Posteriormente, foi determinado que sua adição ao meio induz maior acúmulo de proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) no citoplasma, o que, por sua vez, refletiu em maior desenvolvimento embrionário após a partenogênese de oócitos equinos (Li et al., 2004). Willis et al. (1991) constataram uma redução significativa na maturação nuclear dos oócitos em meio suplementado com albumina sérica bovina (BSA), quando comparado à utilização de outras fontes proteicas. Entretanto, devido às preocupações sanitárias, a utilização de BSA como suplemento proteico é amplamente difundida na MIV de oócitos equinos (Curcio, 2005).

Além das substâncias adicionadas ao meio, os oócitos em cultivo também são afetados por condições fisiológicas específicas, tais como a osmolaridade, composição iônica, temperatura, pH, CO<sub>2</sub> e tensão de oxigênio, que por sua vez, tornam-se parâmetros influenciadores importantes da capacidade de desenvolvimento do oócito (Hunter, 2000). Sob condições de alta tensão de oxigênio durante a MIV, oócitos bovinos necessitam de baixas concentrações de glicose para diminuir as espécies reativas de oxigênio, aumentar a concentração de glutatona e assim manter a sua competência para o desenvolvimento (Hashimoto et al., 2000). Por outro lado, quando se utiliza baixas tensões de oxigênio na MIV de oócitos bovinos, apesar de diminuir as espécies reativas de oxigênio, tem a desvantagem de

inibir a produção de ATP e a progressão até metáfase II. No entanto, quando a glicose é adicionada ao meio nestas condições, aumenta a proporção de oócitos que atingem metáfase II. Em camundongos, a exposição dos oócitos a baixas tensões de oxigênio pode aumentar o número de células dos blastocistos, entretanto o peso fetal foi reduzido quando comparado a altas concentrações de oxigênio (Banwell et al., 2007).

A exposição de oócitos a temperaturas muito baixas ou elevadas (i.e. choque térmico) na fase de vesícula germinativa (Payton et al., 2004) ou durante a fase inicial de maturação (Roth e Hansen, 2004) interfere com o processo de maturação (Roth e Hansen, 2005), devido alterações que ocorrem no citoesqueleto (Shin e Kim, 2003). A exposição das células somáticas ao choque térmico durante a fase S pode resultar em condensação prematura do cromossomo e formação de micronúcleos (Swanson et al., 1995) e durante a fase M, resulta na desmontagem do fuso mitótico, poliploidia e falha na citocinese (Vidair et al., 1993). No campo da produção de animais domésticos, como também na medicina humana e nos estudos ligados a preservação de espécies, as biotecnologias reprodutivas acabam tendo uma aplicação limitada visto que nem todos os oócitos estão realmente aptos para se desenvolverem *in vitro*. Neste sentido, vários métodos de avaliação para determinar a eficiência da maturação *in vitro* vêm sendo estudados.

### **Técnicas de avaliação da maturação oocitária**

A morfologia e o grau de expansão das células do cumulus são métodos clássicos para avaliação da maturação oocitária. Em bovinos, a expansão e enegrecimento do cumulus são características utilizadas para verificar a maturação oocitária e estão diretamente relacionadas com boa qualidade embrionária (Wurth e Kriup, 1992). Oócitos bovinos que exibiram citoplasma mais heterogêneo apresentam maior capacidade de fecundação normal e com redução da polispermia, pois exibem melhor distribuição dos grânulos corticais após a MIV (Nagano et al., 1999).

O estágio nuclear dos oócitos após a MIV pode ser examinado sob microscopia ótica com contraste de fase, após fixação dos oócitos com metanol-ácido acético e coloração com 1% de lacmóide em 45% de solução de ácido acético (Hunter e Polge, 1966) ou com 1% de orceína em 40% de solução de ácido acético (Li et al., 2002). Outra técnica para visualização dos cromossomos dos oócitos e determinação dos estágios nucleares de maturação é a microscopia por fluorescência (Miyara et al., 2003). Após serem submetidos às técnicas de MIV, os oócitos são desnudados, marcados com Hoechst 33342 e visualizados em microscópio invertido com fluorescência (Grondahl et al., 1995). Os oócitos que são capazes de retomar a meiose

apresentam dois grupos de cromossomos bem condensados com corpúsculo polar evidente (Sun et al., 2004). O fuso de metáfase I e II, as pontes citoplasmáticas e o corpúsculo polar podem ser corados por meio da imunofluorescência com anticorpo anti-tubulina (isolado de ovos de ouriço do mar ou de outras fontes). Este procedimento tem sido utilizado para acompanhamento da progressão da maturação *in vitro* em oócitos de camundongos, bovinos e outras espécies (Hoth e Hansen, 2005). A imunofluorescência de oócitos humanos com fosfodiesterase é largamente utilizada para verificar a parada nuclear temporária em vesícula germinativa. Esta técnica também pode ser melhor observada em microscopia confocal por varredura a laser para uma melhor visualização de diferentes planos da mesma estrutura (Vanhoutte et al., 2007).

Infelizmente, somente métodos invasivos que causam a destruição dos oócitos são capazes de predizer com relativa precisão a qualidade dos mesmos. No entanto, recentemente tem sido utilizado o corante Azul Cresil Brilhante, um método não invasivo, para tal finalidade. Esta substância é capaz de determinar a atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) presente em oócitos durante o crescimento (Rodríguez-González et al., 2003).

A maturação citoplasmática pode ser avaliada pela distribuição das organelas por microscopia eletrônica (Fernandes, 2004), migração dos grânulos corticais (Curcio, 2005), clivagem partenogênica (Carneiro et al., 2001) ou técnicas de fecundação (Carnevale, 1996). A despeito da grande quantidade de informações disponíveis sobre o assunto, não se chegou ainda a um método ideal para avaliação da maturação citoplasmática que não seja a própria fecundação e o posterior desenvolvimento normal do embrião e do feto (Krisher et al., 2004).

### **Considerações finais**

O crescimento de folículos primordiais *in vitro* seguido pela maturação oocitária é capaz de fornecer um grande número de oócitos maduros para posteriores programas de transferência embrionária e clonagem. Nesse contexto, os sistemas de maturação *in vitro* oferecem condições razoáveis para o desenvolvimento do oócito após a fecundação e o cultivo, visto que a maturação nuclear e a fecundação não diferem substancialmente do processo *in vivo*. Entretanto, para a produção *in vitro* de embriões em larga escala faz-se necessário um melhor entendimento das substâncias que controlam a foliculogênese inicial, visando o desenvolvimento de meios de cultivo que assegurem a ativação, crescimento e maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais.

Até o presente momento, as razões para a falha dos oócitos de ruminantes em completar a meiose *in vitro* não foram determinadas, porém podem estar relacionadas a alterações nas

reações bioquímicas envolvidas no processo meiótico. O entendimento das particularidades da fisiologia, adição de hormônios e fatores de crescimento específicos nos meios de cultivo proporcionaram avanços na MIV em mamíferos. Entretanto, mais estudos são necessários para incrementar de forma eficiente a produção *in vitro* de embriões nas diferentes espécies.

### Referências Bibliográficas

**Abir R, Nitke S, Bem-Haroush A, Fisch B.** *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol*, v. 26, p. 887-898, 2006.

**Aguillar JJ, Woods GL, Miragaya MH.** Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine *cumulus*-oocyte complexes. *Theriogenology*, v. 56, p. 745-758, 2001.

**Ali A, Coenen K, Bousquet D, Sirard MC.** Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the development competence of bovine oocyte. *Theriogenology*, v. 62, p. 1596- 1606, 2004.

**Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, Oliveira JA, Rodrigues APF, Bracarense L, Figueiredo JR, Tonioli R.** Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 64, p. 1104–1113, 2005.

**Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT.** Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*, v. 67, p. 526-536, 2007.

**Arunakumari G, Vagdevi R, Rao BS, Naik BR, Naidu KS, Suresh Kumar RV, Rao VH.** Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Rum Res*, v. 70, p. 93–100, 2007.

**Bagg MA, Vassena R, Papasso-Brambilla E, Grupen CG, Armstrong DT, Gandolfi F.** Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology*, v. 62, p. 1003–1011, 2004.

**Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG.** Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod*, v. 22, p. 2768-2775, 2007.

- Basso AC, Garcia JM, Esper CR.** Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. *Braz. J Vet Res Anim Sci*, v. 44, p. 134-143, 2007.
- Bevers MM, Dieleman SJ, Van Der Hurk R.** Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v. 47, p. 13-22, 1997.
- Brevini-Gandolfi TAL, Gandolfi F.** The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v. 55, p. 1255-1276, 2001.
- Buccione R, Schroeder A, Eppig J.** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, v.43, p.543-547,1990.
- Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR.** Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim Reprod*, v. 3, p. 19-28, 2006.
- Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I.** Influence of insulin-like growth factor-I and interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol Reprod*, v.65, p.899-905, 2001.
- Carneiro GF.** Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. *Ciênc Tecnol Vet*, v.2, p.5-10, 2002.
- Carneiro GF, Nakazawa M, Castro SBM, Gomes YM.** Efeito do IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais...* Beberibe, CE: SBTE, p.286, 2003.
- Carneiro GF.** Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.268-273, 2007.
- Carnevale EM.** Gamete intrafallopian transfer. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.47-60, 1996.
- Chian RC, Lim JH, Tan SL.** State of the art in *in-vitro* oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gyneco*, v. 16, p. 211–219, 2004.
- Combelles CM, Racowsky C, Albertini DF.** Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in *in-vitro* matured human oocytes. *Hum Reprod*, v. 17, p. 1006–1016, 2002.
- Crozet N, Ahmed A, Dubos MP.** Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v. 105, p. 293-298, 1995.
- Crozet N, Dahirel M, Gall L.** Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J Reprod Fert*, v. 118, p. 367-373, 2000.
- Curcio BR, Leon PMM, Frey Júnior F, Nogueira CEW, Deschamps JC.** Eqüinos: oogênese, foliculogênese e maturação. *Ver Bras Reprod Anim*, v.30, p. 28-35, 2006.

**Curcio BR.** *Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I.* 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2005.

**Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM.** Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v. 57, p. 5–20, 2002.

**Downs SM.** Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, v.39, p.65-79, 1993.

**Downs SM, Humpherson PG, Eleese HJ.** Meiotic induction in *cumulus* cell-enclosed mouse oocyte: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol Reprod*, v. 58, p. 1084-1094, 1998.

**Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J.** Roles of Kit and Kit Ligand in ovarian function. *Rev Reprod*, v. 5, p. 143-152, 2000.

**Drummond AE.** The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 4, p. 1-11, 2006.

**Eppig JJ, Schroeder AC.** Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 41, p. 268-276, 1989.

**Eppig JJ.** Further reflections on culture systems for the growth of oocytes *in vitro*. *Hum Reprod*, v.9, p. 969-976, 1994.

**Eppig JJ, O'Brien MJ.** Development *In vitro* Of Mouse Oocytes From Primordial Follicles. *Biol Reprod*, v. 54, p 197-207, 1996.

**Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.

**Fair T, Hyttel P, Greve T.** Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Develop*, v. 42, p. 437-442, 1995.

**Fernandes CB.** *Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre meios TCM 199, SOFaa e HTF: BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio do crescimento eqüino por meio da transferência de ovócito.* 2004. 129f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Pós-graduação em Medicina Veterinária, UNESP.

**Feuerstein P, Cadoreta V, Dalbies-Trana R, Guérifa F, Royèrea D.** Le dialogue ovocyte-cumulus. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, v. 34, p. 793–800, 2006.

**Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. *In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 303-327, 2008.

**Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL.** A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod*, v.15, p.395-401, 2000.

**Gautier J, Maller JL.** Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of MPF activation. *Embo J*, v. 10, p. 177-182, 1991.

**Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG.** Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, v. 14, p. 159-177, 2008.

**Gomes JE, Correia SC, Gouveia-Oliveira A, Cidadao AJ, Plancha CE.** Three-dimensional environments preserve extracellular matrix compartments of ovarian follicles and increase FSH-dependent growth. *Mol. Reprod. Dev.* v. 54, p. 163 - 172, 1999.

**Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Ver Bras Reprod Anim*, v. 31, p. 212-217, 2007.

**Gonçalves PBD, Oliveira MAL, Mezzalana A, Montagner MM, Visitin JA, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. *In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 261-291, 2008.

**Goudet G, Belin F, Bezard J, Gerard N.** Maturation-promoting factor (MPF) and MAPK expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. *Mol Hum Reprod*, v.4, p.563-570, 1998.

**Grondahl C, Host T, Brück I, Viuff D, Bezard J, Fair T, Greve T, Hyttel P.** *In vitro* production of equine embryos. *Biol Reprod*, v.1, p.299-307, 1995.

**Guixue Z, Luciano AM, Coenen K.** The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

**Gupta OS, Ramesh HS, Nandi S, Ravindra JP.** Recovery of large preantral follicles from buffalo ovary: effect of season and corpus luteum. *Anim Reprod Sci*, v. 101, p.145-52, 2007.

**Gupta PS, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v. 16, p. 57-63, 2008.

**Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RML.** *In vitro* maturation of oocytes. *British Medical Bulletin*, v. 56, p. 588-602, 2000.

**Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H.** Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro*



fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 56, p. 520–526, 2000.

**Hemamalini NC, Rao BS, Tamilmani G, Amarnath D, Vagdevi R, Naidu KS, Reddy KK, Rao VH.** Influence of transforming growth factor- $\alpha$ , insulin like growth factorii, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Rumin Res.*, v. 50, p. 11–22, 2003.

**Hoth Z, Hansen PJ.** Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v.129, p. 235–244, 2005.

**Hunter RHF, Polge C.** Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fertil*, v. 12, p. 525-531, 1966.

**Hunter MG.** Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod*, v. 5, p. 122–130, 2000.

**Hyttel P, Fair T, Caresen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 23-32, 1997.

**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.

**Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA.** Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, p. 7323-7328, 2004.

**Kim BK, Anower Javed M, Kang SR, Kim D, Chang-Hee HAN, Huh MK, Kamal T.** Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. *Anim Reprod Sci*, v. 104, p. 83-92, 2008.

**Krisher RL.** The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*, v. 82, p. 45-51, 2004.

**Li Z, Jiang Q, Sabet MR, Zhang Y, Ritchie T, Engelhardt JF.** Conditions for *in vitro* maturation and artificial activation of ferret oocytes. *Biol Reprod*, v. 66, p. 1380-1386, 2002.

**Li XI, Dai Y, Allen WR.** Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes *in vitro* and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. *Biol Reprod*, v.71, p.1391–1396, 2004.

**McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE.** Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod*, v. 63, p. 267–273, 2000.

**Marques MG, Nicacio AC, Oliveira VP, Nascimento AB, Caetano HVA, Mendes CM, Mello MRB, Milazzotto MP, Assumpção MEOA, Visintin JA.** *In vitro* maturation of pig

oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Anim Reprod Sci*, v. 97, p. 375–381, 2007.

**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.; Bao, S.N.; Lucci, A.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.

**Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ.** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conservation. *Science*, v. 296, p. 2178-2190, 2002.

**Mermillod P, Le Lannou D.** Maturation ovocytaire *in vivo* et *in vitro* chez les mammiferes. In: HAMAMAH, S.; MENEZO, Y. *Ovocyte et embryon de la physiologie  la pathologie*. Ellipses edition, p. 95-122, 1999.

**Merton JS, De Roos APW, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v. 59, p. 651-674, 2003.

**Miller JB, Russell P.** The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, v. 68, p. 407-410, 1992.

**Mingoti GV.** Aspectos técnicos da producao *in vitro* de embriões bovinos. In: *I Simposio Topicos Avanados Em Biotecnologias Da Reproducao*. UNESP, campus de Jaboticabal, 2005.

**Miyara F, Aubriot F, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, Lemeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P.** Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod*, v.18, p. 1494-1503, 2003.

**Moor RM, Kruip TAM, Green D.** Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*, v. 21, p. 103-106, 1984.

**Moor R, Dai Y.** Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Reproduction*, v. 58, p. 91-104, 2001.

**Mrazek M, Fulka JJ.** Failure of oocyte maturation: Possible mechanisms for oocyte maturation arrest. *Hum Reprod*, v.18, p. 2249-2252, 2003.

**Nagano M, Takahashi Y, Katagiri S.** *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters, *J Vet Med Sci*, v. 61, p. 531-535, 1999.

**Nayudu PL, Wu J, Michelmann HW.** *In vitro* development of marmoset monkey oocytes by pre-antral follicle culture. *Reprod Domest Anim*, v. 38, p. 90 – 96, 2003.

**Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos DG, Vanhoutte L, Smitz J.** Effect of Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor on Developmental Competence of Immature Mouse Oocytes *In vitro*. *Biol Reprod*, v. 69, p. 2045–2052, 2003.

**Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, Smitz J.** Meiotic Arrest *In vitro* by Phosphodiesterase 3-Inhibitor Enhances Maturation Capacity of Human Oocytes and Allows Subsequent Embryonic Development. *Biol Reprod*, v. 74, p. 177–184, 2006.

**O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v. 8, p. 1682-1686, 2003.

**Oussaid B, Lonergan P, Khatir H, Guler A, Monniaux D, Touze JL, Beckers JF, Cognie Y, Mermillod P.** Effect of GnRH antagonist induced prolonged follicular phase on follicular atresia oocyte developmental competence *in vitro* in superovulated heifers. *J Reprod Fertil*, v. 118, p. 137 – 144, 2000.

**Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK.** Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. *Tissue Engineering*, v. 9, p. 1013 – 1021, 2003.

**Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H.** Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Develop*, v. 31, p. 63–67, 1992.

**Payton RR, Romar R, Coy P, Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL.** Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 71, p. 1303–1308, 2004.

**Picton HM, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v. 145, p. 27-37, 1998.

Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, p. 703-715, 2008.

**Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt MA.** Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Develop*, v. 56, p. 483–494, 2000.

**Richards JS, Russel DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC.** Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and lutenization. *Recent Prog Horm Res*, v. 57, p. 195-220, 2002.

- Rodríguez-González E, López-Bejar M, Izquierdo D, Paramio MT.** Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev*, v. 43, p. 179-187, 2003.
- Roth Z, Hansen PJ.** Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol Reprod*, v. 71, p. 1898–1906, 2004.
- Roth Z, Hansen PJ.** Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v. 129, p. 235–244, 2005.
- Russel DF, Bagir S, Bordignon J, Betts DH.** The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v. 73, p. 1255-1270, 2006.
- Salha O, Abusheika N, Sharma V.** Dynamics of human follicular growth and *in vitro* oocyte maturation. *Hum Reprod Update*, v. 4, p. 816-832, 1998.
- Santos SSD, Biondi FC, Cordeiro MS, Miranda MS, Dantas JK, Figueiredo JR, Ohashi OM.** Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of Buffalo fetuses of different ages. *Anim Reprod Sci*, v. 95, p. 1–5, 2006a.
- Schultz RM, Wassarman PM.** Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci*, v. 24, p. 167-194, 1977.
- Serafim MKB, Almeida AP, Duarte ABG, Silva GM, Araújo VR, Chaves RN, Silva LDM, Figueiredo JR, Campello CC, Lopes CAP.** Canine preantral follicles culture at different concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, *in press*, 2010.
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM.** Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, v 12, p.1267–1270, 1997.
- Sharma GT, Majumdar AC, Bonde SW.** Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. *Small Rum Res*, v. 22, p. 25-30, 1996.
- Shimada M, Zeng WX, Terada T.** Inhibition of PI 3-kinase or MEK leads to suppression of p34cdc2 kinase activity and meiotic progression beyond the MI stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cell. *Biol Reprod*, v. 65, p. 442–448, 2001.
- Shimada M, Kawano N, Terada T.** Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. *Reproduction*, v. 124, p. 557-563, 2002.
- Shin MR, Kim NH.** Maternal gamma (g)-tubulin is involved in microtubule reorganization during bovine fertilization and parthenogenesis. *Mol Reprod Develop*, v. 64, p. 438–445, 2003.

**Silva JRV, Brasil AF, Santos RR, Costa SHF, Rodrigues APR, Ferreira MAL, Machado VP, Figueiredo JR.** Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciência Rural*, v.33, p. 913-919, 2003.

**Silva JRV, Van Der Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in goat ovaries. *Mol Reprod Develop*, v. 70, p. 11-19, 2004.

**Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S.** Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, v.37, p.39-57, 1992.

**Sirard MA, Coenen K.** The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotics resumption. *Theriogenology*, v.40, p.933-942, 1993.

**Sirard MA, Richard F, Mayes M.** Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v. 49, p. 483-497, 1998.

**Sirard MA.** Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

**Smetanina IG, Tatarinova LV, Krivokhardchennko AS.** The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Ontogenez*, v.31, p.139-143, 2000.

**Smitz JEJ, Cortvrindt RG.** The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, v. 123, p. 185-202, 2002.

**Smitz J, Nogueira D, Vanhoutte Matos DG, Cortvrindt RN.** Oocyte *in vitro* maturation. In: Gardner, D.K., Weissman, A., Howles, C., Suh, C.S., Sonntag, B., Erickson, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord*, v. 3, p. 5-12, 2004.

**Somfai T, Kikuchi K, Medvedev S, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Sato E, Nagai T.** Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v. 90, p. 307-328, 2005.

**Spears N, Debruin JP, Gosden RG.** The establishment of follicular dominance in co-cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil*, v. 106, p. 1-6, 1996.

**Spears N, Baker S, Srsen V, Lapping R, Mullan J, Nelson R, Allison V.** Mouse ovarian follicles secrete factors affecting the growth and development of like-sized ovarian follicles *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 67, p. 1726-1733, 2002.

**Squires EL.** Maturation and fertilization of equine oocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.31-45, 1996.

**Sun F, Betzendahl I, Shen Y, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U.** Preantral follicle culture as a novel *in vitro* assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. *Mutagenesis*, v. 19, p. 13-25, 2004.

**Swanson PE, Carroll SB, Zhang XF, Mackey MA.** Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. *Am J Pathol*, v. 146, p. 969–971, 1995.

**Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N.** Enhancement of Developmental Competence after *In vitro* Fertilization of Porcine Oocytes by Treatment with Ascorbic Acid 2-O-a-Glucoside During *In vitro* Maturation. *Biol Reprod*, v. 65, p. 1800–1806, 2001.

**Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada A.** Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* Maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod*, v. 71, p. 1150–1157, 2004.

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

**Thibault C, Szollosi D, Gerard M.** Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*, v. 27, p. 865-896, 1987.

**Vanderhyden B, Telfer EE, Eppig JJ.** Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 46, p. 1196-1204, 1992.

**Van Der Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v. 6, p. 457-474, 2000.

**Van Der Hurk R, Zhao J.** Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. *Acta Sci Vet.*, v. 31, p. 188-205, 2003.

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

**Vanhoutte L, Sutter P, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van Der Elst J.** Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod*, v. 22, p. 1239–1246, 2007.

**Van Weeler I, Rodgers RJ.** Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biol Reprod*, v. 55, p.1003-1011, 1996.

**Vidair CA, Doxsey SJ, Dewey WC.** Heat shock alters centrosome organization leading to mitotic dysfunction and cell death. *J Cell Physiol*, v. 154, p. 443–445, 1993.

**Zhou H, Zhang Y.** Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest Anim Endocrinol*, v. 28, p. 235–242, 2005.

**Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE.** Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod*, v. 55, p. 942 - 948, 1996.

- Willis P, Caudle AB, Fayerer-Hosken RA.** Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of sera, time and hormones. *Mol Reprod Dev*, v.30, p.360-368, 1991.
- Wu J, Benjamin RE, Carrell DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v. 64, p. 375-381, 2001.
- Wu J, Tian Q.** Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*, v. 15, p. 233-240, 2007.
- Wurth YA, Kriup THAM.** Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. *Int Congr Anim Reprod*, v. 1, p. 387-389, 1992.
- Whitaker BD, Knight JW.** Exogenous  $\gamma$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 62, p. 311–322, 2004.
- Yoshida M.** Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v. 35, p.76-81, 1993.

**Papel do fator de crescimento do nervo e seus receptores na foliculogênese**

*(Role of nerve growth factor and its receptors in folliculogenesis)*

**Periódico:** *Zygote (Aceito para publicação em 27/11/2011).*



## Resumo

O fator de crescimento do nervo (NGF) é o peptídeo protótipo da família das neurotrofinas, que tem uma estrutura terciária baseada em um nó de cistina composta por filamentos-beta torcidos em torno de si e ligados por pontes dissulfeto. O NGF desempenha ações na manutenção da viabilidade e proliferação de células neurais e não neurais, como as células do ovário. Desta forma, o foco da presente revisão foi examinar o papel do NGF e seus receptores no desenvolvimento folicular ovariano. O NGF exerce suas múltiplas ações através da ligação a duas classes de receptores: o receptor tirosina-quinases A (TrkA) de alta afinidade e o receptor p75 de baixa afinidade. Devido essa variação de receptores, diferentes vias de sinalização intracitoplasmáticas podem ser ativadas com a ligação do NGF. O receptor TrkA desencadeia predominantemente a ativação de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) garantindo a sobrevivência e diferenciação celular. Ainda foi descrita a ativação da via fosfolipase tipo C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) que gera diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) induzindo liberação de cálcio de estoques celulares intracitoplasmáticos. No entanto, a ativação via receptor p75 é menos compreendida. A expressão de RNAm para o NGF e seus receptores foi verificada em células ovarianas (oócito, células da granulosa, teca e células intersticiais) de várias espécies. Esse fato sugere que o NGF e seus receptores regulem diversas funções no ovário, tais como a sobrevivência e desenvolvimento folicular. Por isso, o emprego de meios de cultivo adequados ao desenvolvimento folicular utilizando NGF torna esta área bastante atraente para futuros grupos de pesquisa, embora o entendimento completo da ação do NGF na comunicação folicular ainda seja um desafio.

Palavras-chave: NGF, folículos, ovário, receptores.

## **Role of nerve growth factor (NGF) and its receptors on folliculogenesis**

**Chaves RN<sup>1\*</sup>, Alves AMCV<sup>1</sup>, Lima LF<sup>1</sup>, Matos HMT<sup>2</sup>, Rodrigues APR<sup>1</sup>, Figueiredo JR<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus Itaperi, Fortaleza, 60740-903, CE, Brazil.

<sup>2</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, 48902-300, PE, Brazil.

\* Correspondence should be addressed to:

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: 60740-903

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rncvet@gmail.com (Roberta Nogueira Chaves)

## **Abstract**

Nerve growth factor (NGF) is a prototype member of the neurotrophins family, which has important functions in the maintenance of viability and proliferation of neuronal and nonneuronal cells, such as certain ovarian cells. Thus, the present review will highlight the role of NGF and its receptors on ovarian follicle development. NGF initiates its multiple actions through binding to two classes of receptors: the high affinity receptor tyrosine kinase A (TrkA) and the low affinity receptor p75. Due to the variation of receptors, different intracytoplasmic signaling pathways may be activated through binding to NGF. The TrkA receptor predominantly activates the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and the mitogenic activated protein kinase (MAPK), promoting cell survival and proliferation. The activation of the phospholipase type C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) pathway, which results in diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP3), culminates in the release of calcium from the intracytoplasmic cellular stocks. However, activation through p75 receptor is less known. The expression of NGF and its receptors is localized in ovarian cells (oocyte, granulosa, theca and interstitial cells) from several species, suggesting that NGF and its receptors may regulate some ovarian functions, such as follicular survival and development. Thus, the use of NGF in the culture medium of ovarian follicles may be of critical importance for future researchers wanting to promote follicular development *in vitro*.

Keywords: NGF, follicles, ovary, TrkA, p75.

## **Introduction**

Previous researchers have described growth factors as controlling the regulation of neural cells development and differentiation. They also participate in regulating these processes in nonneuronal cells (Dissen *et al.*, 2002). The neurotrophic factors, for example, demonstrate this double activity, contributing with the development of a variety of nonneural tissues, including within the pancreas, thymus, heart, adenohypophysis and ovaries (Ojeda & Dissen, 1994; Tessarollo, 1998).

Neurotrophic factors consist of two main families: the neurotrophins (NT) and the glia derived neurotrophic factor (GDNF) (Airaksinen & Saarma, 2002; Chao, 2003). The NT family consists of some peptides with a high degree of structural homology, whose main components are: the nerve growth factor (NGF), the brain-derived neurotrophic factor (BDNF),

neurotrophin-3 (NT-3) and neurotrophin-4/5 (NT-4/5) (Ibañes, 1998; Aloe, 2004; Dissen *et al.*, 2009).

It is known that NTs, especially NGF, have been widely studied in the reproductive aspect, since they are present in the ovaries and the knockout of their genes impairs both follicular formation and development (Dissen *et al.*, 2002). However, it is not known if NGF only functions in the ovary, despite its evident action as a trophic support in the sympathetic innervation of the organ and its important role during ovarian and follicle development (Mayerhofer, 1997; Dissen *et al.*, 2001). In this way, the focus of the present review is to describe the role of NGF and its receptors on ovarian follicular development.

### **Structural characterization of NGF and its receptors**

NGF is a prototype glycoprotein of the NT family, initially synthesized as a pro-NGF (306 amino acids), which is cleaved and translocated to the rough endoplasmic reticulum, being further changed by extracellular proteases, producing a biologic active protein (118 amino acids). The mature NGF is thus a covalent homodimer with a molecular weight of 130 kDa (Covaceuszach *et al.*, 2004; Mouri *et al.*, 2007; Nomoto *et al.*, 2007).

The tridimensional structure of NGF was revealed by McDonald *et al.* (1991), who verified using x-ray crystallography that this substance has an elongated shape with a core that is formed by twisted beta sheets and bound by disulfide bridges. The molecule is also composed by 3 subunits ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  complex). The  $\beta$ -NGF subunit is responsible for the biological activity and the  $\gamma$ -NGF subunit is a highly specific active protease (26-kDa serine protease of the kallikrein protease group) responsible for the conversion of the pro-NGF transcript in its active form. The  $\alpha$ -NGF subunit has not shown a known function, appearing inactive (Sofroniew *et al.*, 2001). During the activation of NGF, the  $\gamma$ -NGF subunit proteins are hydrolyzed to convert pro-NGF synthesized from the gene into active homodimer NGF. In this process, the protein remains stable and there is no segregation of  $\alpha$ -NGF and  $\gamma$ -NGF subunits. It is believed that although this protein has not shown biological function, they may serve to protect NGF from the proteolytic enzymes present in the tissues (Montalchini & Pietro Calissano, 1990).

NGF begins its biological role through binding to two known receptors (Fig. 1). One of them shows high affinity to NGF and is known as a tyrosine kinase receptor A (TrkA) (Ibañes, 1998; Terenghi, 1999). The other is a low affinity receptor called neurotrophin receptor p75 (p75<sup>NTR</sup> or p75). NGF signaling preferentially occurs through TrkA receptor (Kaplan *et al.*, 1991), whereas p75 may potentiate or inhibit the biological responses mediated by TrkA (Kohn,

1999). Phylogenetic analysis between NGF and its TrkA receptor identified a co-evolution between these locos, increasing the receptor-ligand specificity (Halböök *et al.*, 1998).

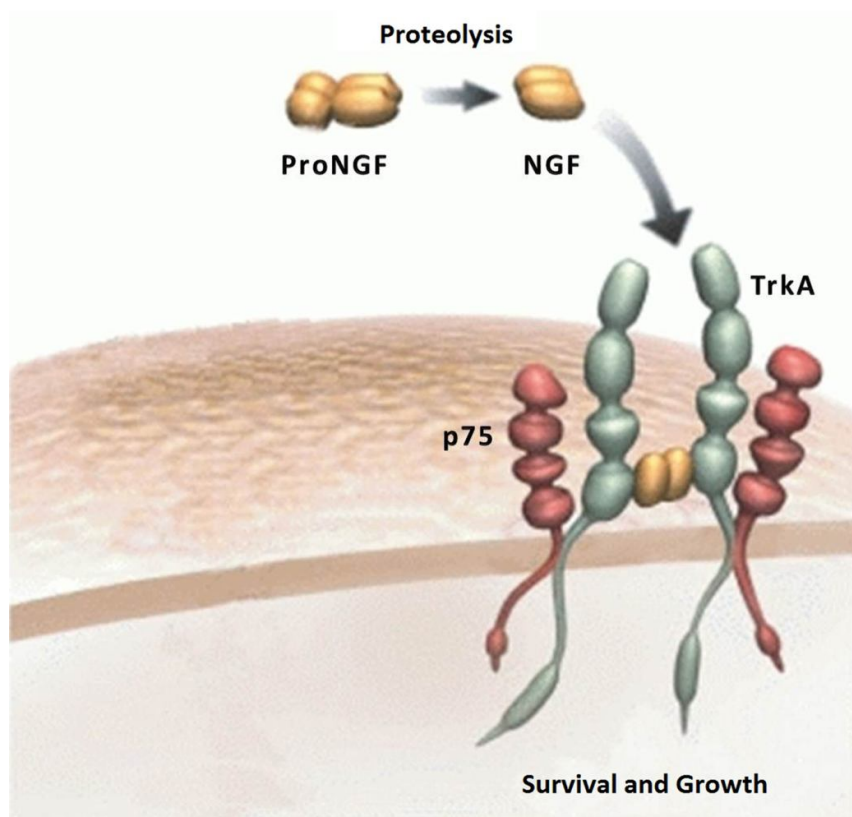


Fig. 1. Schematic model illustrating high (TrkA) and low (p75) affinity receptors for NGF. Adapted from Grandpré *et al.*, 2002.

The TrkA gene was mapped in the chromosomal band 1q22 (Valent & Bernheim, 1997) and contain 17 exons that codify a transmembrane protein of 140 kDa, which has an extracellular binding domain (composed of three leucine-rich motifs flanked by two cysteine clusters, two immunoglobulin-like C2 type domains - Ig-C2), a single transmembrane domain and an intracellular domain with tyrosine kinase activity (Greco *et al.*, 1996). NGF binding to the extracellular domain leads to receptor oligomerization and this rearrangement allows the domains of the closest kinases in the receptor chain to phosphorylate one to another, in a process called autophosphorylation (Kaplan & Miller, 2000; Alberts *et al.*, 2004). The activation of TrkA receptors begins the signaling cascades, including intracellular pathways.

The receptor p75 is a member of the death-promoting tumor necrosis factor receptor (TNF-R) superfamily which also includes the characteristic death receptors TNF-R apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-R and Fas/CD95 (Raase *et al.*, 2008). The receptor p75 is a 75 kDa

glycoprotein with four extracellular cysteine rich repeats required for ligand binding (Chao, 2003; Barker, 2004). It is a single pass type I transmembrane receptor, with an intracellular domain containing a juxtamembrane region and a type II consensus death domain (DD) sequence (Roux and Barker, 2002). Although p75 binds dimeric neurotrophin ligands, there is some controversy over the oligomeric status of p75 and evidence indicates that it may also signal as a monomer or as a dimer (Vilat *et al.*, 2009). Recently, it was shown that p75 can form covalent homodimers through a disulphide bond in the transmembrane region. In this case, neurotrophin binding is understood to induce a conformational change in the receptor, such that it pivots on this disulfide bond at Cys257 to permit access of intracellular adaptor proteins to the intracellular domain in what is termed a “snail-tong model” (Simi & Ibanez, 2010). The receptor does not possess intrinsic enzymatic activity and instead transduces signals through recruitment of a variety of adaptor proteins to the intracellular domain, leading to proliferation, survival, or cell death (He & Garcia, 2004). Interestingly, p75 also serves as a receptor for immature pro-neurotrophins which induce cell death in a manner that is dependent on binding to a co-receptor, sortilin (Nykjaer *et al.*, 2004).

### **Cellular signaling through NGF/receptor on the regulation of folliculogenesis**

The effects of NGF are related to the activation of different biochemical pathways (Fig. 2), as the activation of the MAPK and PI3K pathway with the inactivation of the apoptotic proteins BAD and BAX from the Bcl-2 family, both pathways activated by the TrkA receptor. Previous researchers have also described the activation of the PLC $\gamma$  pathway that produces DAG and IP3, inducing the release of calcium from the intracytoplasmic cellular stocks (Glebova & Ginty, 2005). Finally, activation of the small GTPase Ras in response to NGF has been shown and linked to cell survival and differentiation (Caporali & Emanuelli, 2009).

The activation performed by the p75 receptor is less known, but it may result in the production of ceramides, activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) or regulator kinases, such as c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Lee *et al.*, 2001; Chao, 2003). p75 signaling can also lead to downstream activation of NF- $\kappa$ B which promotes cell survival through up regulation of anti-apoptotic genes such as cFLIP, which interferes with the activation of initiator caspase-8, the Bcl-2 family member Bcl-XL, and inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) XIAP and cIAP1/2 (Karin, 2006; Baud and Karin, 2009). Together with the pro-apoptotic effects of p75, these findings show that p75 can act as a bifunctional switch directing the cell down opposing paths of cell death or survival (Molloy *et al.*, 2011).

Thus, the p75 receptor shows an independent role in apoptosis that may be anti or pro-apoptotic (Chao, 2003). The anti-apoptotic stimulus begins with the activation of a ceramide-dependent signaling pathway (Shi *et al.*, 2004). In this case, NGF interacts with the p75 receptor to hydrolyze the sphingomyeline, which results in the production of the apoptosis cascade signaling inhibitor, called ceramide (Barrett, 2000). The pro-apoptotic stimulus induced by p75 follows the intrinsic apoptotic pathway, with the release of cytochrome c by mitochondria and activation of caspase-9 (Bhakar *et al.*, 2003). However, cell apoptosis mediated by p75 does not occur when the high affinity receptors (TrkA) are also expressed (Botchkarev *et al.*, 2000).

### **Ras/MAPK pathway**

After NGF binds to its cellular receptor TrkA, activation of the Ras protein occurs, which is needed for cell differentiation and survival. This process is mediated through a Shc adaptor molecule that binds to phosphorylated tyrosine 490, which is critical for the activation of the Ras signaling cascade. The Shc is recruited to its recognized site in the activated Trk by the interactions with the Shc PTB domain (Nimnual *et al.*, 1998). The Shc phosphorylation produces a site on phosphotyrosine Shc that recruits other adaptor proteins containing the SH2 domain, such as the growth factor receptor-bound protein-2 (Grb2), which binds to the exchange factor of the guanine nucleotide (SOS - son of sevenless) (Robinson *et al.*, 2005). The complex Grb2-SOS is translocated to the plasma membrane, where SOS activates a small protein G p21ras and promotes the transition from inactive Ras-GDP to active Ras-GTP (guanosine triphosphate) (York *et al.*, 2000). The activated Ras protein stimulates signaling through several cytoplasmic kinase proteins, such as Raf (kinase specific for serine/treonine), MEK (MAPK kinase activator) and MAPK (Wood *et al.*, 1992; Xing *et al.*, 1998). The activation of one or more kinases leads to phosphorylation and activation of MEK and the isoforms of MAPK, ERK-1 and ERK-2 (kinases regulated by an extracellular signaling -1/-2) (Wood *et al.*, 1992; Crews *et al.*, 1992). The MAPK translocates into the cellular nucleus, where it phosphorylates a group of molecules responsible for transcription, thus beginning cellular proliferation (Silva *et al.*, 2009).

### **PI3K e PLC $\gamma$ 1 pathways**

One of the main signaling mechanisms involving lipids is the cleavage of the membrane phosphatidylinositol to the formation of DAG and IP3 by PLCs. The IP3 may bind to its receptors in the rough endoplasmic reticulum, releasing  $\text{Ca}^{2+}$  from these stocks, as shown previously, while DAG may activate several isoforms of PKCs. Therefore, PI3K and PLC $\gamma$  act as intracellular messengers, whose function is to transmit the membrane receptor signaling to several proteins that will make this sign noticeable by the cell (Lenz, 2000).

Considering that PI3Ks may be activated by Ras (Rodriguez-Viviana *et al.*, 1994) and by the subunits  $\beta\gamma$  of the protein G (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997), these enzymes represent an important connection point between the signaling activators of protein G, Ras and PKC and their innumerable substrates (Lenz, 2000).

The Ras independent pathway occurs when the GAB1 adaptor proteins (GRB2-associated binding protein-1) and SHC are phosphorylated by TrkA. As soon as it is activated, they are associated with Grb2, producing a complex that activates PI3K (Holgado-Madruga *et al.*, 1997). However, Trk phosphorylation can also promote the phosphorylation of the insulin 1 receptor, which recruits and activates PI3K (Yamada *et al.*, 1997). Once activated, either by Ras or by its independent pathway, the PI3K phosphorylates important proteins: the Akt (also known as kinase B protein), the RAC-PK and the ribosomal protein p70 S6 kinase (p70S6K or p70) (Chung *et al.*, 1994; Marte *et al.*, 1997). The Akt is considered the most important protein phosphorylated by PI3K, controlling the activity of several other important proteins for cellular survival. This process occurs through the regulation of proteins that control the activity of transcriptional factors which promote apoptosis (Brunet *et al.*, 2003), such as the BAD cascade (a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family) (Yuan *et al.*, 2001).

The role of PI3K on cellular growth and differentiation occurs through phosphorylated phosphatidylinositol that recruits guanine exchange factors Cdc42/Rho/Rac (GEF), which act on the organization of actin filaments into the cytoskeleton, improving mitotic fuse orientation (Yuan *et al.*, 2003).

The activation of PLC $\gamma$  by Trk promotes an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and the regulation of kinase C protein. These activate numerous intracellular enzymes, including all isoforms of kinase C protein and calcium/calmodulin dependent protein kinase C (CaMK II), which then activate other important proteins. One such important protein is the MEK and ERK1/ERK2 (Corbit *et al.*, 1999).

Other Ras independent pathways have been related to cellular survival and differentiation. Among them, the phosphorylation of the SNT molecule by NGF (Rabin *et al.*, 1993) can be highlighted. In this case, once phosphorylated, the SNT is translocated into the



nucleus, where it acts as a transcriptional factor, regulating the genes that control cell cycle (Rabin *et al.*, 1993).

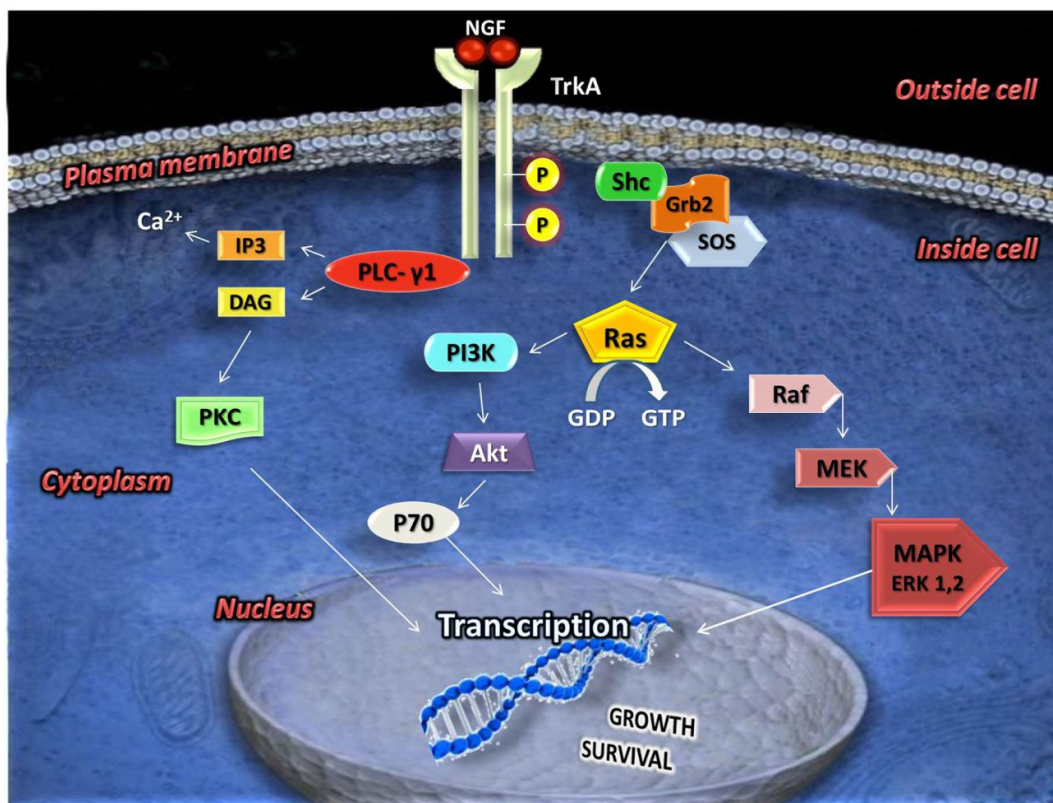


Figure 2. Schematic representation of signaling pathways between NGF and TrkA. NGF binds to its receptor TrkA, leading to the dimerization and autophosphorylation. The Shc adaptor molecule binds to the phosphate in the receptor and to the complex Grb2-SOS. The Ras complex activates, exchanging the GDP to GTP. The activated Ras interacts directly with the Raf protein, which leads to the sequential activation of MEK and MAPK. The MAPK translocate to the nucleus, where it phosphorylates transcriptional factors, promoting the cellular differentiation. The Ras also promotes PI3K activation, which activates substances responsible for follicular survival and growth. Activation of PLC $\gamma$ 1 results in the release of Ca<sup>2+</sup> and PKC activation.

### Expression of NGF and its receptor in the ovary

The expression of NGF and its receptors (TrkA and p75) was verified in the ovarian cells (oocyte, granulosa, theca and interstitial cells) of several species, including human (Spears, 2003; Salas *et al.*, 2006), rodent (Romero *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2004), bovine (Dissen *et al.*, 2000; Levanti *et al.*, 2005), ovine (Barboni, 2002) and caprine (Ren *et al.*, 2005). Thus, NGF

and its receptors regulate several functions in the ovary, such as sexual development (Lara *et al.*, 1990), follicular development and ovulation (Dissen *et al.*, 1996; 2001), through autocrine and paracrine ways.

In bovine, Levanti *et al.* (2005) verified by immunohistochemistry a weak immunostaining for the protein p75 in the ovarian stromal, and a high immunoreactivity in the oocytes of preantral follicles (primordial, primary and secondary) and early antral (tertiary). The immunoreactivity for the TrkA receptor was found in the oocyte, granulosa and theca cells, and appeared independent of the follicular maturation stage. In swine ovaries, the primordial and primary follicles showed positive immunostaining for p75 and TrkA only in granulosa cells, while in tertiary follicles, this same receptor was found both in follicular cells and oocyte. In addition, a weak immunoreactivity was found in stromal cells and high in corpus luteum cells (Levanti *et al.*, 2005).

Using immunofluorescence, the protein for TrkA receptor was localized in the oocytes of mouse primordial follicles (Dissen *et al.*, 2001), while NGF ligand was expressed in the theca and granulosa cells of preantral and antral follicles in rat ovaries (Dissen *et al.*, 1991). The expression pathways found in the oocytes and somatic cells indicate that NGF is a potential factor that can regulate intra-oocyte activation of PI3K (Adhikari & Liu, 2009). Noticeable amounts of NGF were also detected in the follicular fluid of rat antral follicles (Barboni *et al.*, 2002), probably originated by granulosa and theca cells (Dissen *et al.*, 2001).

In addition, other immunocytochemical studies revealed that the protein for p75 receptor was expressed in the mesenchyme cells in the rat fetal ovary (Dissen *et al.*, 1995; Ojeda *et al.*, 2000). In hamsters, the staining for NGF and its receptors (TrkA and p75) was detected in the oocyte, granulosa, theca, interstitial and luteinic cells of all follicular categories (Shi *et al.*, 2004). In mouse, the TrkA was localized in the oocytes, granulosa and theca cells of primary and secondary follicles, while the p75 receptor was localized only in interstitial cells (Dissen *et al.*, 2001; Weng *et al.*, 2009). In *Rhesus* monkey ovaries, the detection of the mRNA expression for p75 receptor by immunocytochemical processes indicates that this organ is able to synthesize this receptor (Dees *et al.*, 1995).

## **Role of NGF on follicular development**

Survival

Some studies have demonstrated that NTs and their receptors play an important role on the development of the mammal ovary, oogenesis, folliculogenesis and embryo development (Bjorling *et al.*, 2002; Krizsan-Agbas *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2005). Among them, NGF is highlighted because of its role on follicular survival.

The NGF is a protein necessary to the maintenance, survival and development of neuronal population in the central and peripheric nervous system (Angeletti & Bradshaw, 1971; Levi-Montalcini, 1987; Snider, 1994). In the ovaries, NGF also acts as a trophic support in the sympathetic innervation of this organ, which is important to folliculogenesis (Dissen *et al.*, 2001). The direct action of NGF on follicular survival was demonstrated by Chaves *et al.* (2010). These authors cultivated caprine preantral follicles enclosed in fragments of ovarian tissue in the presence of NGF, demonstrating the ability of NGF in maintaining *in vitro* follicular survival and ultrastructure in a dose-dependent way. In humans, the culture of fetal ovaries of 13-16 weeks of age in the presence of a Trk inhibitor resulted in a decrease in oogonia survival (Spears *et al.*, 2003), demonstrating that NGF has a fundamental role in the maintenance of survival and that the receptor which acts in this signaling pathway is TrK. Moreover, analysis of NGF expression and its receptors in antral follicles during the estrous cycle demonstrate that atretic follicles in the proestrus phase showed a higher level of p75 expression than in others days of the cycle (Shi *et al.*, 2004).

In addition to the direct action, NGF may act indirectly in follicular survival through the production of biological active receptors for follicle stimulating hormone (FSH; receptors: FSHR) (Salas *et al.*, 2006). Rats ovaries treated with NGF developed the capacity to response to FSH, with the formation of cAMP in preantral follicles (Romero, 2002). Similar results were obtained in humans, in which the culture of granulosa cells with NGF also increased the expression for FSHR in these cells (Salas *et al.*, 2006). Knowing FSH is a gonadotrophin that acts as a survival factor in the culture of preantral follicles (Matos *et al.*, 2007); we can assume that any substance which increases the number of FSHR, such as NGF, is important.

However, high concentrations of NGF may be harmful to the female reproductive lifespan, since it may reduce fertility (Dissen *et al.*, 2009). This fact was confirmed recently in the ovaries of transgenic animals with the excessive production of NGF, which caused an increase in the apoptosis rate of granulosa cells, due to the super production of the protein stathmin (STMN1) within ovaries. In the phosphorylated stage, this protein is expressed in granulosa cells and is responsible for the intermediation of a cell death signal initiated by tumoral necrosis factor  $\alpha$  (TNF). In transgenic animals, researchers also observed an increase in TNF synthesis and the blockage of the phosphorylation of STMN1 protein by tyrosine kinase

receptors. Thus, the inhibition of the TNF actions *in vivo*, through the administration of a soluble TNF receptor, blocked the increase in phosphorylated STMN1 production, as well as apoptosis of granulosa cells in the ovaries of these animals (Garcia-Rudaz *et al.*, 2011). Moreover, in transgenic animals with excessive production of NGF, there is a tendency for the formation of ovarian cysts (Dissen *et al.*, 2009). This predisposition occurs due to the high production of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, testosterone and estradiol in response to gonadotrophins, especially the high levels of LH (Garcia-Rudaz *et al.*, 2011).

#### Activation of primordial follicles

After the organization of oocytes and somatic cells in primordial follicles, the newly formed follicles pass through a differentiation process in which flattened pre-granulosa cells located around the oocyte acquire a cuboidal morphology, in a process called follicular activation (Hirshfield *et al.*, 1991; Fahnestock *et al.*, 2004). NGF and its receptors seem to be involved in this process, as NGF is present in the follicles of primordial stage in rats. Studies with NGF knockout mice showed that these animals had a reduced number of primary and secondary follicles (Dissen *et al.*, 2001; Dissen *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2002). The absence of NGF promoted a reduction in the proliferation rate of mesenchyme somatic cells before the formation of primordial follicles, detected *in vivo* and *in vitro*, consequently leading to an increase in the number of oocytes that are not involved by somatic cells to form the primordial follicles (Ojeda *et al.*, 2000). In addition, functional analysis using neonate ovaries in *in vitro* culture systems have confirmed that an increase in NGF promotes an increase in the activation rate of primordial follicles (Paredes *et al.*, 2004).

In the beginning of the pre-granulosa differentiation and cellular growth in primary follicles, NGF seems to interact with other growth factors, such as growth and differentiation factor-9 (GDF-9) and kit ligand (KL) (Oktay *et al.*, 1995). Another indication of the NGF role on follicular activation is the inhibition of TrkA receptor, which is related to a reduction in developing follicles. Granulosa cells of rat primary follicles showed a higher expression of TrkA than those of more developed follicles, indicating that NGF seems to be most important in the early follicular development. However, in bovine, the expression of this factor remained at constant levels throughout all folliculogenesis (Dissen *et al.*, 2000).

In contrast to the NGF knockout, rats with mutation for p75 receptor showed a normal population of primordial, primary and secondary follicles (Lee *et al.*, 1992; Ojeda *et al.*, 2000). Moreover, the ovaries of knockout mice for p75 showed an increase in the number of primary

and secondary follicles (Ojeda *et al.*, 2000). Thus, the results suggest that p75 may act as a modulator in pre-thecal mesenchyme cells, regulating follicular activation.

It is interesting to note however, that no effect of NGF (1, 10, 50, 100 and 200 ng/mL) was observed in the transition from primordial to primary follicles in caprine (Chaves *et al.*, 2010). This fact was previously confirmed by Nilsson *et al.* (2009), in which the ovaries treated with 50 ng/mL of NGF did not show any effect in the transition from primordial to primary follicles in rats. One hypothesis that could explain this result would be the presence of stimulatory substances for the activation of primordial follicles, such as insulin, in the basic medium.

### Follicular growth

Cellular growth is related to the ability to promote proliferation of mesenchyme and follicular cells, as well as to induce the FSHR synthesis (Romero *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2006). In this aspect, NGF has been associated with follicular growth because it shows mitogenic effects in several types of nonneural cells, including the lines of mesenchyme (Cordon-Cardo *et al.*, 1991; Sortino *et al.*, 2000; Dissen *et al.*, 2000) and epithelial cells (Garcia-Suarez *et al.*, 2000).

In a previous study (Dissen *et al.*, 2001), researchers observed that secondary follicle development is reduced in NGF gene knockout mice. Using immunohistochemical techniques for the detection of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and bromodeoxyuridine (BrdU), there is a reduction in the proliferation rate of mesenchyme line cells and epithelial cells within the ovaries of these mice, respectively. One explanation is that there may be an involvement of Trk receptors in the mediation of the facilitator effect of NGF on the somatic cell proliferation in the ovary (Dissen *et al.*, 1996).

The growth factors of TGF- $\beta$  superfamily which are produced by the mesenchyme cells in the ovary may be among other potential factors which interact with NGF on follicular growth. They also regulate the growth and differentiation of follicular cells and of the ovary (Skinner *et al.*, 1987; Gitay-Goren *et al.*, 1993), facilitating FSH dependent events, such as aromatase activity (Bendell *et al.*, 1988), steroidogenesis (Dodson *et al.*, 1987) and the formation of receptors for luteinizing hormone (LH) (Kim *et al.*, 1994).

Although some studies indicate mitogenic effects of NGF, in caprine, NGF did not promote follicular and oocyte growth after 7 days of culture within ovarian fragments (Chaves *et al.*, 2010). This discrepancy may be attributed to the culture conditions utilized such as the

concentration of NGF, culture period, differences between the species or cellular types.

NGF also has the indirect capacity to induce angiogenesis in several tissues, such as the skin (Chiaretti *et al.*, 2002), skeletal muscle (Emanuelli *et al.*, 2002), cornea (Seo *et al.*, 2001) and central nervous system (Calza *et al.*, 2001) through the stimulus of vascular endothelial growth factor (VEGF) production (Julio-Pieper *et al.*, 2009). Studies revealed that VEGF, besides being a potent mitogenic factor, also has an important role in the regulation of the vascular structure and to increase capillary permeability (Redmer *et al.*, 2001). Moreover, Bruno *et al.* (2009) showed that VEGF acts on follicular survival and development, promoting an increase in follicle and oocyte diameters in caprine preantral follicles. However, these findings also indicate that NGF may participate in ovarian disturbances, such as polycystic ovaries, ovarian tumors and ovarian hyper stimulation syndrome, all subjacent of ovarian angiogenesis (Agrawal *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 2002).

### **Final consideration**

NGF was found 50 years ago as a molecule that promoted the survival and differentiation of sympathetic and sensory neurons. Its role on neuronal development has been extensively characterized, but recent findings suggest an unexpected diversity of NGF actions in other organs, such as the ovary. Studies demonstrate the essential role of NGF in mammal folliculogenesis both in a direct way, such as through the nervous stimulus in the ovary, or by its indirect role, through the mesenchyme cells (theca cells).

The complete understanding of NGF actions within the ovaries is still unclear due to the great variety of kinases that may be expressed and also by the lack of studies on this growth factor in the ovary. Thus, the use of NGF in the *in vitro* culture media of ovarian follicles may be of fundamental importance to promote follicular development.

### **Acknowledgments**

R.N. Chaves is a recipient of a grant from CNPq (Brazil). The authors thank Casie Bass for revision of the manuscript.

## References

- Adhikari, D. & Liu, K. (2009). Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocr. Rev.* **30**, 438-464.
- Agrawa, L.R., Sladkevicius, P., Engmann, L., Conway, G.S., Payne, N.N., Bekis, J., Tan, S.L., Campbell, S. & Jacobs, H.S. (1998). Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum. Reprod.* **13**, 651-655.
- Airaksinen, M.S. & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 383-394.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004). *Sinalização por meio de receptores de superfície celular associados a enzimas*. Biologia molecular da célula, 4.ed. Porto Alegre, Br: Editora Artes Médicas. pp. 871-892.
- Albert, C., Garrido, N., Mercader, A., Rao, C.V., Remohí, J., Simon, C. & Pellicer, A. (2002). The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 409-418.
- Aloe, L. (2004). Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends. Cell. Biol.* **14**, 395-399.
- Angeletti, R.H. & Bradshaw, R.A. (1971). Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 2417-2420.
- Barboni, B., Mattioli, M., Giogia, L., Turriani, M., Capacchietti, G., Berardinelli, P. & Bernabo, N. (2002). Preovulatory rise of NGF in follicular fluid: possible involvement in the control of oocyte maturation. *Microsc. Res. Tech.* **59**, 516-521.
- Barker, P.A. (2004). p75NTR is positively promiscuous: Novel partners and new insights. *Neuron.* **42**, 529-533.
- Bhakar, A.L., Howell, J.L., Paul, C.E., Salehi, A.H., Becker, E.B., Said, F., Bonni, A. & Barker, P.A. (2003). Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J. Neurosci.* **23**, 11373-11381.
- Barrett, G.L. (2000). The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* **61**, 205-229.
- Baud, V. & Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **8**, 33-40.

- Bendell, J.J. & Dorrington, J. (1988). Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor-beta-like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology*. **123**, 941-948.
- Bjorling, D.E., Beckman, M., Clayton, M.K. & Wang, Z.Y. (2002). Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience*. **110**, 155-67.
- Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Albers, K.M., Chen, L.H., Welker, P. & Source, P.R. (2000). A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB. J.* **14**, 1931-42.
- Brunet, A., Datta, S.R. & Greenberg, M.E. (2001). Transcription-dependent and independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 297-305.
- Bruno, J.B., Celestino, J.J.H., Lima-Verde, I.B., Lima, L.F., Matos, M.H.T., Araújo, V.R., Saraiva, M.V.A., Martins, F.S., Name, K.P.O., Campello, C.C., Bão, S.N., Silva, J.R.V. & Figueiredo, J.R. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. *Reprod. Fert. Develop.* **21**, 679-687.
- Calza, L., Giardino, L., Giuliani, A., Aloe, L. & Levi-Montalcini, R. (2001). Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 4160-4165.
- Caporali, A. & Emanuelli, C. (2009). Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol. Rev.* **89**, 279-308.
- Chao, V.M. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature Rev.* **4**, 299-309.
- Chiaretti, A., Piastra, M., Caresta, E., Nanni, L. & Aloe, L. (2002). Improving ischaemic skin revascularisation by nerve growth factor in a child with crush syndrome. *Arch. Dis. Child.* **87**, 446-448.
- Chung, J., Grammer, T., Lemon, K., Kazlauskas, A. & Blenis, J. (1994). PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* **370**, 71-75.
- Corbit, K.C., Foster, D.A. & Rosner, M.R. (1999). Protein kinase C delta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4209-4218.



Cordon-Cardo, C., Tapley, P., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E., Lamballe, F., Kovary, K., Jones, K., Reichardt, L.F. & Barbacid, M. (1991). The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neuro-trophin-3. *Cell*. **66**, 173-183.

Covaceuszach, S., Cassetta, A., Cattaneo, A. & Lamba, D. (2004). Purification, crystallization, X-ray diffraction analysis and phasing of a Fab fragment of monoclonal neuroantibody alphaD11 against nerve growth factor. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 1323-1327.

Crews, C., Alessandrini, A. & Erikson, E. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. **258**, 478-480.

Dissen, G.A., Garcia-Rudaz, C., Paredes, A., Mayer, C., Mayerhofer, A. & Ojeda, S.R. (2009). Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*. **150**, 2906-2914.

Dissen, G.A., Hill, D.F., Costa, M.E., Ma, Y.J. & Ojeda, S.R. (1991). Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1642-1650.

Dees, W.L., Hiney, J.K., Schultea, T.D., Meyerhofer, A., Danilchik, M., Dissen, G.A. & Ojeda, S.R. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expression nerve growth factor receptors. *Endocrinology*. **136**, 5760-5768.

Dissen, G.A., Hirshfield, A.N., Malamed, S. & Ojeda, S.R. (1995). Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*. **136**, 4681-4692.

Dissen, G.A., Parrott, J.A., Skinner, M.K., Hill, D.F., Costa, M.E. & Ojeda, S.R. (2000). Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*. **141**, 4736-4750.

Dissen, G.A., Romero, C., Hirshfiel, A.N. & Ojeda, S.R. (1996). A role for trkA nerve growth factor recptores in mammalian ovulation. *Endocrinology*. **137**, 198-209.

Dissen, G.A., Romero, C., Hirshfield, A.N. & Ojeda, S.R. (2001). Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*. **142**, 2078-2086.

Dissen, G.A., Romero, C., Paredes, A. & Ojeda, S.R. (2002). Neurotrophic control of ovarian development. *Microsc. Res. Tech.* **59**, 509-515.

Dodson, W.C. & Schomberg, D.W. (1987). The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. **120**, 512-516.

- Fahnestock, M., Yu, G. & Coughlin, M.D. (2004). ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog. Brain. Res.* **146**, 101-110.
- Garcia-Rudaz, C., Dorfman, M., Nagalla, S., Svechnikov, K., Söder, O., Ojeda, S.R. & Dissen, G.A. (2011). Excessive ovarian production of nerve growth factor elicits granulosa cell apoptosis by setting in motion a tumor necrosis factor  $\alpha$ /stathmin-mediated death signaling pathway. *Reproduction*, **142**, 319-331.
- Emanuelli, C., Salis, M.B., Pinna, A., Graiani, G., Manni, L. & Madeddu, P. (2002). Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hind limbs. *Circulation*. **106**, 2257-2262.
- Garcia-Suarez, O., Germana, A., Hannestad, J., Ciriaco, E., Laura, R., Naves, J., Esteban, I., Silos-Santiago, I. & Veja, J.A. (2000). TrkA is necessary for the normal development of the murine thymus. *J. Neuroimmunol.* **108**, 11-21.
- Gitay-Goren, H., Kim, I.C., Miggans, S.T. & Schomberg, D.W. (1993). Transforming growth factor beta modulates gonadotropin receptor expression in porcine and rat granulosa cells differently. *Biol. Reprod.* **48**, 1284-1289.
- Glebova, N.O. & Ginty, D.D. (2005). Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 191-222.
- GrandPré, T., Li, S. & Strittmatter, S.M. (2002). Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*. **417**, 547-51.
- Greco, A., Villa, R. & Pierotti, M.A. (1996). Genomic organization of the human NTRK1 gene. *Oncogene*. **13**, 2463-2466.
- Haase, G., Pettmann, B., Raoul, C. & Henderson, C.E. (2008). Signaling by death receptors in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 284-291.
- Halböök, F., Lundin, L.G. & Kullander, K. (1998). Lampetra fluviatilis neurotrophin homolog, descendant of a neurotrophin ancestor, discloses the early molecular evolution of neurotrophins in the vertebrate subphylum. *J. Neurosci.* **18**, 8700-8711.
- He, X.E. & Garcia, K.C. (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science*. **304**, 870-875.
- Hirshfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* **124**, 43-101.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emler, D.R., Dieterich, R. & Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 12419-12424.

- Ibañez, C.F. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* **21**, 438-444.
- Julio-Pieper, M., Lozada, P., Tapia, V., Veja, M., Miranda, C., Vantman, D., Ojeda, S.R. & Romero, C. (2009). Nerve growth factor induces vascular endothelial growth factor expression in granulosa cells via a trkA receptor/mitogen-activated protein kinase-extracellularly regulated kinase 2-dependent pathway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 3065-3071.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. & Parada, L.F. (1991). The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science.* **252**, 554-558.
- Kaplan, D.R. & Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381-391.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* **441**, 431-436.
- Kim, S.J., Park, K., Rudkin, B.B., Dey, B.R., Sporn, M.B. & Roberts, A.B. (1994). Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 3739-3744.
- Kohn, J., Aloyz, R.S., Toma, J.G., Haak-Frendscho, M. & Miller, F.D. (1999). Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J. Neurosci.* **19**, 5393-5408.
- Krizsan-Agbas, D., Pedchenko, T., Hasan, W. & Smith, P.G. (2003). Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2760-2768.
- Lara, H.E., McDonald, J.K. & Ojeda, S.R. (1990). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology.* **126**, 364-375.
- Lebova, N.O. & Ginty, D.D. (2005). Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation *In vivo*. *J. Neurosci.* **24**, 743-751.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. & Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* **294**, 1945-1948.
- Lenz, G. (2000). *Mecanismos de Transdução de Sinal Ativados por Purinas, Pirimidinas e Fatores de Crescimento em Culturas de Astrócitos*. [in Portuguese]. Porto Alegre, Brazil: Federal University of Rio Grande do Sul. Thesis.
- Levanti, M.B., Germanà, A., Abbate, F., Montalbano, G., Veja, J.A. & Germanà, G. (2005). TrkA and p75 NTR in the ovary of adult cow and pig. *J. Anat.* **207**, 93-96.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science.* **237**, 1154-1162.

- Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S. & Wetzker, R. (1997). Linkage of G Protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase. *Science*. **275**, 394-397.
- Ludwig, M., Jelkmann, W., Bauer, O. & Diedrich, K. (1999). Prediction of severe ovarian hyperstimulation syndrome by free serum vascular endothelial growth factor concentration on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Hum. Reprod.* **14**, 2437-2441.
- Marte, B.M. & Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 355-358.
- Matos, M.H., Lima-Verde, I.B., Bruno, J.B., Lopes, C.A., Martins, F.S., Santos, K.D., Rocha, R.M., Silva, J.R., Bao, S.N. & Figueiredo, J.R. (2007). Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 677-684.
- Mayerhofer, A., Dissen, G.A., Costa, M.E. & Ojeda, S.R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. **138**, 3320-3329.
- McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A. & Blundell, T.L. (1991). "New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor". *Nature*. **354**, 411-414.
- Molloy, N.H., Read, D.E. & Gorman, A.M. (2011). Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers*. **3**, 510-530.
- Mouri, A., Nomoto, H. & Furukawa, S. (2007). Processing of nerve growth factor: The role of basic amino acid clusters in the pro-region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 1056-1062.
- Nilsson, E., Dole, G. & Skinner, M.K. (2009). Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Reproduction*. **138**, 697-707.
- Nimnual, A.S., Yatsula, B.A. & Bar-Sagi, D. (1998). Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*. **279**, 560-563.
- Nomoto, H., Takaiwa, M., Mouri, A. & Furukawa, S. (2007). Pro-region of neurotrophins determines the processing efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 919-924.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L. & Petersen, C.M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*. **427**, 843-848.
- Ojeda, S.R. & Dissen, G.A. (1994). Developmental regulation of the ovary via growth factor tyrosine kinase receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **5**, 317-23.

- Ojeda, S.R., Romero, C., Tapia, V. & Dissen, G.A. (2000). Neurotrophic and cell–cell dependent control of early follicular development *Molecular and Cellular Endocrinology*. **163**, 67-71.
- Oktay, K., Schenken, R.S. & Nelson, J.F. (1995). Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol. Reprod.* **53**, 295-301.
- Paredes, A., Romero, C., Dissen, G.A., DeChiara, T.M., Reichardt, L., Cornea, A., Ojeda, S.R. & Xu, B. (2004). TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Developm. Biol.* **267**, 430-449.
- Rabin, S., Cleghorn, V. & Kaplan, D. (1993). SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2203-2213.
- Redmer, D.A., Doraiswamy, V., Bortnem, B.J., Fisher, K., Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A.T. & Reynolds, L.P. (2001). Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* **65**, 879-889.
- Ren, L.Q., Medan, M.S., Weng, Q., Jin, W., Li, C.M., Watanabe, G. & Taya, K. (2005). Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. *J. Reprod. Dev.* **51**, 399-404.
- Robinson, K.N., Manto, K., Buchsbaum, R.J., MacDonald, J.I. & Meakin, S.O. (2005). Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA. *J. Biol. Chem.* **280**, 225-235.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. & Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras, *Nature*. **370**, 527-532.
- Romero, C.A., Paredes, A., Dissen, G.A. & Ojeda, S.R. (2002). Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. **143**, 1485-1494.
- Roux, P.P. & Barker, P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* **67**, 203-233.
- Salas, C.M., Julio-Pieper, M., Valladares, M., Pommer, R., Veja, M., Mastronardi, C., Kerr, B., Ojeda, S.R., Lara, H.E. & Romero, C. (2006). Nerve growth factor-dependent activation of TrkA receptors in the human ovary results in synthesis of FSH receptors and estrogen secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 2396-2403.

- Seo, K., Choi, J., Park, M. & Rhee, C. (2001). Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J. Vet. Sci.* **2**, 125-130.
- Shi, Z., Jin, W., Watanabe, G., Suzuki, A.K., Takahashi, S. & Taya, K. (2004). Expression of nerve growth factor (NGF) and its receptors TrkA and p75 in ovaries of the cyclic golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the regulation of their production by luteinizing hormone. *J. Reprod. Dev.* **50**, 605-611.
- Silva, B.V., Horta, B.A.C., Alencastro, R.B. & Pinto, A.C. (2009). Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim. Nova.* **32**, 453-462.
- Simi, A. & Ibanez, C.F. (2010). Assembly and activation of neurotrophic factor receptor complexes. *Dev. Neurobiol.* **70**, 323-331.
- Skinner, M.K., Lobb, D. & Dorrington, J.H. (1987). Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology.* **121**, 1892-1899.
- Snider, W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* **77**, 627-638.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L. & Mobley, W.C. (2001). Nerve Growth Factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Ann. Rev. Neurosc.* **24**, 1217-1281.
- Sortino, M.A., Condorelli, F., Vancheri, C., Chiarenza, A., Bernardini, R., Consoli, U. & Canonico, P.L. (2000). Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high- and low-affinity NGF receptors. *Mol. Endocrinol.* **14**, 124-136.
- Spears, N., Molinek, M.D., Robinson, L.L., Fulton, N., Cameron, H., Shimoda, K., Telfer, E.E., Anderson, R.A. & Price, D.J. (2003). The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development.* **130**, 5481-5491.
- Terenghi, G. (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* **194**, 1-14.
- Tessarollo, L. (1998). Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 125-137.
- Valent, A. & Bernheim, A. (1997). Mapping of the tyrosine kinase receptors TRKA (NTRK1), TRKB (NTRK2) and TRKC (NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence *in situ* hybridization. *Eur. J. Human Genet.* **5**, 102-104.
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R.S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I., Friedman, W.J., Schiavo, G., Bastiaens, P.I., Verveer, P.J., Carter, B.D. & Ibanez, C.F. (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron.* **62**, 72-83.

- Weng, Q., Shi, Z.Q., Tukada, J., Watanabe, G. & Taya, K. (2009). Immunodetection of NGF, TrkA, p75 and Inhibin  $\alpha$ -Subunit in Interstitial Cells of Golden Hamsters Treated with Hcg. *J. Reprod. Dev.* **55**, 20.
- Wood, K.W., Sarnecki, C., Roberts, T.M. & Blenis, J. (1992). Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell.* **68**, 1041-1050.
- Xing, J., Kornhauser, J.M., Xia, Z., Thiele, E.A. & Greenberg, M.E. (1998). Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1946-1955.
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Nakatani, A., Ikeuchi, T. & Hatanaka, H. (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **272**, 30334-30339.
- York, R.D., Molliver, D.C., Grewal, S.S., Stenberg, P.E., McCleskey, E.W. & Stork, P.J.S. (2000). Role of Phosphoinositide 3-Kinase and Endocytosis in Nerve Growth Factor-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation via Ras and Rap1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8069-8083.
- Yuan, C., Hu, H. & Xu, G. (2001). Single amino-acid substitution in the N-terminal arm altered the tetramer stability of rat muscle lactate dehydrogenase A. *Sci. China C. Life Sci.* **44**, 576-84.
- Yuan, J., Lipinski, M. & Degtarev, A. (2003). Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron.* **40**, 401-413.

## 8. CAPÍTULO III

---

### **A família do fator de crescimento de fibroblasto: Propriedades estruturais e biológicas na reprodução de fêmeas mamíferas**

*(The fibroblast growth factor family: structural and biological properties in the mammalian  
female reproductive)*

**Periódico:** *Reproduction, Fertility and Development* (Aceito para publicação em 22/11/2011).



## **Resumo**

Vários fatores de crescimento têm sido identificados agindo localmente no ovário para regular maturação folicular e a ovulação. Os membros da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) são potentes agentes mitogênicos e estão envolvidos na diferenciação e migração celular, bem como nos processos angiogênicos em muitos tecidos e órgãos. Além do FGF-2, que é o membro mais estudado da família, outros membros importantes para a reprodução são FGF-1, -5, -7, -8, -9 e -10. Estudos imunohistoquímicos e moleculares têm revelado que as atividades biológicas de ligantes e receptores dos membros da família FGF são importantes no controle da viabilidade e proliferação celular nos tecidos reprodutivos. Coletivamente, esses estudos estabeleceram o conceito de que FGFs desempenham um papel importante na regulação do início do crescimento de folículos primordiais, sobrevivência folicular e oocitária, proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca, formação de corpo lúteo, esteroidogênese e angiogênese. O objetivo desta revisão é destacar a importância dos FGFs na reprodução dos mamíferos, fornecendo uma melhor compreensão desta família na fisiologia ovariana e na fertilidade das fêmeas.

**Palavra-chave:** Foliculogênese, ovário, FGF-2.

**The fibroblast growth factor family: structural and biological properties in the mammalian female reproductive**

Roberta Nogueira Chaves<sup>a\*</sup>, Maria Helena Tavares de Matos<sup>b</sup>, José Buratini Jr.<sup>c</sup>, José Ricardo de Figueiredo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, 60740-903, CE, Brazil.

<sup>b</sup> Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, 48902-300, PE, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Physiology, Institute of Biosciences, State University Paulista, Botucatu, 18618-000, SP, 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: 60740-903

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rncvet@gmail.com (R.N. Chaves)

## **Abstract**

Several growth factors have been identified as acting locally within the ovary to regulate follicle maturation and ovulation. The fibroblast growth factor (FGF) family members are potent mitogen and involved in cell differentiation, cell migration and angiogenesis in many tissues and organs. In addition to FGF-2, which is the most studied member of this family, other important members are FGF-1, -5, -7, -8, -9, and -10. Immunohistochemical and molecular studies have revealed that biological activities of ligands and receptors of the FGF family members are important in controlling viability and cellular proliferation in reproductive tissues. Collectively, these studies have established the concept that FGFs play important roles in regulating the initiation of primordial follicle growth, oocyte and follicle survival, granulosa and theca cells proliferation and differentiation, corpus luteum formation, steroidogenesis, and angiogenesis. The purpose of this review is to highlight the importance of the FGFs on mammalian reproduction, providing a better understanding of this family in ovarian physiology and female fertility.

**Keywords:** Folliculogenesis, ovary, FGF-2.

## **1. Introduction**

Normal ovarian function is essential for the reproductive success of females. The growth and development of the follicles through successive stages within the ovary are highly dependent on effective two-way communication between oocyte and granulosa cells and between granulosa and theca cells. It also requires the interaction between endocrine and paracrine signals, which act on the two types of somatic cell and the oocyte (Knight and Glister 2006). One well-known paracrine ligand is the fibroblast growth factor (FGF) family, which is also involved in paracrine signaling within the follicle (Van Der Hurk and Zhao 2005).

The FGFs are a family of heparin-binding growth factors, which effects are mediated via tyrosine kinase receptors (Fernig and Gallagher 1994). Several studies demonstrated that this family plays an important role in maintaining homeostasis in many tissues and organs (Itoh and Ornitz 2011). The most studied member of this family is FGF-2, which has been shown to stimulate a wide range of biological processes such as cell proliferation, differentiation (Anderson and Lee, 1993), migration (Berisha *et al.* 2006a) and apoptosis (Tilly *et al.* 1992). Furthermore, after several key papers that reported the expression of components of the FGF

family in mammalian reproductive tissues (Ben-Haroush *et al.* 2005; Buratini *et al.*, 2005a, 2007), experimental studies were performed that demonstrated the critical involvement of the FGF family in the regulation of reproductive processes, particularly in ovarian folliculogenesis (Nillson *et al.* 2001; Matos *et al.* 2007a, b; Chaves *et al.* 2010). Studies dealing with the roles of the FGF family in reproductive physiology have provided new insight into our understanding of the physiological regulation of key reproductive processes.

This review will focus on the intraovarian roles of FGF family members on the regulation of mammalian female reproduction. We will highlight the expression pattern of FGF ligands and receptors, the specific biological activities of FGF family members in regulating reproductive processes, and the genetic studies that have provided particular insight into the role of the FGF system in regulating mammalian fertility.

## **2. The FGF family: biological activities, ligands and receptors**

FGFs constitute one of the largest families of growth and differentiation factors in cells of mesodermal and neuroectodermal origin (Itoh 2007). These FGFs can be classified as paracrine, endocrine and intracrine factors (Fig. 1). Paracrine FGFs mediate biological responses by binding to and activating cell surface tyrosine kinase FGF receptors (FGFRs). They act as local paracrine signaling molecules and function in multiple developmental processes including differentiation, cell proliferation and migration (Beenken and Mohammadi 2009). Endocrine FGFs are thought to mediate biological responses in an FGFR-dependent manner. However, they function over long distances as endocrine hormones (Kharitonov 2009; Itoh 2010). In contrast, intracrine FGFs act as FGFR-independent intracellular molecules that regulate the function of voltage gated sodium channels (Goldfarb *et al.* 2007; Laezza *et al.* 2009). Paracrine FGFs, the target of the present study, comprise members of the FGF-1/2/5, FGF-3/4/6, FGF-7/10/22, FGF-8/17/18 and FGF-9/16/20 subfamilies (Itoh and Ornitz 2011).

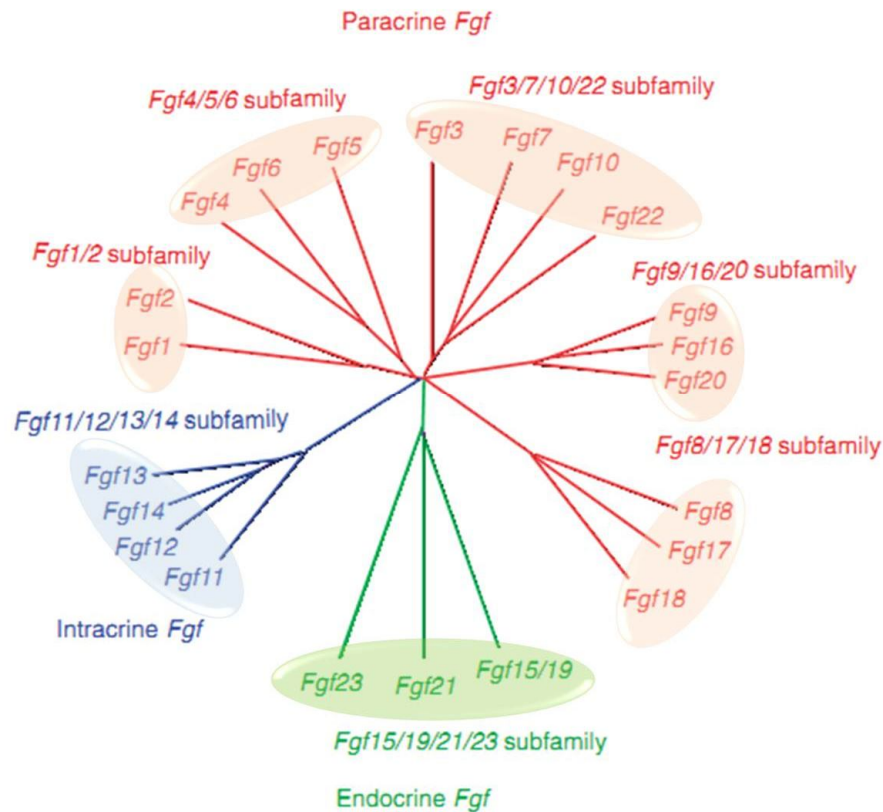


Figure 1. Phylogenetic tree of the FGF family. Phylogenetic analysis suggests that 22 FGF genes can be arranged into seven subfamilies containing two to four members each. Adapted: Popovici *et al.* 2004.

The FGF family is emerging as a group of factors that are involved in the regulation of ovarian function. This family consists of 22 peptides, which have been grouped into 7 subfamilies with distinct receptor-binding properties (Itoh and Ornitz 2011). The FGF family ranges in molecular mass from 17 to 34 kDa and are composed of 150 to 250 amino acids that share 13 to 71% homology (Itoh and Ornitz 2004; Katoh and Katoh 2005). They are produced by vascular endothelial and smooth muscle cells, hence their almost omnipresent distribution (Felmeden *et al.* 2003). In addition to FGF-2, which is the most characterized and studied of this family, other members such as FGF-1, -5, -7, -8, -9 and -10, also have important functions in many tissues and organs, including pituitary, retina, adrenal and ovary (Ware and Matthey 2002, Lee *et al.* 2008). Among their recognized functions, FGFs regulate cell proliferation, differentiation, migration, steroidogenesis, angiogenesis (Itoh and Ornitz 2008; Beenken and Mohammadi 2009) and extracellular matrix (ECM) deposition (Datsis *et al.* 2011). These processes are of critical importance in follicular and embryo development, suggesting that

FGFs could play important roles in folliculogenesis and embryogenesis. In addition, their role was also demonstrated in limb, skeletal, lung, and brain development (Xu *et al.* 2005). Moreover, FGFs also play a significant part in at least three of the four phases of wound healing: inflammation, repair and regeneration (Finch and Rubin 2004). Further important functions of FGFs include tumor development and progression (Felmeden *et al.* 2003). The bioavailability of these molecules may be regulated by FGF binding proteins (FGFBPs), which are responsible for releasing the FGFs arrested in the ECM (Abuharbeid *et al.* 2006).

FGF family members are heparin-binding growth factors (Fornig and Gallagher 1994), which mediate their biological activities through two types (high affinity and low affinity) of FGFR (Cotton *et al.* 2008). Five known high affinity FGFR genes have been identified (FGFR-1–5; Itoh and Ornitz 2004). The FGFR-1-4 are tyrosine kinase receptors consisting of an intracellular tyrosine kinase domain, a single transmembrane domain, with an extracellular portion consisting of three Ig-like domains (D1, D2, D3), which are responsible for the interaction and specificity with the FGFs (Lih-Yuh *et al.* 2003). The most recently discovered FGFR-5 has two alternative transcripts: FGFR-5  $\gamma$  and  $\beta$  (Kim *et al.* 2001). This receptor did not show an intracellular tyrosine kinase domain like the others FGFRs, however, the extracellular domain residues, important to the binding to FGF ligands, are preserved (Sleeman *et al.* 2001). Binding studies have demonstrated that FGFR-5 is able to bind to FGF-2, but not to FGF-7. Nevertheless, its biological function remains unknown (Sleeman *et al.* 2001).

Following receptor binding, FGFs induce functional dimerization, phosphorylation of specific cytoplasmic tyrosine residues and activation of four key downstream signaling pathways: Ras/MAPK, PI3K/Akt, phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) and signal transducers and activators of transcription (STATs) (Deo *et al.* 2002; Turner and Grose 2010). These effectors in turn disseminate the receptor tyrosine kinase signals by activating many target proteins, including transcription factors in the nucleus (Fig. 2). The ligand-receptor interaction is coordinated through the combination of this complex to heparin or proteoglycans (heparin sulphate), giving more stability to the binding and dimerization of FGFRs. The intracellular binding of this complex (FGF-FGFR-Heparin) is mediated by the recruitment of a signaling protein family, known as FRS2 (FGF 2 receptor substrate), into the binding sites with the phosphorylated tyrosines (Eswarakumar *et al.* 2005). The phosphorylated tyrosine residue activates proteins containing the SH2 domain (Boilly *et al.* 2000). These domains are residues of 100 preserved amino acids with enzymatic activity (GTPases, phosphatases, PLC $\gamma$ ) or proteins that lost their enzymatic activity, called adaptor protein (Grb2 and Shc), which indirectly affect the enzymatic activity. The protein Grb2 (FGF 2 receptor binding protein)

binds to SOS, producing a Grb2-SOS complex, which activates the protein Ras. The activated Ras protein stimulates a signaling cascade through Raf (kinase specific for serine/threonine), MEK (MAPK kinase activator) and the isoforms ERK1/2 (kinases regulated by an extracellular signaling -1/-2). The Ras signaling pathway is crucial for cell proliferation, induced by FGF, in different cell population (Boilly *et al.* 2000). In other population, the proliferative effect of FGF is mediated through the proteins kinase C and PI3 kinase (Boilly *et al.* 2000). The activation of PLC $\gamma$  has an important role in the transmission of the biological signals of FGF-2, resulting in the hydrolysis of phosphatidylinositol-3-phosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG), releasing calcium and activating the PKC (Nugent and Iozzo 2000).

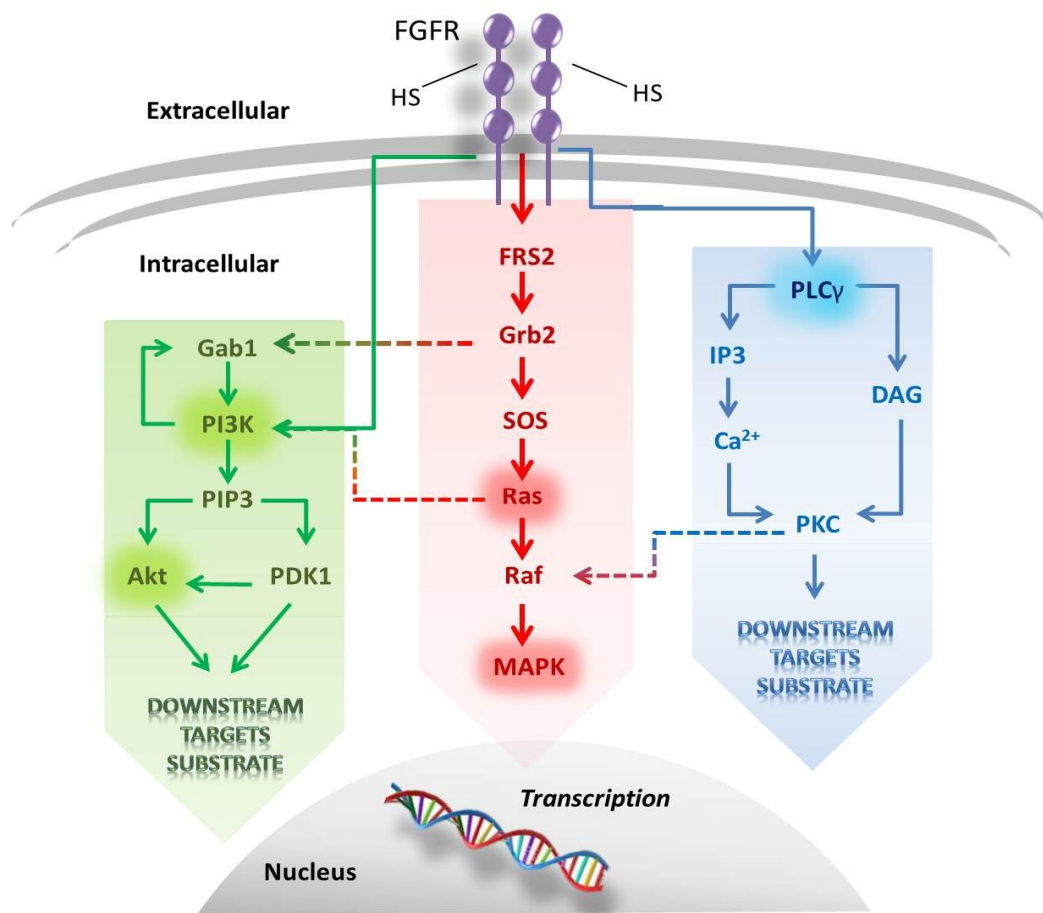


Figure 2. Intracellular signaling pathways activated through FGFRs. Formation of a ternary FGF-heparin-FGFR complex leads to receptor autophosphorylation and activation of intracellular signaling cascades, including the Ras/MAPK pathway (shown in red), PI3 kinase/Akt pathway (shown in green), and the PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> pathway (shown in blue). The

Ras/MAPK cascade is activated by binding of Grb2 to phosphorylated FRS2. The subsequent formation of a Grb2/SOS complex leads to the activation of Ras. Three routes by which FGFRs can activate PI3K/Akt pathway are indicated. First, Gab1 can bind to FRS2 indirectly via Grb2, resulting in tyrosine phosphorylation and activation of the PI3K/Akt pathway. Second, the PI3K-regulatory subunit p85 can bind to a phosphorylated tyrosine residue of the FGFR. Alternatively, activated Ras can induce membrane localization and activation of the p110 catalytic subunit of PI3K. DAG, diacylglycerol; IP3, inositol-1, 4, 5-triphosphate. These effectors, in turn, disseminate the receptor tyrosine kinase signals by phosphorylating many target proteins, including transcription factors in the nucleus. The PLC $\gamma$  and STAT pathways are also activated by FGF receptor signaling. Adapted: Cotton *et al.* 2008.

The various FGFs show different FGFR specificity, although FGF-1 being the universal FGF that can activate all FGFRs (Ribatti *et al.* 2007). Receptor 1, 2, and 3 genes are known to generate splice variants, the 'b' and 'c' forms (Werner *et al.* 1992). These splice variants differ in their ligand binding specificity, for example, FGF-7 activates FGFR-2b while having negligible affinity for the other FGFRs. Moreover, FGF-8 preferentially activates FGFR-4, and also activates FGFR-3c. In particular, FGF-2 activates the splice variant FGFR-1-3c and FGFR-2-3c but not FGFR-2-3b (Ornitz *et al.* 1996), and FGFR-1c isoform being the preferential target of FGF-2 (Zhang *et al.* 2006). The splicing variant 3a of FGFR is a secreted protein, whereas 3b and 3c are both membrane-bound receptors containing mutually exclusive Ig-like domains. In addition, it is generally believed that the 3b isoform of FGFRs is expressed in epithelial lineages, whereas the 3c variant is restricted to mesenchyme origin (Eswarakumar *et al.* 2005) except in the uterine endometrium where FGFR-3-3b is expressed in both stroma and epithelium (Tsai *et al.* 2002). Neither of these FGFRs was detected in the rat ovary by *in situ* hybridization (Asakai *et al.* 1994), whereas FGFR-4 but not FGFR-3 was detected in granulosa cells of preantral and antral mouse follicles (Puscheck *et al.* 1997).

Furthermore, the low affinity receptor is identified as cell surface heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (Kwan *et al.* 2001), to which FGF-2 binding is a prerequisite for the interaction of FGF-2 with high affinity receptors (FGFR-1 and FGFR-2) and subsequent signal transduction (Ibrahimi *et al.* 2004). In addition to their role as a low affinity receptor, HSPGs influence FGF-2 and its action in a variety of ways. HSPGs act as a reservoir of FGF-2 for cell use (Ornitz and Itoh 2001) and as a protector from proteolytic degradation and thermal denaturation (Quarto and Amalric 1994). Moreover, cell surface HSPGs mediates the internalization of FGF-2 (Roghani and Moscatelli 1992).



### ***3. Expression and functions of the FGF family members in reproductive tissues***

Tissue-specific expression of members of the FGF family is important in controlling physiological functions in the mammalian reproductive system. In the following section, we will focus on 1) the expression of the specific components of the FGF family (particularly FGF-1, -2, -5, -7, -8, -9 and -10) within reproductive system, and 2) the recent advances in the understanding of the functions of FGF ligands in reproductive target cells.

#### ***3.1. FGF-1***

FGF-1, also called acidic FGF (aFGF), is a heparin-binding polypeptide whose functions include regulation of proliferation, differentiation, and angiogenesis (Miyake *et al.* 1998). This growth factor is predominantly expressed in theca cells in bovine. Conversely, the protein for FGF-1 was localized by immunohistochemistry predominantly in the granulosa cell layer, probably binding to its receptor (Berisha *et al.* 2004). Additionally, a study showed that FGF-1-like activity has been isolated from porcine uterus (Gupta *et al.* 1997). In rhesus monkeys, by *in situ* hybridization, Samathanam *et al.* (1998) showed that FGF-1 mRNAs were relatively abundant in uterine epithelial, smooth muscle, and vascular cells and minimally expressed by stromal and connective tissue cells. With respect to other reproductive organs, FGF-1 protein has been immunolocalized to rat embryonic neuroectodermal and mesodermal tissues (Stevenson and Wathes 1996) but has not been reported to be present in earlier stages of development. In addition, the bovine (Gabler *et al.* 2004), and marmoset oviducts also express FGF-1 (Gabler *et al.* 1998).

Like other members of the family, FGF-1 has mitogenic and chemotactic effects especially on fibroblasts, endothelial cells and smooth muscle cells. It has been shown that vascular endothelial growth factor (VEGF) and FGF families are involved in the proliferation of capillaries that accompanies the selection of the preovulatory follicle. This leads to an increased supply of nutrients and precursors, therefore supporting the growth of the dominant follicle in bovine ovaries (Berisha *et al.* 2004). In addition, FGF-1 may play a significant role in bovine granulosa cell steroidogenesis (Vernon and Spicer 1994), anti-apoptotic action (Peluso *et al.* 2001) and differentiation of granulosa cells (GCs) into luteal cells during the process of luteinization (Lavranos *et al.* 1994).

### 3.2. FGF-2

The early observations that crude extracts of corpus luteum (Shirasuna *et al.* 2010) could stimulate endothelial cell growth *in vitro* and have angiogenic activity *in vivo* led Gospodarowicz *et al.* (1989) to identify an ovarian source of FGF-2, also known as basic FGF (bFGF). This growth factor is the most prominent and largely studied factor of this family with high affinity to all of the known FGF receptors (Ben-Haroush *et al.* 2005). It occurs in several isoforms resulting from alternative initiations of translation: an 18 kDa cytoplasmic isoform and four larger molecular mass nuclear isoforms (22, 22.5, 24 and 34 kDa) (Berisha *et al.* 2006b), and it has a 55% sequence identity with FGF-1 (Hanneken *et al.* 1994). This factor stimulates cellular functions, cell proliferation, migration, protease secretion and angiogenesis (Detillieux *et al.* 2003). Additionally, FGF-2 can activate ribosomal DNA (rDNA) transcription, and its nuclear accumulation has been associated with cellular proliferation (Amalric *et al.* 1994). There is also abundant evidence, mostly from *in vitro* studies, supporting the involvement of FGF-2 as a paracrine modulator of primordial follicle activation and survival.

Although FGF-2 is considered a member of paracrine FGFs, it did not show a typical signaling peptide for its secretion. FGF-1 and FGF-2 might be released from damaged cells or by an exocytotic mechanism that is independent of the endoplasmic reticulum-Golgi pathway (Mohan *et al.* 2010; Nickel 2010). In addition, it has also been reported that FGF-2 can directly translocate to the nucleus and act in an intracrine manner (Antoine *et al.* 1997). Therefore, this fact contests the physiological relevance of FGF-2 as a paracrine factor. The mechanisms by which this factor is released remains unclear; however studies have demonstrated that its secretion depend on the energy provided by Na<sup>2+</sup> K<sup>+</sup> ATPases (Florkiewicz *et al.* 1998) and also depend on the fusion of intracellular vesicles and the plasma membrane (Mignatti *et al.* 1992).

Therefore, the effects of FGFR activation and the cellular activity performed by FGF-2 when it is added to the *in vitro* culture medium may be *in vivo* actually responsibility of others FGFs effectively secreted, and with affinity to the same receptors activated by FGF-2. For instance, the FGF-8 family (FGF-8, -17 and -18) that also activates FGFR-3c, FGFR-4 and FGFR-2c (Ibrahimi *et al.* 2004).

The FGF-2 takes part in the development processes, being a potential regulator gene and its expression is suppressed by interferon  $\alpha$  and  $\beta$  (IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ ) (Riedel *et al.* 2000). Immunohistochemical studies have localized FGF-2 to the oocytes of ovarian primordial and primary follicles (rat: Nilsson *et al.* 2001; bovine: Van Wezel *et al.* 1995; sheep: (Garcia *et al.*

2006), granulosa cells from secondary and antral follicles in bovine (Parrott and Skinner 1998), as well as in the corpus luteum in bovine (Salli *et al.* 1998) as a potential regulator of ovarian function in different species. In addition, molecular analysis by RT-PCR confirmed FGF-2 expression in human adult ovarian cortex and in isolated primordial, primary, secondary (Garor *et al.* 2009), and antral follicles (Yamamoto *et al.* 1997). Furthermore, FGF-2 receptors or their mRNAs have been demonstrated in granulosa cells of growing antral follicles between 5–20 mm (cow: Parrott and Skinner 1998; rat: Asakai *et al.* 1994) and theca cells (bovine: Berisha *et al.* 2004, Buratini *et al.* 2005b). Additionally, Ben-Haroush *et al.* (2005) identified immunohistochemical expression of FGFR-2 and FGFR-3 in women granulosa cells as early as primordial stages and of FGFR-4 in granulosa cells from primary stages. Furthermore, regarding to other reproductive tissues, FGF-2 has been isolated and characterized in bovine and human testes (Steger *et al.* 1998; Abo-Elmaksoud and Sinowatz 2005), as well as in germ cells. Additionally, it was observed in goats that granulosa cells from preantral and antral follicles produce FGF-2 during all phases of follicular development (Almeida *et al.* 2011).

#### ***A. FGF-2 in reproductive cell survival***

Zhou and Zhang (2005) showed that FGF-2 stimulated caprine oocyte survival after culture, although it had no obvious effect on oocyte growth. Additionally, previous *in vitro* studies in rat granulosa cells (Trolice *et al.* 1997) have shown that FGF-2 inhibits granulosa cells from undergoing apoptosis. The mechanism through which FGF-2 mediates granulosa cells survival is unknown. However, some studies have shown that FGF-2 prevents apoptosis through both genomic and acute actions. Some studies demonstrated that FGF-2 acute actions involved the maintenance of normal levels of intracellular free calcium levels ( $\text{Ca}^{2+}$ ). In granulosa cells, FGF-2 maintained  $\text{Ca}^{2+}$  through a protein kinase C delta (PKC $\delta$ )-dependent mechanism. Further, FGF-2-activated PKC $\delta$  maintained  $\text{Ca}^{2+}$  by stimulating calcium efflux, accounting in part for the ability of FGF-2 to maintain calcium homeostasis and ultimately granulosa cell viability (Peluso *et al.* 2001). The ability of FGF-2 to stimulate calcium efflux involved the plasma membrane calcium ATPase (PMCA). Interestingly, FGF-2-activated PKC $\delta$  appeared to regulate PMCA activity in part by promoting its membrane localization. In addition, transgenic mice with overexpression of FGF-2 had reduced levels of apoptosis in the granulosa cells (only 25% compared with 58% in normal mice) (Peluso 2003). These studies support the assumption that FGF-2 is a physiologically relevant regulator of granulosa cell viability.

### ***B. Effects of FGF-2 in the initiation of primordial follicle growth***

The initiation of follicle growth, also known as follicular activation, is defined as the transition of primordial follicles from the quiescent to the growth phase. Primordial follicles are the source from which follicles will be gradually recruited to grow throughout life, and the mechanism of this recruitment is one of the most intriguing questions in ovarian physiology (Braw-Tal 2002). This recruitment of primordial follicles to initiate folliculogenesis determines the population of developing follicles available for ovulation and directly regulates female reproductive efficiency. In this way, researches performed in many laboratories in the last few years have provided important information about the role of FGF-2 in the initiation of primordial follicles growth.

In a rat model, FGF-2 promoted primordial follicle activation and further growth of primary follicles (Nilsson *et al.* 2001). These authors showed that FGF-2-treated ovaries contained 85% developing follicles compared to 50% developing follicles for control untreated organ cultures. Correspondingly, the number of primordial follicles in FGF-2 treated ovaries decreased to 15% of the total compared with 45% for controls. After culturing caprine ovarian tissue, Matos *et al.* (2007a) demonstrated that 50 ng/mL FGF-2 induced a significant decrease in the number of primordial follicles with a corresponding increase in intermediate follicles (containing both flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte). This FGF-2 treatment also resulted in an increase in diameter of both oocytes and follicles that were cultured for 5 days. Furthermore, addition of both FGF-2 and FSH to the culture medium increased the rates of caprine follicular activation (Matos *et al.* 2007c; 2010). These authors also observed that ultrastructural integrity of goat preantral follicles was maintained during culture for 7 days in medium containing both FGF-2 and FSH (Matos *et al.* 2007c). In contrast, cortical tissues cultured in control medium (without FGF or FSH) had ultrastructural changes that are indicative of degeneration, such as intense cytoplasmic vacuolization. More recently, association of FGF-2 with FSH had a positive influence on primordial follicle development after one week culture of human ovarian tissue, and this development was blocked by the neutralizing antibody against FGF-2. Moreover, in samples cultured with serum substitute (human serum albumine), high doses of FGF-2 (100 and 300 ng/mL) enhanced follicular development. Finally, these authors demonstrated that samples incubated with the neutralizing antibody had low estradiol production (Garor *et al.* 2009). These studies demonstrate that FGF-2 induces primordial follicle development to initiate folliculogenesis and this action may be, in

part, by directly acting on adjacent ovarian cells to promote somatic cell growth (Nilsson and Skinner 2001). In contrast, at 10 ng/mL, FGF-2 did not influence primordial follicle activation of bovine primary and secondary follicles *in vitro* (Derrar *et al.* 2000). It is likely that FGF-2 activates mammalian primordial follicles in a species-specific manner.

### ***C. Role of FGF-2 in granulosa and theca cell proliferation and differentiation***

Although the mechanisms involved in the event of granulosa cell proliferation in early follicles remain unknown, several lines of evidence indicate a functional role for FGF-2. Furthermore, as follicle development progresses, the terminal differentiation of the inner theca is characterized by the development of theca interstitial cells that produce androgens. Understanding theca development is important because theca-derived androgens are obligatory precursors for follicle estrogen production and have been implicated in follicular atresia (Cao *et al.* 2006).

Some *in vitro* culture studies have shown that FGF-2 has a mitogenic effect on granulosa and theca cells of preantral follicles from different species (bovine: Wandji *et al.* 1996; Spicer and Stewart 1996, Nilsson *et al.* 2001; domestic cat: Jewgenow 1996). Moreover, optimal concentrations (50 ng/mL) of FGF-2 stimulate DNA synthesis in hamster preantral and antral follicles cultured *in vitro* (Roy and Greenwald 1991).

In addition, FGF-2 may play species-specific effect on steroid production, such as inhibition of estradiol production in the granulosa cells of rats (Schteingart *et al.* 1999) and cows (Vernon and Spicer 1994), as well as blockage of aromatase activity in rats (Schteingart *et al.* 1999), in contrast to stimulation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase expression and activity in humans (Speirs *et al.* 1993). Moreover, in the ovine model, FGF-2 expression in granulosa cells was found to decrease in correlation with follicular growth, making it a potential marker of the transition stage to steroid production (Garcia *et al.* 2006). As FGF-2 mRNA expression increases throughout follicular development in theca cells, it is suggested that FGF-2 is mainly involved in controlling the final growth of antral follicles, stimulating angiogenesis, granulosa cell proliferation and survival (Berisha *et al.* 2004).

Moreover, FGF-2 seems to be important in the differentiation of granulosa cells into luteal cells during the process of luteinization (Lavranos *et al.* 1994). FGF-2 suppresses FSH induction of LH receptor also in rat granulosa cells in culture as well as aromatase activity (Baird and Hsueh 1986; Adashi *et al.* 1988; Millier *et al.* 1994) but enhances progesterone synthesis in preovulatory rat granulosa cells alone and synergistically with FSH and LH

stimulation (Aharoni *et al.* 1997). It was demonstrated that the FGF effect on enhanced progesterone production is due to up-regulation of the expression of the steroidogenic acute regulatory protein, which facilitates the transfer of cholesterol into mitochondria where conversion of cholesterol to pregnenolone take place (Aharoni *et al.* 1996). Furthermore, FGF-2 stimulates tissue-type plasminogen activation expression, and resumption of meiosis in rat follicles *in vitro* (LaPolt *et al.* 1990). Thus, although FGF-2 seems to delay the earlier steps of granulosa cell differentiation stimulated by FSH, it seems to mimic some of the ovulatory actions of LH (Tsafiri and Adashi 1994).

#### ***D. FGF-2 and corpus luteum formation***

FGF-2 has been specifically implicated in the development and function of the corpus luteum (CL). The CL is a rapidly differentiating miniorgan with an ephemeral life span in the ovary, and its major function is to secrete progesterone and maintain early pregnancy. The development and differentiation of CL in a rising phase may be regulated by peptide growth factors derived from the ovary. Bovine (Neuvians *et al.* 2004) and porcine (Reynolds and Redmer 1998) luteal tissue have been reported to contain FGF-2. Moreover, FGF-2 mRNA is detectable in bovine luteal tissue (Stirling *et al.* 1991), demonstrating that one (or more) luteal cell type synthesizes FGF-2. It influences two major cell types of CL, luteal and vascular endothelial cells. FGF-2 stimulates the proliferation of luteal cells (Grazul-Bilska *et al.* 1992), progesterone secretion in the early stage of bovine CL (Kobayashi *et al.* 2001), and relaxin secretion in porcine luteal cells (Taylor and Clark 1992). Additionally, FGF-2 stimulates the growth of vascular endothelial cells isolated from bovine (Neuvians *et al.* 2004) and rabbit (Bagavandoss and Wilks 1991) CL. Moreover, FGF-2 receptor expression may be inversely associated with luteal cell differentiation, which has been also reported in other cellular systems such as muscle cells (Song *et al.* 2011) and chondrocytes (Iwamoto *et al.* 1993).

#### ***E. Expression of FGF-2 in the uterus***

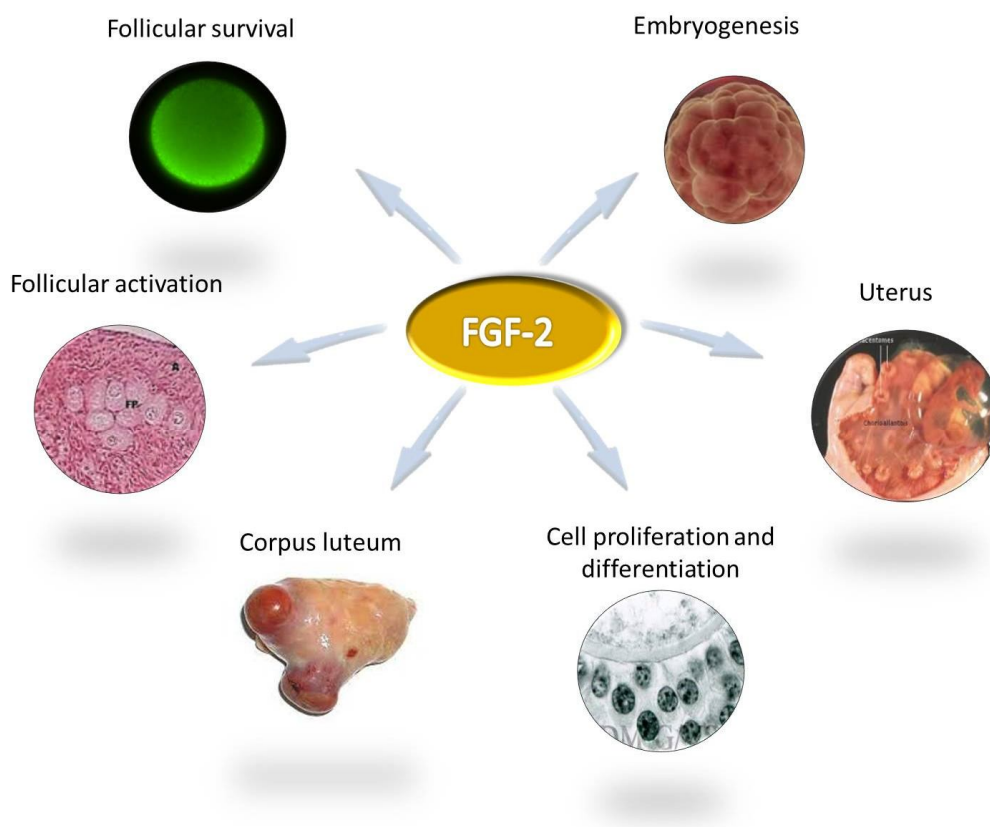
Immunoreactive FGF-2 protein has been demonstrated in human, rat, mouse, rabbit and gilts uterus (Cordon-Cardo 1990; Carlone and Rider 1993; Grundker and Kirchner 1996; Wood *et al.* 2005; Paiva *et al.* 2011). Additionally, FGF-2 peptide or mRNA has been identified in murine, rabbit and human endometrial (Grundker and Kirchner 1996; Wood *et al.* 2005; Paiva *et al.* 2011). Moreover, *in situ* hybridization studies have demonstrated that FGF-2 mRNA and

peptides are present in the primate uterus (Samathanam *et al.* 1998). FGFR-2 were identified in bovine (Gabler *et al.* 2004) and marmoset oviducts, thus suggesting auto/paracrine effects of this growth factor within the primate oviduct, possibly under the control of estrogenic hormones. The expression of FGF-2 in the uterus during early pregnancy (Carlone and Rider 1993) is regulated by progesterone and its levels increase substantially during decidualization, specifically within the mesometrial decidua cells (Srivastava *et al.* 1998).

#### ***F. Effect of FGF-2 on embryogenesis***

Few reports are available on the effect of FGF-2 on *in vitro* maturation and fertilization, as well as further embryo development. Expression of FGF-2 was detected in bovine cumulus-oocyte complexes (Gabler *et al.* 2004), and FGF-2 receptors were present in oocytes at all stages of maturation (Vesterlund *et al.* 2011). In the mouse, cumulus oocyte complexes treated with FGF-2 showed a significant increase (21 a 24%) on germinal vesicle breakdown (GVBD) (Fields *et al.* 2011).

Additionally, FGF-2 has been suggested to have a role in the differentiation of embryonic stem cells, with reports suggesting a role in inducing neural differentiation (Zhang *et al.* 2006). Moreover, preimplantation rabbit embryos secrete and bind FGF-2 (Grundker and Kirchner 1996), which has been shown to stimulate gastrulation in rabbit embryos *in vitro* (Deangelis and Kirchner 1993). FGF-2 mRNA has been demonstrated in mouse preimplantation blastocysts (Campbell *et al.* 1992). Moreover, in ovine preimplantation embryos, the abundance of FGF-2 mRNA was reported to decrease from the zygote to the blastocyst stage (Watson *et al.* 1994), suggesting that the observed transcripts were of maternal origin. Furthermore, Gupta *et al.* (1997) showed by immunohistochemical studies that FGF-2, but not FGF-1, may directly influence the development and/or differentiation of porcine conceptus, suggesting species-specific roles for FGFs in early pregnancy. Moreover, after culturing murine preimplantation embryos with different concentrations, FGF-2, at 10 ng/mL, decreased the rate of blastocyst formation and hatching by 72 hours (Seli *et al.* 1998). In Fig. 3, it is summarized the biological functions of FGF-2 in different reproductive cells and tissues.



**Figure 3.** Schematic representation of cellular effects mediated by FGF-2 in different reproductive cells and tissues.

### 3.3. FGF-7

FGF-7, also termed keratinocyte growth factor-I (KGF-I), is a 28-kDa protein (Ware and Matthey 2002), which is produced by mesenchyme-derived cells in many tissues. Previous studies have shown FGF-7 to be produced by theca cells of larger antral follicles (Berisha *et al.* 2004). Recently, FGF-7 expression was observed in primordial, primary and secondary follicles of bovine fetuses, suggesting its role in the regulation of early folliculogenesis (Pinto *et al.* 2006). FGF-7 receptor is localized by RT-PCR assays in bovine granulosa cells (Parrott and Skinner 1998), and both FGF-7 and FGF-10 have the same binding affinity to FGFR-2IIIb (Lu *et al.* 1999). FGF-7 mediates mesenchyme–epithelial cell interactions in many tissues including the ovary (Parrott *et al.* 1994; Parrott and Skinner 1998a, b), placenta (Izumi *et al.* 1996), endometrium (Koji *et al.* 1994), ventral prostate (Sugimura *et al.* 1996), and seminal vesicle (Alarid *et al.* 1994). Theca cell FGF-7 expression in the follicle can be regulated by estradiol and gonadotropins (Parrott and Skinner 1998a).



Few studies delay on the presence and action of FGF-7 at earlier stages of folliculogenesis. In a rat model, after culturing the whole ovaries, it was demonstrated that FGF-7 promotes the primordial to primary follicle transition *in vitro* (Kezele *et al.* 2005). In addition, similarly to FGF-2, FGF-7 stimulated granulosa cell proliferation and inhibited steroidogenesis *in vitro* (Parrot *et al.* 1994; Parrot and Skinner 1998), which is in accordance with the predominant localization of its receptor (FGFR-2b) in granulosa cell layer (Parrot and Skinner 1998; Berisha *et al.* 2004). FGF-7 action seems to be modulated by its receptor since the concentrations of mRNA for FGF-7 did not change throughout the antral phase, while the gene expression of FGFR-2b increases with estradiol intrafollicular concentrations (Berisha *et al.* 2004). In addition, FGF-7 has been shown to have a role in the developing antral ovarian follicle. Recently, Faustino *et al.* (2011) showed that KGF at 1 ng/mL promoted the maintenance of goat preantral follicle ultrastructural integrity but was not able to stimulate follicular growth and activation. In addition, the KGF protein was expressed in the oocytes and granulosa cells of goat ovarian follicles at all developmental stages as well as in thecal and stromal cells.

A study has demonstrated that FGF-7 mRNA is expressed in the endometrial epithelia of pigs and FGFR-2 mRNA is present in both the endometrial epithelia and conceptus trophoctoderm (Ka *et al.* 2001). Additionally, they showed that FGF-7 stimulates the trophoctoderm, but not endometrial epithelial cells, to undergo proliferation and differentiation (Ka *et al.* 2007), which suggest that FGF-7 is a paracrine mediator of interactions between the uterus and conceptus.

### **3.4. FGF-8**

This growth factor was initially detected in the rat ovary (MacArthur *et al.* 1995) and is expressed in oocytes of small and large antral follicles of adult mice ovaries (Valve *et al.* 1997). FGF-8 mRNA was not detected in the adult human ovary by RT-PCR (Valve *et al.* 2000). In contrast, by using RT-PCR, Buratini *et al.* (2005a) showed the pattern of expression of FGF-8 and both its receptors (FGFR-3c and FGFR-4) in oocytes, granulosa and theca cells of primordial, primary and secondary follicles of bovine fetuses. Moreover, these authors observed that FGF-8 and FGFR-3c are more commonly expressed in primary and secondary follicles compared to primordial follicles, suggesting that these genes are gradually been activated throughout preantral follicle growth. Additionally, FGFR-4 expression did not occur until FGF-8 and FGFR-3c are expressed in both primary and secondary follicles. Neither of the receptors

was found by Northern or *in situ* hybridization in the rat ovary (Asakai *et al.* 1994), whereas FGFR-4 but not FGFR-3 was detected in antral mouse follicles (Puscheck *et al.* 1997) and in the human ovary (Valve *et al.* 2000).

Gene expression data also suggest the role of FGF-8 and its receptors, FGFR-3c and FGFR-4, in the control of antral phase of follicle development (Buratini *et al.* 2005b). The mRNA for FGFR-4 was exclusively detected in bovine theca cells in concentrations inversely correlated with follicular diameter, suggesting a role in early differentiation of theca cells. In contrast, mRNA for FGFR-3c was observed both in granulosa and theca cells of bovine antral follicles. While FGFR-3c expression was relatively constant in theca cells, concentrations of mRNA were positively correlated with follicular diameter and the intrafollicular concentration of estradiol in granulosa cells. These results suggest a specific role for FGFR-3c in the regulation of proliferation and differentiation of granulosa cells of dominant follicles (Buratini *et al.* 2005b).

Additionally, FGF-8 stimulates cell proliferation in the developing embryo (Crossley and Martin 1995), and overexpression of FGF-8 in transgenic mice results in ovarian stromal cell hyperplasia (Daphna-Iken *et al.* 1998). Thus, FGF-8 may be a mediator of oocyte controlled follicle cell proliferation or differentiation (Buratini *et al.* 2005a; Miyoshi *et al.* 2010).

### **3.5. FGF-9**

FGF-9, originally isolated from human glioma cells (Colvin *et al.* 2001), is highly conserved across species with greater than 93% identity among *Xenopus*, mouse, rat, and human, suggesting that FGF-9 is of vital importance (Song and Slack 1996). FGF-9 binds to FGFR-2 and FGFR-3, but not FGFR-1 and FGFR-4, with high affinity and activates efficiently the “c” splice forms (Ornitz *et al.* 1996). This growth factor was found to be expressed in the stroma of the prostate (Giri *et al.* 1999) and human endometrial stromal cells. FGF-9 is also expressed predominantly in theca cells and stimulates progesterone secretion from granulosa cells (Drummond *et al.* 2007; Portela *et al.* 2010).

In the uterus, FGF-9 was found to induce endometrial stromal but not epithelial cell proliferation during menstrual cycle (Tsai *et al.* 2002). Lih-Yuh *et al.* (2003) reported that FGF-9 is expressed in normal eutopic endometrial stroma and is regulated by estradiol but not progesterone. Further, the same authors showed that expression of FGF-9 and its receptors in ectopic endometriotic lesions was regulated by estrogen and controlled endometriotic stromal

cell proliferation. In addition, mice lacking FGF-9 result in male-to-female sex reversal during embryogenesis, indicating the critical role of FGF-9 in fetal testicular development (Colvin *et al.* 2001).

### **3.6. FGF-10**

Also known as keratinocyte growth factor-II (KGF-2II), FGF-10 that is structurally similar to FGF-7, also activates FGFR-2b (Igarashi *et al.* 1998). In mice, FGF-10 is essential for normal development of lungs, limbs, teeth, mammary buds, stomach and heart (Sekine *et al.* 1999; Marguerie *et al.* 2006; Spencer-Dene *et al.*, 2006; Veltmaat *et al.* 2006; Yokohama-Tamaki *et al.* 2006). Expression of FGF-10 was also found in adult ovine uterus (Chen *et al.* 2000). Moreover, the expression of mRNA and protein for FGF-10 were found in oocytes and theca cells of bovine antral follicles (Buratini *et al.* 2007), as well as in the corpus luteum (Castilho *et al.* 2008).

The rise in FSH that precedes a wave of follicle growth (Fortune *et al.* 2004) increases FGFR-2b expression in granulosa cells, which enhances their response to secreted FGF-10. The action of FGF-10 at this stage would be to inhibit differentiation of granulosa cells, reflected by limited estradiol secretion which is a major marker of differentiation (Wright and Mansour 2003). As follicle development proceeds, there is a progressive decrease in thecal FGF-10 secretion, thereby allowing increased estradiol secretion and granulosa cell differentiation, which suggest that FGF-10 expression is regulated throughout follicular development. Buratini *et al.* (2007) also reported that granulosa cell expression of FGFR-2b, the major receptor for FGF-10, was regulated by FSH. Finally, they tested the effect of FGF-10 on estradiol secretion and cell proliferation in nonluteinizing bovine granulosa cells in serum-free culture. Their results showed that FGF-10 significantly inhibited estradiol secretion without affecting cell proliferation. This is consistent with the inhibition of aromatase activity in bovine granulosa cells by FGF-7 (Parrot and Skinner 1998). Paracrine control of estradiol secretion therefore appears to be a balance of inhibitory (GDF-9: Spicer *et al.* 2006; FGF-10: Buratini *et al.* 2007) and stimulatory (BMP4, BMP7: Glister *et al.* 2005) factors. Recently, Chaves *et al.* (2010) have demonstrated the participation of FGF-10 also in the control of preantral follicular development. In this study, addition of 50 ng/mL of FGF-10 to the culture medium of caprine preantral follicles enclosed in ovarian fragments maintained the survival and stimulated follicular growth.

#### ***4. Interactions among FGFs and others growth factors and hormones***

Many studies have demonstrated the involvement of the interaction among FGF family members with other growth factors and/or hormones in the intraovarian mechanisms of follicular development and survival. It is particularly interesting to speculate that, like in other biological models, the major effects of these growth factors in modulating ovarian cell function may be the result of their discrete interactions at the target cell.

In a murine model, FGF-2 treatment was found to increase Kit Ligand (KL) mRNA expression in cultured ovaries. Moreover, FGF-2 with or without KL induced a 25–30% increase in the level of primordial to primary follicle transition. How KL and FGF-2 may interact in this process of primordial follicle development remains to be determined. Because FGF-2 is expressed in the oocyte whereas KL is expressed in granulosa cells, the potential oocyte-granulosa cell interactions involving these factors may be important in the process. These observations suggest that one function of the oocyte-derived FGF-2 is to increase the granulosa derived KL expression and that both KL and FGF-2 are apparently required to optimally promote primordial follicle activation (Nilsson and Skinner 2001).

Matos *et al.* (2007b) demonstrated that after 7 days of culture, the interaction between FSH and FGF-2 was more efficient in promoting the initiation of primordial follicles growth than FSH or FGF-2 alone. In other study, rat granulosa cells were cultured for 48 h in medium alone (control) or with increasing doses of FSH (1-100 ng/mL). After being incubated with FGF-2, the radioactivity of the cells was determined. They demonstrated that FSH induced a dose-dependent increase in specific binding for FGF-2 to cultured granulosa cells, which suggests that FSH could enhance the stimulatory effect of FGF-2 on follicular growth initiation (Shikone *et al.* 1992). Furthermore, in the caprine model, we also observed that oocyte diameter had the highest increase when cultured in presence of both FSH and FGF-2 for 7 days. We suggest that FSH increased the number of binding sites for FGF-2 after culture compared with that in non-cultured tissue, which could stimulate follicular growth. With similar results, Wandji *et al.* (1996) demonstrated that FSH and FGF-2, alone or in combination, were the most effective treatments in increasing the diameter of bovine preantral follicles.

Additionally, FGF-2 has a role in stimulating cell proliferation (Lumelsky *et al.* 2001), and in the maintenance of embryonic stem cells in an undifferentiated state, by repressing bone morphogenetic protein (BMP) signaling (Xu *et al.* 2005). Moreover, Spicer and Stewart (1996) observed that FGF-2 stimulated thecal cell numbers in the absence and presence of insulin and IGF-I. However, EGF and FGF-2 do not influence DNA content or viability of cultured rat

granulosa cells (Adashi *et al.* 1988; Oury and Darbon 1988) or gilts thecal cells (Shimizu *et al.* 2002) in the absence of insulin. Furthermore, FGF-2 inhibits FSH-stimulated induction of LH receptor expression in granulosa cells and reduces specific binding of IGF in thecal tissue (Armstrong and Webb 1997). In addition, FGF-2 significantly decreased progesterone production by bovine thecal cells in the presence and in the absence of LH. Similarly, in cultured rat and bovine granulosa cells, FGF-2 and EGF/TGF $\alpha$  had no effect on basal steroidogenesis but inhibited the capacity of FSH to stimulate estrogen production (Baird and Hsueh 1986; Adashi *et al.* 1988; Vernon and Spicer 1994) and LH receptor numbers (Oury and Darbon 1988). Peluso and Pappalardo (1999) demonstrated that progesterone maintains large rat granulosa cell viability indirectly by stimulating small granulosa cells to synthesize FGF-2.

In addition, association between FSH and FGF is important to understand the endocrine and paracrine mechanisms in the control of follicular development. Li and Johnson (1993) incubated rat granulosa cells for 2 days in the presence or absence of FSH and FGF-2. They showed that the conversion of androstenedione to estrogens was markedly inhibited by the co-incubation of FSH with FGF-2. In these experiments, as little as 30 pg/mL of FGF-2 was sufficient to promote a 50% reduction in the stimulation of estrogen synthesis by FSH. The ability of 0.3 and 3 ng/mL of FGF-2 to give a 95-98% inhibition of this response reflects the remarkable potency of FGF-2. The non-competitive nature of the interaction between FGF-2 and FSH is illustrated by the inability of high doses of FSH to reverse the effect of FGF-2.

Regarding to FGF-7, several factors, including cytokines, growth factors, and hormones, are known to affect its expression in various tissues. Interleukin (IL) 1, IL6, platelet-derived growth factor-b, and transforming growth factor- $\alpha$  increase FGF-7 mRNA expression (Price 2004). Parrott and coworkers have shown that FGF-7 and hepatocyte growth factor (HGF) stimulate FGF-7 expression in ovarian surface epithelia via a positive autocrine feedback mechanism (Parrott *et al.* 2000). Additionally, FGF-7 acts on the granulosa cells to promote KL expression, which in turn acts back on the theca in a positive feedback loop (Parrott and Skinner 1998b). This cell-cell interaction is coordinated by gonadotropins and steroids to facilitate the rapid growth of the antral follicle.

Steroid hormones also regulate FGF-7 expression in reproductive organs. In the uterine endometria of rhesus monkeys, progesterone increases stromal expression of FGF-7, which may mediate P4-induced increases in epithelial cell proliferation and spiral artery development (Koji *et al.* 1994). In mice, estrogen increases mammary gland expression of FGF-7 and may play a role in gland development (Pedchenko and Imagawa 2000). Androgens also stimulate FGF-7 expression in stromal cells of the prostate (Ishii *et al.* 2009). It is significant that the

promoter region of the FGF-7 gene contains various regulatory factor binding sites, including steroid response elements for estrogen and glucocorticoids in humans (Masuda *et al.* 2011) and for androgens in rats (Fasciana *et al.* 1996).

The oocyte-secreted factors such as BMP-15, GDF-9 and FGF-8 stimulate the proliferation and differentiation of granulosa cells (Sánchez *et al.* 2009), improved the developmental competence of bovine oocytes undergoing maturation *in vitro* (Hussein *et al.* 2006). Therefore, precise coordination of oocyte-derived paracrine signals in the follicles is essential for normal development of both granulosa cells and oocytes. Interestingly, a recent study has shown that oocyte-derived FGFs, mainly FGF-8, act in concert with BMP-15 to induce glycolysis in cumulus cells, which are granulosa cells associated with oocytes (Sugiura *et al.* 2007); however, the mechanisms by which these signals cooperate are unknown. Cooperation of BMP and FGF signals is found in several tissues, suggesting that suppression of transcripts encoding BMP/FGF antagonists might be involved in the cooperation of BMP and FGF signals in cumulus cells during ovarian follicular development (Sugiura *et al.* 2009; Miyoshi *et al.* 2010).

### **5. Role of FGFs on extracellular matrix (ECM)**

ECM remodeling occurs within several physiological and pathological systems (Huang *et al.* 2011), and for several of these systems *in vitro* experiments suggest that production of matrix metalloproteinases (MMPs) is regulated by growth factors, such as FGFs (Ellman 2008). The interaction of the various FGF isoforms with the ECM can regulate both the stability and the diffusible properties of the growth factors. Heparin sulfate-like molecules are released continuously from cell membranes and the ECM by the action of specific proteases. The FGFs have a high affinity for these molecules and their association with FGFs inhibits subsequent binding of FGFs to the ECM, thus facilitating their diffusion through the tissue from their site of synthesis (Eto *et al.* 2011). The sulfation pattern of heparin also appears to be critical in the control of FGF binding to the ECM and cell membranes (Fernig and Gallagher 1994). Hence, enzymes that affect extracellular matrix structure would be expected to regulate both the affinity of FGFs for components of the ECM and their diffusion rates through the matrix (Armstrong and Webb 1997).

Additionally to the reported effects, it is known that follicle growth and atresia are associated with considerable changes in the structure of the ECM as a result of tissue remodeling. Such changes would be expected to alter the bioactivity of ovarian FGFs with

resultant changes in granulosa and theca cell function and follicular angiogenesis. However, the mechanisms that regulate the roles of the ECM in controlling FGF activity during folliculogenesis remain still less known.

### **6. Role of FGFs on angiogenesis**

Angiogenesis, the process in which new capillaries develop from preexisting vessels, is induced by inflammation, wound healing, immune reactions, and neoplasia and is required for tumor growth and progression (Hoeben 2004). The female reproductive tract is the only site in the uninjured adult body where angiogenesis occurs in a repetitive cyclic fashion, modulated by angiogenic growth factors and corticosteroids (Gordon *et al.* 1995). Thus, the process of angiogenesis plays an important role in follicular development.

Angiogenic growth factors are so-called because of their varying ability to induce the proliferation of various cells *in vitro*, which contribute to the process of angiogenesis *in vivo*, as demonstrated by studies of animal models. These growth factors are produced by a variety of different cells, and their functions include close involvement in developmental as well as tumour angiogenesis (Folkman and Shing 1992). Indeed, angiogenic growth factors such as FGF, which was the first angiogenic growth factor to be discovered, and VEGF are essential to angiogenesis (Folkman and Shing 1992). FGFs are potent angiogenic factors due to their stimulatory effect on fibroblast as well as endothelial cell proliferation (Armstrong and Webb 1997). The dominant localization of FGF-2 in endothelial cells at the early stage suggests FGF-2 is an important factor for endothelial growth (Hennig *et al.* 2011). In endothelium, activation of FGFR-1 or FGFR-2 by FGF-2 leads to endothelial cell proliferation (Cross and Claesson-Welsch 2001) and to the induction of a complex pro-angiogenic phenotype.

Recently, it has been shown that VEGF and FGF families are involved in the proliferation of capillaries that accompanies the selection of the preovulatory follicle, having synergistic effects on angiogenesis. These result in an increased supply of nutrients and precursors, therefore supporting the growth of the dominant follicle in bovine ovaries (Berisha *et al.* 2000). Woad *et al.* (2011) demonstrated that preovulatory follicles possessed a larger capillary network and expressed more mRNA of angiogenic factors, such as VEGF and FGF-2, in granulosa cells and related receptors in thecal tissue. This result may be greatly involved in the angiogenic process of follicular development in prepubertal gilts. Moreover, Zheng *et al.* (2008) have obtained solid evidence showing that expressions of FGF-2 and VEGF positively correlate to the placental vascular growth during pregnancy.

Additionally, compared with FGF-1 and FGF-2, little is known about the mechanisms by which FGF-4 stimulates angiogenesis. Experimental studies have confirmed that FGF-4 is able to stimulate endothelial cell proliferation and secretion of urokinase-type plasminogen activator and metalloproteinases, and support angiogenesis in a chick chorioallantoic membrane assay (Dell'Era *et al.* 2001; Anteby *et al.* 2005). Some of these angiogenic effects may be indirectly mediated by FGF-4-induced stimulation of VEGF expression (Deroanne *et al.* 1997).

## ***7. Perspectives and conclusion***

Researches performed in many laboratories in the last few years have provided important information about the expression of the FGF family in the mammalian ovary. It should be stressed that a thorough understanding of the tissue-specific expression of the FGF family members in the ovary could improve the knowledge about the functional roles of FGFs in the process of folliculogenesis in different animal species. The general concept to arise from these studies is that the FGF family is essential for controlling mammalian reproduction and female fertility. In this regard, the FGF family members play important roles in regulating the initiation of primordial follicle growth, oocyte and follicle survival, granulosa and theca cell proliferation and differentiation, corpus luteum formation, steroidogenesis, ECM remodeling and angiogenesis. From the data summarized in this review and considering the complexity and duration of follicular development in large animals and humans from primordial stages onward, various rich sequential media would be necessary for every follicular stage until a mature healthy fertilizable oocyte could be obtained in culture. Therefore, further studies in animals as well as in humans are still needed to elucidate possible roles of FGFs and other growth factors in the process of follicular maturation.

Finally, the understanding of FGFs in reproduction could have considerable clinical relevance for human fertility and infertility. Based on the roles of the FGFs in regulating ovarian functions in other animals, as well as in humans, it seems likely that disorders in this family could be involved in human ovarian diseases such as premature ovarian failure, luteal phase defects, and ovarian cancer. Thus, targeted manipulation of the components of the FGF family may allow for the specific clinical modulation of early follicle recruitment, granulosa and theca cell mitosis, ovarian steroidogenesis, luteinization, and ovulation, which may lead to treatments for some forms of infertility. Additionally, therapeutic targeting of specific activated and/or overexpressed FGFRs may provide clinical benefit. Moreover, inhibition of the FGF-



2/FGFR system may represent a promising strategy for the development of novel therapeutical strategies in cancers, thus representing an open field of research.

In conclusion, the FGF family is of great importance in controlling mammalian reproduction. Further researches in this field will greatly advance our understanding of ovarian physiology, which may help clinicians and reproductive biologists to find a role for the FGF family in the diagnosis and treatment of reproductive disorders that affect mammalian fertility.

### **Acknowledgments**

R.N. Chaves is a recipient of a grant from CNPq (Brazil).

### **References**

- Abo-Elmaksoud, A. and Sinowatz, F. (2005). Expression and Localization of Growth Factors and their Receptors in the Mammalian Testis. Part I: Fibroblast Growth Factors and Insulin-Like Growth Factors. *Anat. Histol. Embryol.* **34**, 319–334.
- Abuharbeid, S., Czubayko, F. and Aigner, A. (2006). The fibroblast growth factor-binding protein FGFBP. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1463–1468.
- Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Croft, C. S., May, J. V. and Gospodarowicz, D. (1988). Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Mol. Cell Endocrinol.* **57**, 7-14
- Aharoni, D., Meiri, I., Atzmon, R., Vlodavsky, I. and Amsterdam, A. (1997). Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Current Biol.* **7**, 43–51.
- Alarid, E. T., Rubin, J. S., Young, P., Chedid, M., Ron, D., Aaronson, S. A. and Cunha, G. R. (1994). Keratinocyte growth factor functions in epithelial induction during seminal vesicle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 1074 –1078.
- Almeida, A. P., Saraiva, M. V. A., Alves Filho, J. G., Silva, G. M., Goncalves, R. F. B., Brito, I. R., Silva, A. W. B., Lima, A. K. F., Cunha, R. M. S., Silva, J. R. V. and Figueiredo, J. R. (2011). Gene expression and immunolocalization of fibroblast growth factor 2 in the ovary and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Reprod. Dom. Anim. in press.*

- Amalric, F., Bouche, G., Bonnet, H., Brethenou, P., Roman, A. M., Truchet, I. and Quarto, N. (1994). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 111-115.
- Anderson, E. and Lee, G. Y. (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 Cell.* **25**, 49-72.
- Anteby, E. Y., Natanson-Yaron, S., Hamani, Y., Sciaki, Y., Goldman-Wohl, D., Greenfield, C., Ariel, I. and Yagel, S. (2005). Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **119**, 27-35.
- Antoine, M., Reimers, K., Dickson, C. and Kiefer, P. (1997). Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *J. Biol. Chem.* **272**, 29475-2981.
- Armstrong, D. G. and Webb, R. (1997). Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev. Reprod.* **2**, 139-146.
- Asakai, R., Song, S. Y., Itoh, N., Yamakuni, T., Tamura, K. and Okamoto, R. (1994). Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. *Mol. Cell Endocrinol.* **104**, 75-80.
- Bagavandoss, P. and Wilks, J. W. (1991). Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from developing corpus luteum. *Biol. Reprod.* **44**, 1132-1139.
- Baird, A. and Hsueh, A. J. (1986). Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul. Pept.* **16**, 243-250.
- Beenken, A. and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 235-253.
- Ben-Haroush, A., Abir, R., Aro, A., Jin, S., Kessler-Icekson, G., Feldberg, D. and Fisch, B. (2005). Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fertil. Steril.* **84**, 1257-1268.
- Berisha, B., Schams, D., Kosmann, M., Amselgruber, W. and Einspanier, R. (2000). Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* **63**, 1106-1114.

- Berisha, B., Sinowatz, F. and Schams, D. (2004). Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 162-171.
- Berisha, B., Steffl, M., Amselgruber, W. and Schams, D. (2006a). Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction.* **131**: 319–329.
- Berisha, B., Welter, H., Shimizu, T., Miyamoto, A., Meyer, H. and Schams, D. 2006b. Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. *J. Reprod. Dev.* **52**:307–313.
- Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A. S., Hondermarck, H., Nurcombe, V. and Le Bourhis, X. (2000). FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cyt Growth Fact Rev.* **11**, 295-302.
- Braw-Tal, R. (2002). The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol. Cell Endocrinol.* **187**, 11-18.
- Buratini Jr, J., Glapinski, V. F., Giometti, I. C., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Avellar, M. C., Barros, C. M., Price, C. A. (2005a). Expression of fibroblastic growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblastic growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **70**, 255-261.
- Buratini Jr, J., Pinto, M. G. L., Castilho, A. C., Amorim, R. L., Giometti, I. C., Portela, V. M., Nicola, E. S. and Price, C. A. (2007). Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol. Reprod.* **77**, 743-50.
- Buratini Jr, J., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Glapinski, V. F., Pinto, M. G. L., Giometti, I. C., Barros, C. M., Cao, M., Nicola, E. S. and Price, C. A. (2005b). Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction.* **130**: 343–350.
- Campbell, W. J., Miller, K. A. and Anderson, T. M. (1992). Expression of fibroblast growth factor receptors by embryonal carcinoma cells and early mouse embryos. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **28**, 61–66.
- Cao, M., Nicola, E., Portela, V. M. and Price, C. A. (2006). Regulation of serine protease inhibitor-E<sub>2</sub> and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells *in vitro*. *Matrix Biol.* **25**, 342-354.

- Carlone, D. L. and Rider, V. (1993). Embryonic modulation of basic fibroblast growth factor in the rat uterus. *Biol. Reprod.* **49**, 653-65.
- Castilho, A. C., Giometti, I. C., Berisha, B., Schams, D., Price, C. A., Amorim, R. L., Papa, P. C. and Buratini Jr. J. (2008). Expression of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in the Bovine Corpus Luteum. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 940-945.
- Chaves, R. N., Lima-Verde, I. B., Celestino, J. J. H., Duarte, A. B. G., Alves, A. M. C. V., Matos, M. H. T., Campello, C. C., Name, K. P. O., Bao, S. N., Buratini Jr, J. and Figueiredo, J. R. (2010). Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* **39**, 249-258.
- Chen, C., Spencer, T. E. and Bazer, F. W. (2000). Fibroblast growth factor-10: A stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biol. Reprod.* **63**, 959–966.
- Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B. and Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell.* **104**, 875-889.
- Cordon-Cardo, C., Vlodavsky, I., Haimovitz-Friedman, A., Hicklin, D. and Fuks, Z. (1990). Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab. Invest.* **63**, 832-840.
- Cotton, L. M., O’Bryan, M. K. and Hinton, B. T. (2008). Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr. Rev.* **29**, 193–216.
- Cross, M. J. and Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 201-207.
- Crossley, P. H. and Martin, G. R. (1995). The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development.* **121**, 439-451.
- Daphna-Iken, D., Shankar, D. B., Lawshe, A., Ornitz, D. M., Shackleford, G. M. and MacArthur, C. A. (1998). MMTV-Fgf8 transgenic mice develop mammary and salivary gland neoplasia and ovarian stromal hyperplasia. *Oncogene.* **17**, 2711-2717.
- Datsis, G. A., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Mytilineou, M., Katonis, P., Karamanos, N. K. and Tzanakakis, G. N. (2011). Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration. *FEBS J.* **278**, 3782-3792.

- Deangelis, M. H. and Kirchner, C. (1993). Fibroblast growth factor induced primitive streak formation in rabbit preimplantation embryos *in vitro*. *Anat. Embryol.* **187**, 269–273.
- Dell'Era, P., Belleri, M., Stabile, H., Massardi, M. L., Ribatti, D. and Presta, M. (2001). Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells. *Oncogene.* **20**, 2655-2663.
- Deo, D. D., Axelrad, T. W., Robert, E. G., Marcheselli, V., Bazan, N. G. and Hunt, J. D. (2002). Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**, 21237–21245.
- Deroanne, C. F., Hajitou, A., Calberg-Bacq, C. M., Nusgens, B. V. and Lapière, C. M. (1997). Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **57**, 5590-5507.
- Derrar, N., Price, C. A. and Sirard, M. A. (2000). Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. *Theriogenology.* **54**, 587-98.
- Detillieux, K. A., Sheikh, F., Kardami, E., Cattini, P. A. (2003). Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiov. Res.* **57**, 8-19.
- Drummond, A. E., Tellbach, M., Dyson, M. and Findlay, J. K. (2007). Fibroblast growth factor-9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology.* **148**, 3711-3721.
- Ellman, M. B., Howard, S., Prasuna Muddasani, A. N. and Hee-Jeong, I. M. (2008). Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene.* **420**, 82-89.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I. and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cyt. Growth Fact. Rev.* **16**, 139-149.
- Eto, H., Suga, H., Aoi, N., Kato, H., Doi, K., Kuno, S., Tabata, Y. and Yoshimura, K. (2011). Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars: upregulation of MMP-1 and HGF expression. *Lab. Invest. In press.*
- Fasciana, C., van der Made, A. C., Faber, P. W. and Trapman, J. (1996). Androgen regulation of the rat keratinocyte growth factor (KGF/FGF7) promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 858-863.
- Faustino, L. R., Rossetto, R., Lima, I. M., Silva, C. M., Saraiva, M. V., Lima, L. F., Silva, A. W., Donato, M. A., Campello, C. C., Peixoto, C. A., Figueiredo, J. R. and Rodrigues, A. P.

- (2011). Expression of keratinocyte growth factor in goat ovaries and its effects on preantral follicles within cultured ovarian cortex. *Reprod. Sci. in press*.
- Felmeden, D. C., Blann, A. D., Lip, G. Y. H. (2003). Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur. Heart J.* **24**, 586–603.
- Fernig, D. G. and Gallagher, J. T. (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.* **5**, 353-377.
- Fields, S. D., Hansen, P. J. and Ealy, A. D. (2011). Fibroblast growth factor requirements for *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology.* **75**, 1466-1475.
- Finch, P. W. and Rubin, J. S. (2004). "Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair". *Adv. Cancer Res.* **91**, 69–136.
- Florkiewicz, R. Z., Anchin, J. and Baird, A. (1998). The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 544-551.
- Folkman, J. and Shing, Y.(1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934.
- Fortune, J. E., Rivera, G. M. and Yang, M. Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* **82**, 109-126.
- Gabler, C., Plath-Gabler, A., Einspanier, A. and Einspanier, R., (1998). Insulin-like and fibroblast growth factors and their receptors are differentially expressed in the oviduct of the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) during the ovulatory cycle. *Biol. Reprod.* **58**, 1451–1457.
- Gabler, C., Plath-Gabler, A., Killian, G. J., Berisha, B., Schams, D. (2004). Expression Pattern of Fibroblast Growth Factor (FGF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) System Members in Bovine Corpus Luteum Endothelial Cells During Treatment with FGF-2, VEGF or Oestradiol. *Reprod. Dom. Anim.* **39**, 321–327.
- Garcia, R. A., Sanchez, M. A., Letelier, C., Garcia, P. P., Sanchez, B., Vilar, M. P., Gonzalez-Bulnes, A. and Flores, J. M. (2006). Changes in fibroblast growth factor-2 in ovine follicle development. *Reprod. Domest. Anim.* **41**, 105.
- Garor, R., Ronit, A., Erman, A., Felz, C., Nitke, S. and Fisch, B. (2009). Effects of basic fibroblast growth factor on *in vitro* development of human ovarian primordial follicles. *Fertil. Steril.* **91**, 1967-1975.

- Giri, D., Ropiquet, F. and Ittmann, M. (1999). FGF9 is an autocrine and paracrine prostatic growth factor expressed by prostatic stromal cells. *J. Cell Physiol.* **180**, 53-60.
- Glister, C., Richards, S. L. and Knight, P. G. (2005). Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology.* **146**, 1883-1892.
- Goldfarb, M., Schoorlemmer, J., Williams, A., Diwakar, S., Wang, Q., Huang, X., Giza, J., Tchetchik, D., Kelley, K., Vega, A., Matthews, G., Rossi, P., Ornitz, D.M. and D'Angelo, E. (2007). Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* **55**, 449-463.
- Gordon, J. D., Shifren, J. L., Foulk, R. A., Taylor, R. N. and Jaffe, R. B. (1995). Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet. Gynecol. Surv.* **50**, 688-697.
- Gospodarowicz, D., Plouet, J., Fujii, D. K. (1989). Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. *Endocrinology.* **125**, 1266-1276.
- Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A., Killilea, S. D., Kraft, K. C. and Reynolds, L. P. (1992). Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology.* **130**, 3625-3632.
- Grundker, C. and Kirchner, C. (1996). Uterine fibroblast growth factor-2 and embryonic fibroblast growth factor receptor-1 at the beginning of gastrulation in the rabbit. *Anat. Embryol.* **194**, 169-175.
- Gründker, C. and Kirchner, C. (1996). Uterine fibroblast growth factor-2 and embryonic fibroblast growth factor receptor-1 at the beginning of gastrulation in the rabbit. *Anat. Embryol.* **194**, 169-175.
- Gupta, A., Bazer, F. W. and Jaeger, L. A. (1997). Immunolocalization of acidic and basic fibroblast growth factors in porcine uterine and conceptus tissues. *Biol. Reprod.* **56**, 1527-1536.
- Hanneken, A., Ying, W., Ling, N. and Baird, A. (1994). Identification of soluble forms of the fibroblast growth factor receptor in blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* **13**, 9170-9174.
- Hennig, T., Mogensen, C., Kirsch, J., Pohl, U. and Gloe, T. (2011). Shear Stress Induces the Release of an Endothelial Elastase: Role in Integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ -Mediated FGF-2 Release. *J. Vasc. Res.* **48**, 453-64.

- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. Aad De Bruijn, E. A. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **56**, 549–580.
- Huang, Y., Qi, S. H., Shu, B., Chen, L., Xie, J. L., Xu, Y. B. and Liu, X. S. (2011). Fibroblast growth factor-binding protein facilitates the growth and migration of skin-derived precursors. *J. Cutan. Med. Surg.* **15**, 201-209.
- Hussein, T. S., Thompson, J. G. and Gilchrist, R. B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* **296**, 514-521.
- Ibrahimi, O. A., Zhang, F., Eliseenkova, A. V., Itoh, N., Linhardt, R. J. and Mohammadi, M. (2004). Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2313–2324.
- Igarashi, M., Finch, P. W. and Aaronson, S. A. (1998). Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.* **273**, 13230–13235.
- Ishii, K., Imamura, T., Iguchi, K., Arase, S., Yoshio, Y., Arima, K., Hirano, K. and Sugimura, Y. (2009). Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth *in vivo*. *Endocr. Relat. Cancer.* **16**, 415-428.
- Itoh, N. (2007). The Fgf families in humans, mice, and zebra fish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1819-1825.
- Itoh, N. (2010). Hormone-like (endocrine) Fgfs: Their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res.* **342**, 1-11.
- Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.* **20**, 563–569.
- Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn.* **237**, 18-27.
- Itoh, N. and Ornitz, D.M. (2011). Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.* **149**, 121-130.
- Iwamoto, M., Golden, E. B. G., Adams, S. L., Noji, S. and Pacifici, M. (1993). Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Exp. Cell Res.* **205**, 213-224.
- Izumi, S., Slayden, O. D., Rubin, J. S. and Brenner, R. M. (1996). Keratinocyte growth factor and its receptor in the rhesus macaque placenta during the course of gestation. *Placenta.* **17**, 123–135.



- Jewgenow, K. (1996). Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*. **45**, 889-895.
- Ka, H., Al-Ramadan, S., Erikson, D. W., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Spencer, T. E., Jaeger, L. A. and Bazer, F. W. (2007). Regulation of expression of fibroblast growth factor 7 in the pig uterus by progesterone and estradiol. *Biol. Reprod.* **77**, 172-180.
- Ka, H., Jaeger, L. A., Johnson, G. A., Spencer, T. E. and Bazer, F. W. (2001). Keratinocyte growth factor is up-regulated by estrogen in the porcine uterine endometrium and functions in trophectoderm cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*. **142**, 2303–2310.
- Katoh, Y. and Katoh, K. (2005). Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification of FGF-25. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 767-770.
- Kezele, P., Nilsson, E. E. and Skinner, M. K. (2005). Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol. Reprod.* **73**, 967-973.
- Kharitonov, A. (2009). FGFs and metabolism. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 805-810.
- Kim, I., Moon, S., Yu, K., Kim, U. and Koh, G.Y. (2001). A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Bioc. Biophys. Acta.* **1518**, 152-156.
- Knight, P. G. and Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* **132**, 191-206.
- Kobayashi, S., Berisha, B., Amselgruber, W. M., Schams, D. and Miyamoto, A. (2001). Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. *J. Endocrinol.* **170**, 369-380.
- Koji, T., Chedid, M., Rubin, J. S., Slayden, O. D., Csaky, K. G., Aaronson, S. A. and Brenner, R. M. (1994). Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal cells of the primate endometrium: keratinocyte growth factor as a progestomedin. *J. Cell Biol.* **125**, 393–401.
- Kwan, C., Venkataraman, G., Shriver, Z., Raman, R., Liu, D., Qi, Y., Varticovski, L. and Sasisekharan, R. (2001). Probing fibroblast growth factor dimerization and role of heparin-like glycosaminoglycans in modulating dimerization and signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 23421–23429.
- Laezza, F., Lampert, A., Kozel, M. A., Gerber, B. R., Rush, A. M., Nerbonne, J. M., Waxman, S. G., Dib-Hajj, S. D. and Ornitz, D. M. (2009). FGF14 N-terminals splice variants differentially modulate Nav1.2 and Nav1.6-encoded sodium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* **42**, 90-101.

- LaPolt, P. S., Day, J. R. and Lu, J. K. (1990). Effects of estradiol and progesterone on early embryonic development in aging rats. *Biol. Reprod.* **43**, 843-850.
- Lavranos, T. C., Rodgers, H. F., Bertocello, I. and Rodgers, R. J. (1994). Ancho-rage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Experim. Cell Res.* **211**, 245-251.
- Lee, J., Choo, J., Choi, Y., Lee, K., Min, D., Pi, S., Seol, Y., Lee, S., Jo, I., Chung, C. and Park, Y. (2008). Characterization of the surface immobilized synthetic heparin binding domain derived from human fibroblast growth factor-2 and its effect on osteoblast differentiation. *J. Biom. Mat. Res.* **83**, 970-979.
- Li, Z. and Johnson, A. L. (1993). Expression and regulation of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstenedione production in hen granulosa cells. *Biol. Reprod.* **49**, 1293-302.
- Li, Z. and Johnson, A. L. (1993). Expression and regulation of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstenedione production in hen granulosa cells. *Biol Reprod.* **49**, 1293-302.
- Lih-Yuh, C., Chuang, W. P., Wu, M., Chen H. and Tsai S. (2003). Expression and Mitogenic Effect of Fibroblast Growth Factor-9 in Human Endometriotic Implant Is Regulated by Aberrant Production of Estrogen. *J. Clinical Endocrinol. Metab.* **88**, 5547-5554.
- Lu, W., Luo, Y., Kan, M. and McKeehan, W. L. (1999). Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J. Biol. Chem.* **274**, 12827-12834.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. and McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* **292**, 1389-1394.
- MacArthur, C. A., Lawshé, A., Xu, J., Santos-Ocampo, S., Heikinheimo, M., Chellaiah, A. T. and Ornitz, D. M. (1995). FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development.* **121**, 3603-3613.
- Marguerie, A., Bajolle, F., Zaffran, S., Brown, N. A., Dickson, C., Buckingham, M. E. and Kelly, R. G. (2006). Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice. *Cardiovasc. Res.* **71**, 50-60.
- Masuda, H., Otsuka, F., Matsumoto, Y., Takano, M., Miyoshi, T., Inagaki, K., Shien, T., Taira, N., Makino, H. and Doihara, H. (2011). Functional interaction of fibroblast growth factor-8, bone morphogenetic protein and estrogen receptor in breast cancer cell proliferation. *Mol. Cell Endocrinol.* **343**, 7-17.

- Matos, M. H. T., Lima-Verde, I. B., Bruno, J. B., Lopes, C. A. P., Martins, F. S., Santos, K. D. B., Rocha, R. M. P., Silva, J. R. V., Bao, S. N. and Figueiredo, J. R. (2007b). Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reprod. Fertil. Develop.* **19**, 677–684.
- Matos, M. H. T., Lima-Verde, I. B., Luque, M. C. A., Maia, J. E., Silva, J. R. V., Celestino, J. J. H., Martins, F. S., Bao, S. N., Lucci, C. M. and Figueiredo, J. R. (2007a). Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*. **15**, 173-82.
- Matos, M. H. T.; Bruno, J. B.; Rocha, R. M.; Lima-Verde, I. B.; Santos, K. D.; Saraiva, M. V.; Silva, J. R. V.; Martins, F. S.; Chaves, R.N.; Bao, S. N.; Figueiredo, J. R. (2010). *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res. Vet. Sci.* **90**, 404-411.
- Mignatti, P., Morimoto, T. and Rifkin, D. B. (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J. Cell Physiol.* **151**, 81-93.
- Millier, S. G., Whitelaw, P. F. and Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the ‘two-cell, two-gonadotrophin’ model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* **100**, 51-54.
- Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., Hernday, N. A., Ozaki, K., Yamamoto, S. and Mikami, T. (1998). Structure and expression of a novel member, FGF-16, of the fibroblast growth factor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 148–152.
- Miyoshi, T., Otsuka, F., Yamashita, M., Inagaki, K., Nakamura, E., Tsukamoto, N., Takeda, M., Suzuki, J. and Makino, H. (2010). Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **325**, 84–92.
- Mohan, S. K., Rani, S. G. and Yu, C. (2010). The hetero-hexameric complex structure, a component in the non-classical pathway for fibroblast growth factor 1 (FGF1) secretion. *J. Biol. Chem.* **285**, 15464-15475.
- Neuvians, T. P., Berisha, B., Schams, D. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 389-395.
- Nickel, W. (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 621-626.
- Nilsson, E. and Skinner, M. K. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **8**, 17-20.

- Nilsson, E., Parrot, J. A. and Skinner, M. K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell Endocr.* **175**, 123-130.
- Nugent, M. A. and Iozzo, R. V. (2000). Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 115-120.
- Ornitz, D. A., Itoh, N., (2001). Protein Family review – fibroblast growth factors. *Genome Biol.* **2**, 1–12.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, 15292-15297.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G. and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, 15292–15297.
- Oury, F. and Darbon, J. M. (1988). Fibroblast growth factor regulates the expression of luteinizing hormone receptors in cultured rat granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 634-643.
- Paiva, P., Hannan, N. J., Hincks, C., Meehan, K. L., Pruyers, E., Dimitriadis, E. and Salamonsen, L. A. (2011). Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. *Hum. Reprod.* **26**, 1153-1162.
- Parrott, J. A. and Skinner, M. K. (1998b). Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology.* **139**, 228-235.
- Parrott, J. A., Kim, G., Mosher, R. and Skinner, M. K. (2000). Expression and action of keratinocyte growth factor (KGF) in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* **167**, 77-87.
- Parrott, J. A., Vigne, J. L., Chu, B. Z. and Skinner, M. K. (1994). Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology.* **135**, 569-575.
- Pedchenko, V. K. and Imagawa, W. (2000). Estrogen treatment *in vivo* increases keratinocyte growth factor expression in the mammary gland. *J. Endocrinol.* **165**, 39-49.

- Peluso, J. (2003). Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an antiapoptotic mechanism of action. *Biochem Pharmacol.* **66**, 1363–1369.
- Peluso, J. J. (2003). Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1363-1369.
- Peluso, J. J. and Pappalardo, A. (1999). Progesterone maintains large rat granulosa cell viability indirectly by stimulating small granulosa cells to synthesize basic fibroblast growth factor. *Biol. Reprod.* **60**, 290–296.
- Peluso, J. J., Pappalardo, A. and Fernandez, G. (2001). Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC delta-dependent pathway. *Endocrinology.* **142**, 4203–4211.
- Peluso, S., Rückle, T., Lehmann, C., Mutter, M., Peggion, C. and Crisma, M. (2001). Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *Chembiochem.* **2**, 432-437.
- Pinto, M. G. L., Castilho, A. C. S., Amorim, R. L., Price, C. A., Buratini, Jr, J. (2006). Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 7 e 10 (FGF-7 e FGF-10) em folículos pré-antrais bovinos. *Acta Sci. Vet.* **34**, 362.
- Popovici, C., Conchonaud, F., Birnbaum, D. and Roubin, R. (2004). Functional Phylogeny Relates LET-756 to Fibroblast Growth Factor 9. *J. Biol. Chem.* **279**, 40146-40152.
- Portela, V. M., Machado, M., Buratini Jr, J., Zamberlam, G., Amorim, R. L., Goncalves, P. and Price, C. A. (2010). Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 18 in the Ovarian Follicle in Cattle. *Biol. Reprod.* **83**, 339–346.
- Price, W. A. (2004). Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression by growth factors and cytokines alters IGF-mediated proliferation of postnatal lung fibroblasts. *Exp. Lung Res.* **30**, 261-283.
- Puscheck, E. E., Patel, Y. and Rappolee, D. A. (1997). Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-4, but not FGFR-3 is expressed in the pregnant ovary. *Mol. Cell Endocrinol.* **132**,169-176.
- Quarto, N. and Amalric, F. (1994). Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signalling. *J Cell Sci.* **107**, 3201-12.
- Reynolds, L. P. and Redmer, D. A. (1998). Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.* **76**, 1671-81.

- Ribatti, D., Conconi, M. T. and Nussdorfer, G. G. (2007). Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **59**, 185-205.
- Riedel, F., Götte, K., Bergler, W., Rojas, W. and Hörmann, K. (2000). Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer. *Head Neck.* **22**, 183-189.
- Roghani, M. and Moscatelli, D. (1992). Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 22156-22162.
- Roy, S. K., Greenwald, G. S. (1991). *In vitro* effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor, and follicle-stimulating hormone on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biol. Reprod.* **44**, 889-896.
- Salli, U., Bartol, F. F., Wiley, A. A., Tarleton, B. J. and Braden, T. D. (1998). Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* **59**, 77-83.
- Samathanam, C. A., Adesanya, O. O., Zhou, J., Wang, J., Bondy, C. A. (1998). Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biol. Reprod.* **59**, 491-496.
- Sánchez, F., Adriaenssens, T., Romero, S. and Smitz, J. (2009). Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle enclosed oocytes during antral development and maturation *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 539-550.
- Schteingart, H. F., Meroni, S. B., Cánepa, D. F., Pellizzari, E. H. and Cigorraga, S. B. (1999). Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *Eur. J. Endocrinol.* **145**, 539-545.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. and Kato, S. (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* **21**, 138-141.
- Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Bahtiyar OM, Olive DL, Arici A. (1998). Basic fibroblast growth factor: peritoneal and follicular fluid levels and its effect on early embryonic development. *Fertil. Steril.* **69**, 1145-1148.
- Shikone, T., Yamoto, M. and Nakano, R. (1992). Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. *Endocrinology.* **131**, 1063-1068.
- Shimizu, T., Jiang, J. Y., Sasada, H. and Sato, E. (2002). Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol. Reprod.* **67**, 1846-1852.

- Shirasuna, K., Sasahara, K., Matsui, M., Shimizu, T., Miyamoto, A. (2010). Prostaglandin F2alpha differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Dev.* **56**, 428-436.
- Sleeman, M., Fraser, J., McDonald, M., Yuan, S., White, D., Grandison, P., Kumble, K., Watson, J.D. and Murison, J.G. (2001). Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* **271**, 171-182.
- Song Y, McFarland DC, Velleman SG. (2011). Fibroblast growth factor 2 and protein kinase C alpha are involved in syndecan-4 cytoplasmic domain modulation of turkey myogenic satellite cell proliferation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *In press.*
- Song, J. and Slack, J. M. (1996). XFGF-9: a new fibroblast growth factor from Xenopus embryos. *Dev. Dyn.* **206**, 427-436.
- Speirs, V., Jenkins, S. and White, M. C. (1993). Growth factor regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in a human ovarian cell line: modulation by 17 beta-estradiol. *Anticancer Res.* **13**, 1399-1403.
- Spencer-Dene, B., Sala, F. G., Bellusci, S., Gschmeissner, S., Stamp, G. and Dickson, C. (2006). Stomach development is dependent on fibroblast growth factor 10/fibroblast growth factor receptor 2b-mediated signaling. *Gastroenterology.* **130**, 1233-1244.
- Spicer, L. J. and Stewart, R. E. (1996). Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biol. Reprod.* **54**, 255-263.
- Srivastava, S., Osten, P., Vilim, F. S., Khatri, L., Inman, G., States, B., Daly, C., DeSouza, S., Abagyan, R., Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J. and Ziff, E. B. (1998). Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. *Neuron.* **21**, 581-591.
- Steger, K., Tetens, F., Seitz, J., Grothe, C. and Bergmann, M. (1998). Localization of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) protein and the receptors FGFR 1-4 in normal human seminiferous epithelium. *Histochem. Cell Biol.* **110**, 57-62.
- Stevenson, K. R. and Wathes, D. C. (1996). Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 31-40.
- Stirling, D., Waterman, M. R. and Simpson, E. R. (1991). Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* **91**, 1-8.

- Sugimura, Y., Foster, B. A., Hom, Y. K., Lipschutz, J. H., Rubin, J. S., Finch, P. W., Aaronson, S. A., Hayashi, N., Kawamura, J. and Cunha, G. R. (1996). Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 941–951.
- Sugiura, K., Su, Y. Q., Diaz, F. J., Pangas, S. A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Matzuk, M. M., Shimasaki, S. and Eppig, J. J. (2007). Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*. **134**, 2593–2603.
- Sugiura, K., You-Qiang, S., Qinglei, L., Wigglesworth, K., Matzuk, M. M. and Eppig, J. J. (2009). Fibroblast Growth Factors and Epidermal Growth Factor Cooperate with Oocyte-Derived Members of the TGFbeta Superfamily to Regulate Spry2 mRNA Levels in Mouse Cumulus Cells. *Biol. Reprod.* **81**, 833–841.
- Taylor, M. J. and Clark, C. L. (1992). Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology*. **130**, 1951-1956.
- Tilly, J. L., Billig, H., Kowalski, K. I. and Hsueh, A. J. (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine-kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocr.* **6**, 1942-50.
- Trolice, M. P., Pappalardo, A. and Peluso, J. J. (1997). Basic fibroblast growth factor and N-cadherin maintain rat granulosa cell and ovarian surface epithelial cell viability by stimulating the tyrosine phosphorylation of the fibroblast growth factor receptors. *Endocrinology*. **138**, 107-113.
- Tsafriri, A. and Adashi, E. Y. (1994). Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil E, Neill J (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York, pp 817–860.
- Tsai, S. J., Wu, M. H., Chen, H. M., Chuang, P. C. and Wing, L. Y. (2002). Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology*. **143**, 2715-2721.
- Turner, N. and Grose, R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **10**, 116-129.
- Valve, E., Martikainen, P., Seppanen, J., Oksjoki, S., Hinkka, S., Anttila, L., Grenman, S., Klemi, P., Harkonen, P. (2000). Expression of fibroblast growth factor (FGF)-8 isoforms and FGF receptors in human ovarian tumors. *Int. J. Cancer*. **88**, 718-725.



- Valve, E., Penttilä, T. L., Paranko, J. and Härkönen, P. (1997). FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 173-177.
- Van Der Hurk, R. and Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. **63**, 1717-1751.
- Van Wezel, I. L., Umaphathsivam, K., Tilley, W. D. and Rodgers, R. J. (1995). Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* **115**, 133-140.
- Veltmaat, J. M., Relaix, F., Le, L. T., Kratochwil, K., Sala, F. G., van Veelen, W., Rice, R., Spencer-Dene, B., Mailloux, A. A., Rice, D. P., Thiery, J. P. and Bellusci, S. (2006). Gli3-mediated somitic Fgf10 expression gradients are required for the induction and patterning of mammary epithelium along the embryonic axes. *Development*. **133**, 2325-2335.
- Vernon, R. K. and Spicer, L. J. (1994). Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J. Anim. Sci.* **72**, 2696-26702.
- Vesterlund, L., Töhönen, V., Hovatta, O. and Kere, J. (2011). Co-localization of neural cell adhesion molecule and fibroblast growth factor receptor 2 in early embryo development. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 313-319.
- Wandji, S. A., Eppig, J. J. and Fortune, J. E. (1996). FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*. **45**, 817-832.
- Ware, L. B. and Matthay, M. A., (2002). Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **282**, 924-940.
- Watson, J. B., Getzler, S. B. and Mosher, D. F. (1994). Platelet factor-4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor. *J. Clin. Invest.* **94**, 261-268.
- Werner, S., Peters, K. G., Longaker, M. T., Fuller-Pace, F., Banda, M. J., Williams, L. T. (1992). Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6896-900.
- Woad, K. J., Hunter, M. G., Mann, G. E., Laird, M., Hammond, A. J. and Robinson, R. S. (2011). Fibroblast growth factor (FGF) 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction. In press.*

- Wood, P. A., Bove, K., You, S., Chambers, A. and Hrushesky, W. J. (2005). Cancer growth and spread are saltatory and phase-locked to the reproductive cycle through mediators of angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1065-1075.
- Wright, T. J. and Mansour, S. L. (2003). Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development.* **130**, 3379-3390.
- Xu, R. H., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T. and Thomson, J. A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat. Methods.* **2**, 185-190.
- Yamamoto, S., Konishi, I., Tsuruta, Y., Nanbu, K., Kuroda, H., Matsushita, K., Hamid, A., Yura, Y. and Mori, I. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol.* **11**, 371-381.
- Yeoh J. S. G. and Haan G. (2007). Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mec. A. Dev.* **128**, 17-24.
- Yokohama-Tamaki, T., Ohshima, H., Fujiwara, N., Takada, Y., Ichimori, Y., Wakisaka, S., Ohuchi, H. and Harada, H. (2006). Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development.* **133**, 1359-1366.
- Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M. and Ornitz, D. M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* **281**, 15694-15700.
- Zheng, J., Wen, Y., Song, Y., Wang, K., Chen, D. B. and Magness, R. R. (2008). Activation of multiple signaling pathways is critical for fibroblast growth factor 2- and vascular endothelial growth factor-stimulated ovine fetoplacental endothelial cell proliferation. *Biol. Reprod.* **78**, 143-150.
- Zhou, H. and Zhang, Y. (2005). Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest. Anim. Endocrin.* **28**, 235-242.

**Caracterização estrutural do fator de crescimento de fibroblasto-10 e seu papel na  
fisiologia folicular ovariana**

*(Structural characterization of the fibroblast growth factor-10 and its role in ovarian follicular  
physiology)*

**Periódico:** *Acta Scientiae Veterinarie*, 39(4): 1-12, 2011.

## Resumo

O interesse sobre a foliculogênese tem crescido amplamente nos últimos anos. Apesar disso, vários aspectos relativos à atividade folicular permanecem pouco esclarecidos. Desta forma, o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos utilizando novas substâncias se estabelece como um modelo bastante viável, ampliando as perspectivas de uma melhor compreensão da atividade folicular. Dentre os membros da família de fator de crescimento de fibroblastos (FGFs), o FGF-10 tem recebido recente atenção por sua habilidade em regular o desenvolvimento de folículos ovarianos e a maturação oocitária. Tendo em vista a relevância do FGF-10 no processo de foliculogênese, a presente revisão teve como objetivo descrever as características estruturais, a expressão e os principais efeitos biológicos do FGF-10 sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos em mamíferos. Ao longo desse trabalho, foram mostrados aspectos relativos à caracterização do FGF-10 e seus receptores, bem como a expressão do FGF-10 em diferentes tipos celulares, enfatizando sua importância para o desenvolvimento folicular. O FGF-10 é um membro do tipo parácrino da família dos FGFs, o qual se caracteriza por promover respostas biológicas via receptores de superfície celular (FGFRs) do tipo tirosina-quinase. Destes receptores, os FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 podem sofrer arranjos transcricionais alternativos, possibilitando a formação de duas isoformas (b e c) que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs. Assim, sete proteínas de FGFRs (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c e 4) com diferentes especificidades de ligação são geradas a partir dos quatro genes para *Fgfr*. Os FGFRs transmitem sinais intracelulares após a união com o ligante através da fosforilação da tirosina, o que gera vários padrões de transdução sinalizados citoplasmaticamente. A transdução de sinal do FGF-10 pode ocorrer através de três vias principais: proteína do sarcoma de ratos (Ras)/MAPK, PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt), as quais estão envolvidas na transmissão de sinais biológicos e na proliferação e diferenciação celular induzida pelo FGF-10. Estudos detectaram a expressão do RNAm para FGF-10 no estroma ovariano e em oócito e nas células da teca de folículos pré-antrais e antrais e para os seus receptores nas células do cumulus e oócitos. Embora os FGFs estejam amplamente distribuídos em diferentes tecidos e tipos celulares, a importância e a função dos FGFs no ovário ainda são pouco documentados. Desta forma, o FGF-10 mostra ser um importante mediador das interações celulares mesenquimais e epiteliais durante o desenvolvimento folicular, promovendo a sobrevivência, ativação e crescimento folicular. Além da atuação na foliculogênese, o FGF-10 foi recentemente apontado como um fator capaz de melhorar a competência oocitária. No entanto, em folículos antrais, a presença do FGF-10 está associada

com o aumento da atresia folicular, devido a sua ação antiestrogênica. A partir desta revisão foi possível constatar que o FGF-10 é importante para a reprodução de fêmeas. Este fator de crescimento atua na sobrevivência folicular, bem como estimulando a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus e a proliferação das células da granulosa/teca através de ações diretas e/ou indiretas no controle da foliculogênese. Além disso, o FGF-10 pareceu exercer efeitos diferenciados ao longo do desenvolvimento folicular. Entretanto, é necessária a realização de estudos adicionais que promovam um maior entendimento sobre a importância do FGF-10 durante a foliculogênese.

**Palavras-chave:** FGF-10, folículos, ovário, transdução de sinal.

## Caracterização estrutural do fator de crescimento de fibroblasto-10 e seu papel na fisiologia folicular ovariana

Structural characterization of the fibroblast growth factor-10 and its role in ovarian follicular physiology

Roberta Nogueira Chaves<sup>1</sup>, Isadora Machado Teixeira Lima<sup>1</sup>, Ana Beatriz Graça Duarte<sup>1</sup>, José Buratini Jr.<sup>2</sup> & José Ricardo de Figueiredo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Paranjana, 1700, Campus Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil. <sup>2</sup> Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista (UNESP), CEP 18618-000 Botucatu, SP, Brasil. CORRESPONDÊNCIA: R.N. Chaves [[rncvet@gmail.com](mailto:rncvet@gmail.com) ou [rncvet@yahoo.com.br](mailto:rncvet@yahoo.com.br) - FAX: +(55) 85 3101-9840].

### ABSTRACT

**Background:** Interest in folliculogenesis has grown extensively in recent years. Nevertheless, several aspects of follicular activity are still poorly understood. Thus, *in vitro* culture of ovarian follicles using new substances has been established as a very viable model, enhancing the prospects for a better understanding of follicular activity. Among the family members of the fibroblast growth factor (FGFs), FGF-10 has received recent attention for its ability to regulate the development of ovarian follicles and oocyte maturation. Given the relevance of FGF-10 in the folliculogenesis process, this review aimed to describe the structural features, expression and the main biological effects of FGF-10 on the development of ovarian follicles in mammals.

**Review:** Along this work, it was shown aspects related to structural characterization of FGF-10 and its receptors, as well as FGF-10 expression in different cell types, emphasizing its importance to follicular development. FGF-10 is a paracrine member of the family of FGFs, and is characterized by promoting biological responses via cell surface receptors (FGFRs) of tyrosine kinase-type. Of these receptors, FGFR-1, FGFR-2 and FGFR-3 may undergo alternative transcriptional arrangements, enabling the formation of two isoforms (b and c) that have varying degrees of affinity for the various FGFs. Thus, seven FGFR proteins (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c and 4) with different binding specificities are generated from the four FGFR

genes. The FGFRs transmit intracellular signals after binding with the ligand through the phosphorylation of tyrosine, which activates various transduction patterns in the cytoplasm. The signal transduction of FGF-10 may occur through three main pathways: protein of rat sarcoma (Ras)/MAPK, PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> and phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), which are involved in the transmission of biological signals, leading to cellular proliferation and differentiation. FGF-10 mRNA expression was detected in the ovarian stroma, oocyte and theca cells of preantral and antral follicles. On the other hand, the expression of mRNA for FGF-10 receptors was found in, granulosa cells, theca cells, cumulus cells and oocytes. Although FGFs are widely distributed in different tissues and cell types, the importance and function of FGFs in the ovary are still poorly documented. FGF-10 has been shown to be an important mediator of mesenchyme and epithelial cell interactions during follicle development, promoting follicular survival, activation and growth. Besides the action on folliculogenesis, FGF-10 was recently identified as a growth factor able to improve oocyte competence. However, in antral follicles, the presence of FGF-10 is associated with increased follicular atresia, which matches its anti-estrogenic action. **Conclusion:** From this review, we can conclude that FGF-10 is an important regulator of female reproduction. This growth factor acts in follicle survival, oocyte maturation, expansion of cumulus cells and proliferation of granulosa/theca cells through direct and/or indirect actions in the control of folliculogenesis. Furthermore, FGF-10 seemed to have different effects throughout the follicular development. However, it is necessary to perform additional studies that may provide a better understanding about the importance of FGF-10 during folliculogenesis.

**Keywords:** FGF-10, follicles, ovary, signal transduction

**Descritores:** FGF-10, folículos, ovário, transdução de sinal.

## I. INTRODUÇÃO

## II. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES

## III. TRANSDUÇÃO DO SINAL DO FGF-10 NA REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE

### 3.1 Via Ras/MAPK

### 3.2 Via PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>

### 3.3 Via PI3K/Akt

## IV. EXPRESSÃO DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO

## V. PAPEL DO FGF-10 NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

## I. INTRODUÇÃO

O interesse sobre a foliculogênese tem crescido amplamente nos últimos anos. Apesar disso, vários aspectos relativos à atividade folicular permanecem ainda pouco esclarecidos. Na pesquisa fundamental, o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos se estabelece como um modelo bastante viável, ampliando enormemente as perspectivas de uma melhor compreensão da fisiologia folicular. Visando o adequado desenvolvimento folicular *in vitro*, novas substâncias têm sido testadas, permitindo um melhor esclarecimento sobre os mecanismos envolvidos no recrutamento e crescimento folicular.

Dentre os vários fatores de crescimento envolvidos no controle do desenvolvimento folicular, incluem-se os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs). Os FGFs constituem uma grande família de fatores de crescimento (22 membros), cuja função envolve o estímulo a diversos processos celulares incluindo a quimiotaxia, a migração, a diferenciação, crescimento e sobrevivência celular e a angiogênese [37, 55]. A característica comum a todos os FGFs é que eles são estruturalmente relacionados e geralmente induzem suas respostas biológicas se ligando e ativando receptores de alta afinidade para FGFs (FGFRs) [13].

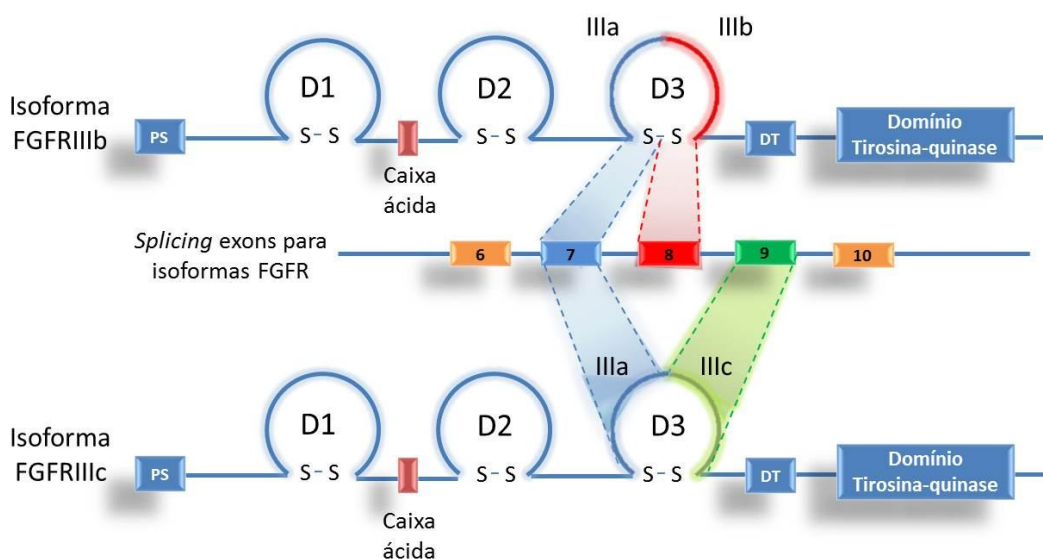
Dentre os membros da família FGF, o fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) tem recebido recente atenção por sua habilidade em regular o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais e a maturação oocitária [16, 22, 72]. Tendo em vista a relevância do FGF-10 no processo de foliculogênese, aliada à limitada quantidade de informações disponíveis sobre a atuação deste fator em células foliculares, a presente revisão tem como objetivo descrever a caracterização estrutural e a localização do FGF-10 e seus receptores no ovário, bem como os principais efeitos biológicos do FGF-10 sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos em mamíferos.

## II. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES

Descrito como uma proteína (26 kDa) composta por 215 aminoácidos e expressa em embriões e no pulmão de ratos adultos, o FGF-10, também conhecido como fator de crescimento queratinócito-2 (KGF-2), foi o décimo peptídeo da família dos FGFs a ser identificado [71]. O FGF-10 é um membro do tipo parácrino da família dos FGFs, o qual se caracteriza por promover respostas biológicas sempre via receptores de superfície celular (FGFRs) [36].

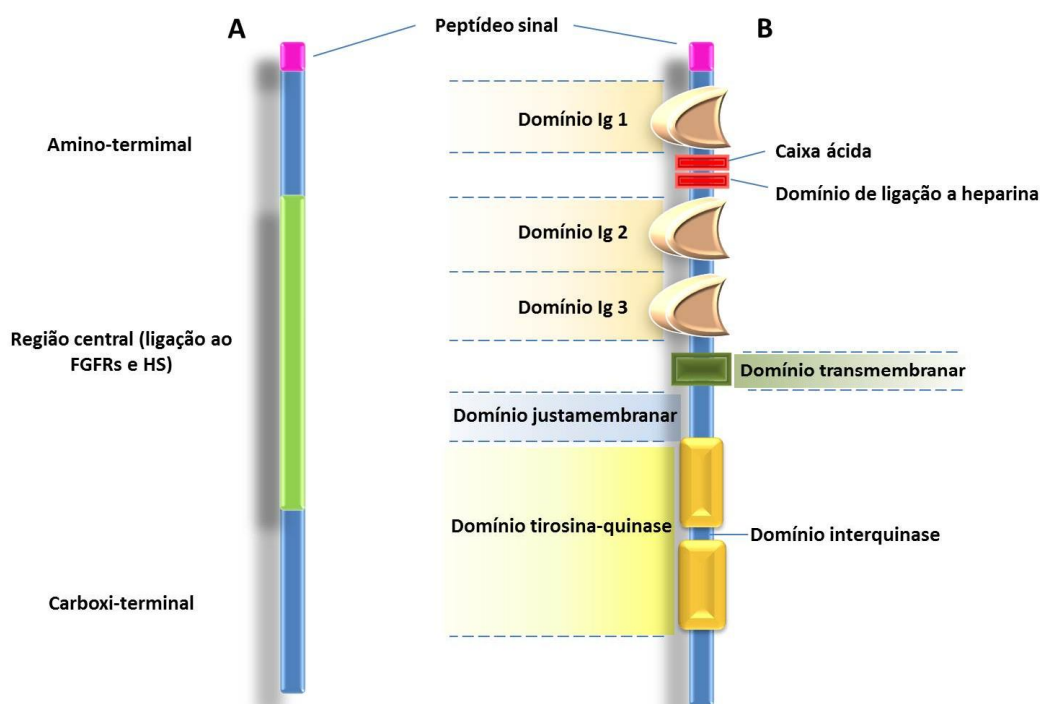


Em humanos e camundongos, quatro genes de *Fgfr* (FGFR -1 a -4) já foram identificados [5, 34, 69]. Os FGFR-1 a 4 correspondem a receptores do tipo tirosina-quinase (aproximadamente 800 aminoácidos) localizados na membrana plasmática. Destes receptores, os FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 podem sofrer arranjos transcricionais alternativos (*alternative splicing*), possibilitando a formação de duas isoformas (b e c) que apresentam diferentes graus de afinidade pelos diversos FGFs (Figura 1) [34, 56]. Assim, sete proteínas de FGFRs (FGFRs 1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c e 4) com diferentes especificidades de ligação são geradas a partir dos quatro genes para *Fgfr* [36]. O FGFR-5, descoberto mais recentemente, apresenta dois transcritos alternativos: FGFR-5  $\gamma$  e  $\beta$  [40, 65]. Este receptor não apresenta o domínio tirosina-quinase intracelular como os outros FGFRs [65], mas há relatos de ligação ao FGF-2 por conservar resíduos de domínios extracelulares importantes para o acoplamento com os ligantes dos FGFs. Sua função biológica não está plenamente esclarecida, embora estudos postulem o papel deste receptor no sequestro e modulação da sinalização dos FGFs [68].



**Figura 1.** Estrutura do FGFR e isoformas (IIIb e IIIc) geradas por *splicing* alternativo dos transcritos do FGFR. A estrutura dos FGFRs é ilustrada e inclui um peptídeo sinal (PS), três domínios Ig (D1-D3), uma caixa ácida, domínio transmembranar (DT) e um domínio tirosina quinase. As duas formas são geradas por *splicing* alternativos dos exons 8 e 9. A porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 8 para gerar a isoforma FGFRIIIb, enquanto a porção C-terminal do domínio III é codificado pelo exon 9 para gerar a isoforma FGFRIIIc. Adaptado de Cotton *et al.* [43].

Estruturalmente, os FGFRs (exceto o FGFR-5) são caracterizados por uma porção extracelular, um domínio transmembranar e um domínio intracelular responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulados por FGFs. A porção extracelular, por sua vez, está dividida em três domínios semelhantes à imunoglobulina (domínios *Ig-like*): D1, D2 e D3, que são responsáveis pela interação e especificidade com os FGFs. Entre os domínios D1 e D2 há uma região de 4-8 aminoácidos ácidos, denominada caixa ácida (a única característica comum dos receptores FGF com importância na função do receptor) [25, 73]. Além disso, existe uma região carregada positivamente em D2, a qual funciona como sítio de ligação à heparina [64]. Após o domínio D3 encontra-se a região transmembranar. É no domínio D3 que o *splicing* alternativo dos genes FGFR-1, 2 e 3 gera as duas isoformas funcionais dos tipos b e c (FGFRIIIb e FGFRIIIc) citadas previamente [25]. No lado intracelular há dois domínios de proteína tirosina-quinase que contêm ao todo 7 resíduos de tirosina que podem ser fosforilados (Figura 2) [50].



**Figura 2.** Estrutura esquemática do FGF-10 e FGFR. A: Estrutura da proteína FGF-10 contendo uma sequência sinal e uma região conservada que contém sítios de ligação ao receptor e aos proteoglicanos heparan sulfato (HS). B: Principais características estruturais dos FGFRs incluindo domínio Ig (1, 2, 3), caixa ácida, domínio de ligação a heparina, domínio transmembranar e um domínio tirosina-quinase.

As proteínas FGFs apresentam uma similaridade superior a 90% em termos de sequência de aminoácidos idênticos [55]. Baseado na similaridade estrutural entre os FGFs e por análises filogenéticas dos genes da família FGF, em humanos e ratos, foi demonstrado que essa família de peptídeos encontra-se dividida em sete subfamílias: FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-9, iFGF e hFGF [35]. O FGF-10 está agrupado com o FGF-3, FGF-7 e FGF-22 [36]. Desta forma, o FGF-10 é bastante semelhante ao FGF-7 (ou KGF), tanto no que se refere à estrutura e sequência do gene, quanto às propriedades funcionais. Ambos apresentam alta afinidade pelo FGFR2b (ou KGFR), o qual é altamente expresso no epitélio pulmonar de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento [33, 53, 58]. Esta similaridade sugere que o FGF-7 e o FGF-10 atuam de forma sinérgica [33]. Contudo, o FGF-10 não atua somente via ativação do FGFR2b, mas também por intermédio do FGFR1b, que se mostrou capaz de ativar a via da proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) em implantes de pele e cérebro de ratos após tratamento com FGF-10 [6, 34].

A interação ligante-receptor é coordenada pela conjugação desse complexo com a heparina ou proteoglicanos heparan sulfato (HS), os quais conferem maior estabilidade à ligação e dimerização dos FGFRs [28]. A heparina é um polímero de dissacarídeo que contém três grupos sulfato conferindo-lhe carga negativa, enquanto os proteoglicanos HS, que são estruturalmente relacionadas à heparina, contêm um resíduo não totalmente sulfatado, resultando em uma menor carga negativa à molécula [61]. Desta forma, a sinalização do FGF-10 é regulada em parte por sua afinidade com a matriz extracelular por meio dos proteoglicanos heparan sulfato ou heparina [39] e em parte pela dimerização de alguns FGFs [32]. A transdução do sinal é feita pela ativação do FGFR, após ligação do FGF-10 a este, por diversas vias citoplasmáticas [69].

### **III. TRANSDUÇÃO DO SINAL DO FGF-10 NA REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE**

Os FGFRs, como os demais receptores do tipo tirosina-quinase, transmitem sinais intracelulares após a união com o ligante através da fosforilação da tirosina, o que gera vários padrões de transdução sinalizados citoplasmaticamente [65]. O FGF-10 se liga ao seu receptor entre os domínios D2 e D3, formando um complexo ternário estável (FGF-FGFR-HS/heparina). A ligação do FGF-10 causa a dimerização do receptor e estimula a ativação da tirosina-quinase levando a uma autofosforilação do domínio intracelular [48]. A autofosforilação da proteína tirosina controla a atividade do receptor, mas também serve como um mecanismo para

montagem e recrutamento de complexos de sinalização [64]. Essas tirosinas fosforiladas funcionam como sítios de ligação para proteínas tirosina-quinase citoplasmáticas (Src), as quais possuem fosfolipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), com uma atividade catalítica intrínseca [26]. A transdução de sinal do FGF-10 pode ocorrer através de três vias principais: proteína do sarcoma de ratos (Ras)/MAPK, PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt) (Figura 3) [13].

#### Via Ras/ MAPK

A via mais comumente empregada pelos FGFs é a via MAPK. Essa via envolve o acoplamento de lipídios ancorados a uma proteína intracelular, FRS2, que tem uma relação de grande afinidade com o FGFR1 [54]. Vários grupos têm demonstrado a importância da FRS2 na transdução do sinal mediado por FGFR1 durante o desenvolvimento embrionário [1, 30, 42]. Após a ativação do FGFR, ocorre a fosforilação da FRS2 pela atividade dos domínios de tirosina-quinase. Fosforilada, esta proteína atuará como recrutadora citoplasmática de um complexo multiproteico que ativa e controla a via de sinalização Ras/MAPK e a via PI3K/Akt [13].

Os sítios FRS2 de fosforilação da tirosina são reconhecidos e ligados pela proteína adaptadora Grb2 e a proteína tirosina fosfatase (PTP) Shp2 [31]. A Grb2 forma um complexo com o nucleotídeo guanina modificando o fator de troca do nucleotídeo guanina *Son of sevenless* (SOS), através do seu domínio SH3. A translocação deste complexo para a membrana plasmática, através da ligação a FRS2 fosforilada, permite que o SOS ative o gene Ras através da mudança da guanosina trifosfato (GTP) devido à sua proximidade com a membrana. Uma vez no estado GTP ativada, a proteína Ras interage com várias proteínas efetoras, incluindo Raf (quinase específica para Ser/Thr), levando à ativação da cascata de sinalização MAPK. No núcleo, esta cascata leva à fosforilação de fatores de transcrição específicos, tais como *c-myc*, AP1, e os membros da família de fatores de transcrição Ets com influência na regulação gênica [44]. A via de ativação da proteína Ras é crucial para a proliferação e diferenciação celular induzida pelo FGF-10 [12].

#### Via PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>

Em alguns receptores do tipo tirosina-quinase, a dimerização envolve alterações conformacionais nos domínios intracelulares [10], o que contribui para a ativação da quinase.

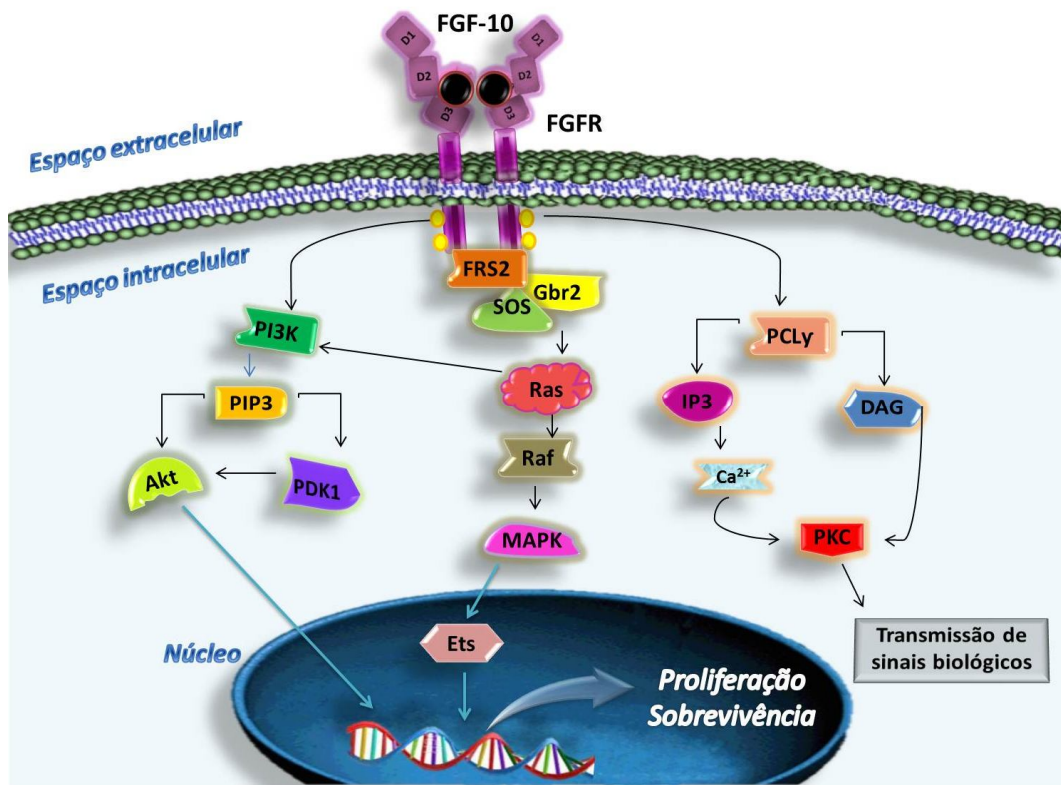
No FGFR1, dos cinco resíduos de tirosina localizados na região citoplasmática do receptor, Y776 não é fosforilado, enquanto Y463, Y583, Y585 e Y766 são sítios potencialmente fosforiláveis [49].

A via PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> envolve a ligação da fosfolipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) com a tirosina Y766 não fosforilada de FGFR1 [59]. Após a ativação, a PLC $\gamma$  hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-difosfato para formar dois segundos mensageiros, inositol-3 fosfato (IP3) e diacilglicerol-fosfato (DAG). O diacilglicerol é um ativador da proteína quinase C (PKC), enquanto que o inositol-3 fosfato estimula a liberação de cálcio intracelular. Essa cascata tem sido implicada na entrada das células na fase S do ciclo celular [13]. A ativação da PLC $\gamma$  tem um papel importante na transmissão de sinais biológicos dos diversos FGFs.

#### Via PI3K/Akt

A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é um padrão de sinalização fundamental para a regulação da proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular, além de ter um importante papel na regulação da ativação de folículos primordiais [17, 38]. A proteína quinase B (Akt), por sua vez, é uma molécula sinalizadora conhecida por aumentar a proliferação e a sobrevivência celular, bem como a síntese de glicogênio e proteína [11]. A via PI3K/Akt pode ser ativada por três mecanismos após ativação do FGFR, e os fosfolípidios assim gerados regulam, direta ou indiretamente, a atividade das proteínas-alvo, tais como o Akt [13].

A enzima PI3K é uma quinase de lipídio altamente conservada que fosforila o grupamento 3-hidroxila do anel inositol para gerar lipídios PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>. Os lipídios formados servem como sítio de ancoragem para proteínas intracelulares, permitindo sua interação em complexos sinalizadores que transmitem sinais da membrana plasmática para o citosol [70]. O protótipo dessas moléculas é a Akt. Tal proteína tem um domínio PH que a direciona para a membrana plasmática quando a PI3K é ativada. Essa reação leva à ativação de várias vias de sinalização intracelulares que regulam funções celulares diversas como crescimento, sobrevivência e proliferação celular [24].



**Figura 3.** Esquema do FGFR e suas vias de sinalização. Formação do complexo FGF-FGFR-heparina/HS leva à autofosforilação do receptor e à ativação de cascatas de sinalização intracelular das vias Ras/MAPK (centro), PI3K/Akt (esquerda) e PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>/PKC (direita). Os receptores EphA induzem a fosforilação da tirosina dos FGFRs e FRS2 através da formação de um complexo com o FGFR. A cascata de sinalização Ras/MAPK é ativada pela ligação da Grb2 ao FRS2 fosforilado. A subsequente formação do complexo Grb2/SOS resulta na ativação da Ras. Existem duas rotas pelas quais os FGFRs são capazes de ativar a via PI3K/Akt: a PI3K pode se ligar diretamente ao resíduo de tirosina fosforilado do FGFR; ou a Ras ativada pode induzir a localização na membrana e a ativação da subunidade catalítica PI3K. A via PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> é ativada quando a autofosforilação de um resíduo de tirosina na extremidade carboxi-terminal do FGFR cria um sítio de ligação específico para o domínio SH2 da PLC $\gamma$ . Os últimos componentes ativados das cascatas de transdução de sinais mencionadas acima se translocam para o núcleo e fosforilam os fatores de transcrição específicos da família Ets, os quais, por sua vez, ativam a expressão de genes-alvo dos FGFs.

#### IV. EXPRESSÃO DO FGF-10 E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO

Os FGFs são expressos no ovário e estão envolvidos em diferentes eventos fisiológicos locais, incluindo a ativação de folículos primordiais [52], o crescimento inicial do oócito [23] e a seleção de folículos dominantes [7]. Especificamente em relação ao FGF-10, estudos detectaram a expressão do seu RNAm nas células da teca e no estroma ovariano em humanos [67]. Já em bovinos foi verificada a presença do RNAm para este fator de crescimento em oócitos e células da teca de folículos antrais e células luteais, bem como em folículos primordiais, primários e secundários [16, 19]. Além disso, observou-se que a expressão do FGF-10 nas células da teca pode variar de acordo com a viabilidade folicular, diminuindo com o crescimento e aumento da capacidade esteroidogênica [16]. A expressão do FGF-10 em células da granulosa também foi confirmada pela localização da sua proteína nesse compartimento, embora o RNAm não tenha sido localizado. Essa discrepância pode ser explicada pela internalização do FGF-10 após ligação ao seu receptor, que é expresso nas células da granulosa [16].

Segundo Buratini et al. [16], os níveis de RNAm para FGF-10 nas células da teca diminuem conforme aumentam as concentrações intrafoliculares de estradiol, indicando uma regulação deste fator durante a foliculogênese. Tal fato associado à observação de que o FSH estimula a expressão do principal receptor do FGF-10 (FGFR2b) em células da granulosa sugere que o FGF-10 de origem tecal regula as células da granulosa de folículos antrais, denotando uma atuação parácrina desse fator [15]. Berisha et al. [9] identificaram o receptor FGFR2b nas células da granulosa e teca interna de folículos antrais bovinos, sendo sua expressão nas células da granulosa diretamente correlacionada com os níveis de estradiol no fluido folicular. Entretanto, em um estudo posterior desta mesma equipe, a expressão do receptor FGFR2b não demonstrou sofrer regulação pelo pico ovulatório de LH [8]. Um estudo recente em bovinos revelou que os transcritos para cada um dos quatro genes de receptores para FGFs estão presentes nas células do cumulus e oócitos [72]. Usando *primers* específicos para amplificar as variantes FGFR1 e R2 [29], os transcritos de R1b e R2b foram detectados em ambos os tecidos e pareceu que o RNAm para R1b foi o receptor predominante nas células da granulosa, enquanto o receptor R2b foi mais prevalente em oócitos [72]. De acordo com Cho *et al.* [23], as células do cumulus também expressam o receptor FGFR2b e a ativação deste pelo FGF-7 promove o crescimento inicial de oócitos bovinos. Apesar da similaridade entre os fatores, estudos indicam a ocorrência de alta expressão do RNAm para FGF-10 associada a uma ausência do FGF-7 em oócitos desta mesma espécie [14].

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FGF-10 em cultivo de células da granulosa bovinas promove uma diminuição dose-dependente da produção de estradiol e da expressão do receptor tipo 2 de angiotensina II [16, 60]. Aliado a isto, Buratini et al. [16] sugerem um modelo no qual o FGF-10, na fase antral inicial, atuaria como um estimulante da proliferação e inibidor da diferenciação celular. À medida que ocorre o desenvolvimento folicular, a diminuição progressiva na expressão do gene do FGF-10 nas células da teca possibilitaria a diferenciação celular e o aumento na síntese de estradiol. De fato, tem sido demonstrado que folículos subordinados expressam mais FGF-10 em comparação aos folículos dominantes que se mantêm em crescimento [18].

## V. PAPEL DO FGF-10 NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

Embora os FGFs estejam amplamente distribuídos em diferentes tecidos e tipos celulares, a importância e a função dos FGFs no ovário ainda são pouco documentadas. Dentro do ovário, o membro mais estudado da família dos FGFs é o FGF-2 ou FGF básico (bFGF), o qual tem sido identificado como potencial regulador da função ovariana [3, 63]. Sua produção tem sido demonstrada em células da granulosa de bovinos [51] e seu papel tem sido observado na estimulação da proliferação de células da teca bovinas [66] bem como na ativação de folículos primordiais de ratas [27] e cabras [46]. Contudo, conforme discutido previamente, a família FGF é composta de 22 membros que ativam 7 receptores diferentes [34], o que sugere a participação de outros FGFs no controle da foliculogênese. Dentre os membros conhecidos da família FGF, o FGF-10 possui a maior sequência de similaridades ao FGF-7 (KGF), o que leva a crer que o FGF-10 tem propriedades de ligação ao receptor do KGF de forma similar ao KGF, mas são regulados de forma diferente pela matriz extracelular [33]. De fato, Ohuchi *et al.* [53] verificaram que o FGF-10 atua como maior ligante do receptor FGFR2b e atua no desenvolvimento de vários órgãos. Assim, alguns estudos sobre o efeito do FGF-10 na função ovariana têm sido realizados no intuito de relatar a função do FGF-10 no desenvolvimento folicular.

Buratini *et al.* [16] descreveram pela primeira vez a expressão do FGF-10, por imunohistoquímica, em oócitos de folículos pré-antrais e antrais e na teca de folículos antrais bovinos. O cultivo de células da granulosa demonstrou que a adição de FGF-10 diminuiu a produção de estradiol destas células, mas não alterou a proliferação celular, exercendo importante função na sinalização das células da teca para granulosa e oócito.



Desta forma, o FGF-10 tem sido descrito como um fator essencial para manter interações entre células mesenquimais e epiteliais, necessárias para o desenvolvimento normal dos componentes epiteliais de inúmeros órgãos [4, 36], assim como tem sido considerado um importante mediador das interações celulares mesenquimais e epiteliais durante o desenvolvimento folicular (Figura 4) [57].

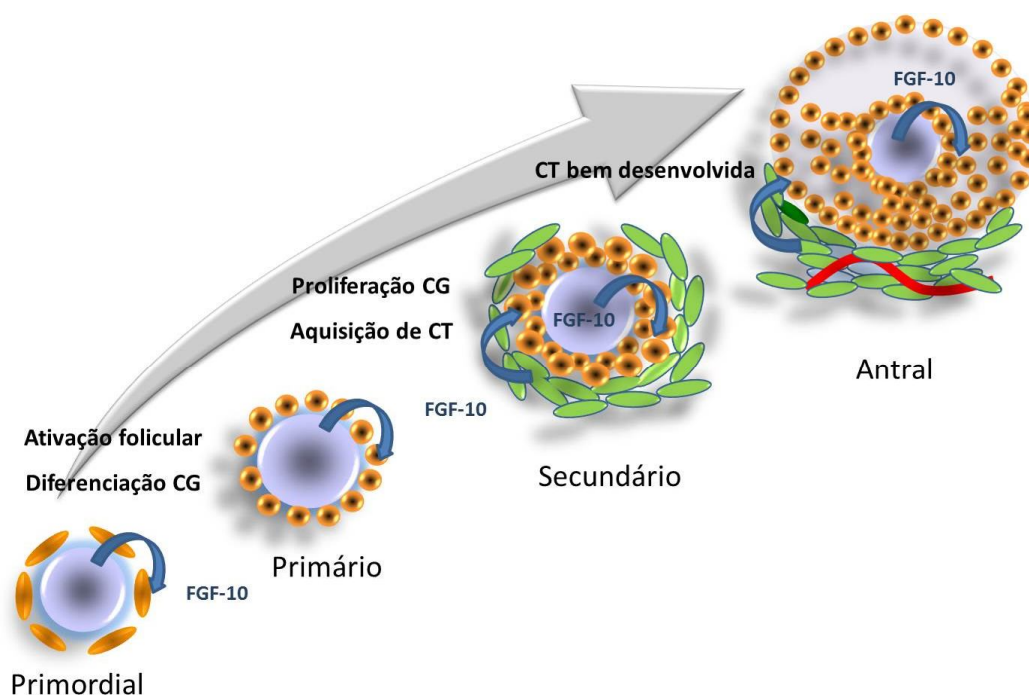
Estudos relativos ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos verificaram pela primeira vez o efeito da adição do FGF-10 na sobrevivência e no crescimento folicular quando adicionado na concentração 50 ng/mL [22]. Esse aumento no diâmetro folicular ao longo do cultivo *in vitro* condiz com um estudo prévio que considera o FGF-10 um potente indutor de proliferação em diversos tipos celulares, como células uroteliais, queratinócitos, epitélio intestinal e hepatócitos [41]. Alguns fatores desta família são descritos como atuantes na prevenção da apoptose, agindo ainda na estimulação de outros fatores que promovem a sobrevivência folicular. O FGF-2 e o FGF-7, por exemplo, atuam estimulando o Kit Ligand que, por sua vez, tem papel fundamental na ativação de folículos primordiais [45] e na sobrevivência folicular [21]. Entretanto, no estudo em folículos pré-antrais caprinos, Chaves *et al.* [22] verificaram ainda, que altas concentrações (100 ng/mL) de FGF-10 exerceram efeito negativo no cultivo folicular *in vitro*, provavelmente aumentando a apoptose folicular através da ativação da via das proteínas quinases (MAPK), a qual é envolvida tanto na sobrevivência como na apoptose, com resposta celular específica, a depender do contexto celular.

A associação entre o FSH e o FGF-10 ilustra bem a interação entre mecanismos endócrinos e parácrinos no controle do desenvolvimento folicular. Em um estudo realizado por nossa equipe foi mostrado que o cultivo de fragmentos ovarianos caprinos por 16 dias, iniciando com FSH (50 ng/mL; Dia 0 ao Dia 8) e finalizando com FGF-10 (50 ng/mL; Dia 8 ao Dia 16) isoladamente, foi capaz de promover a manutenção da viabilidade folicular e a transição de folículos primordiais para o estágio de folículo primário (Almeida *et al.*, dados não publicados). O resultado favorável obtido no estudo acima pode estar ligado ao fato do FSH estimular a expressão do FGFR2b em células da granulosa [15]. Segundo Castilho *et al.* [20] a associação temporal entre a intensificação da expressão do FGF-10 e o aparecimento de folículos primordiais e primários, bem como aumento no número desses últimos entre os 75 e 120 dias de gestação, condiz com a participação desse fator de crescimento como modulador da ativação de folículos primordiais e formação de folículos primários, conforme descrito para o FGF-7 [47].

O FGF-10 parece estar envolvido no controle do remodelamento da matriz extracelular, uma vez que este fator promoveu a ativação de indutores de plasminogênio e de

metaloproteinases na placenta humana no primeiro trimestre de gestação [2, 62]. Entretanto, ainda são necessários estudos para definir quais as funções exatas da matriz extracelular no controle da atividade dos FGFs durante a foliculogênese e qual o papel dos FGFs na regulação do crescimento folicular.

Além da atuação na foliculogênese, o FGF-10 foi recentemente apontado como um fator capaz de melhorar a competência oocitária. Zhang *et al.* [72] mostraram que a adição de FGF-10 ao meio de cultivo de complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos durante a maturação *in vitro* melhorou a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus e o desenvolvimento embrionário subsequente até o estágio de blastocisto. Contudo, os mecanismos pelos quais o FGF-10 controla esse processo ainda não foram elucidados. No entanto, sugere-se uma ação do FGF-10 nas células do cumulus regulando a meiose através do fornecimento de um ooplasma com componentes importantes para uma sobrevivência embrionária precoce.



**Figura 4.** Modelo hipotético das ações mediadas pelo FGF-10 entre os diferentes tipos celulares dos folículos pré-antrais e antrais. A expressão folicular de FGF-10 seria inicialmente proveniente do oócito de folículos primordiais e primários e teria como alvo o seu receptor, o FGFR2b, presente nas células da granulosa (CG). Posteriormente, nos folículos secundários e antrais jovens, as células da teca (CT) também assumiriam a produção de FGF-10, e atuariam conjuntamente com o oócito na indução da diferenciação das células da granulosa. Adaptado de Castilho [20].

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desta revisão foi possível constatar como a família dos FGFs, e em especial o FGF-10, é importante para a reprodução de fêmeas. Este fator de crescimento atua na sobrevivência folicular, bem como estimulando a maturação oocitária, a expansão das células do cumulus e a proliferação das células da granulosa/teca através de ações diretas e/ou indiretas no controle da foliculogênese. Além disso, o FGF-10 parece atuar de forma diferenciada ao longo do desenvolvimento folicular, exercendo efeitos proliferativos na fase inicial com os folículos pré-antrais e efeitos de diferenciação na fase final, com os folículos antrais. Apesar de seu potencial, o FGF-10 ainda é um fator de crescimento pouco estudado, sendo necessária uma exploração mais aprofundada dos seus efeitos sobre a foliculogênese e a maturação oocitária durante o cultivo *in vitro* a fim de melhor compreender a fisiologia folicular e, assim, contribuir para a obtenção de números mais expressivos de oócitos fertilizáveis que poderão ser destinados, futuramente, às diferentes biotécnicas de reprodução animal.

### Nota informativa

Dados não publicados: Almeida, A.P. - [anderson\\_almeida@click21.com.br](mailto:anderson_almeida@click21.com.br)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Akagi K., Kyun P.E., Mood K. & Daar I.O. 2002.** Docking protein SNT1 is a critical mediator of fibroblast growth factor signaling during *Xenopus* embryonic development. *Developmental Dynamics*. 223(2):216-228.
- 2 Anteby E.Y., Natanson-Yaron S., Hamani Y., Sciaki Y., Goldman-Wohl D., Greenfield C., Ariel I. & Yagel S. 2005.** Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 119(1):27-35.
- 3 Armstrong D.G. & Webb R. 1997.** Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*. 2(3):139-146.
- 4 Bazer F.W., Spencer T.E., Johnson G.A., Burghardt R.C. & Wu G. 2009.** Comparative aspects of implantation. *Reproduction*. 138(2):195-209.
- 5 Beenken A. & Mohammadi M. 2009.** The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 8(3):235-253.

- 6 Beer H.D., Vindevoghe L., Gait M.J., Revestd J.R.M., Mason I., Dickson C. & Werner S. 2000.** Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor 1-IIIb is a naturally occurring functional receptor for fgfs that is preferentially expressed in the skin and the brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(21):16091-16097.
- 7 Berisha B., Schams D., Kosmann M., Amselgruber W. & Einspanier R. 2000.** Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*. 167(3):371-382.
- 8 Berisha B., Welter H., Shimizu T., Miyamoto A., Meyer H.H.M. & Schams D. 2006.** Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. *The Journal of Reproduction and Development*. 52(2):307-313.
- 9 Berisha B., Sinowatz F. & Schams D. 2004.** Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 67(2):162-171.
- 10 Bishayee S., Majumdar S., Scher C.D. & Kahn S. 1998.** Characterization of a novel anti-peptide antibody that recognizes a specific conformation of the platelet-derived growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 8(9):3696-3702.
- 11 Blume-Jensen P. & Hunter T. 2001.** Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411(6835):355-365.
- 12 Boilly B., Vercoutter-Edouart A.S., Hondermarck H., Nurcombe V. & Le Bourhis X. 2000.** FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 11(4):295-302.
- 13 Böttcher R.T. & Niehrs C. 2005.** Fibroblast Growth Factor signaling during early vertebrate development. *Endocrinology Reviews*. 26(1):63-77.
- 14 Buratini Jr J., Pinto M.G.L., Giometti I.C., Costa I.B., Teixeira A.B., Barros C.M. & Price C.A. 2004.** Fibroblast growth factor 10 gene expression in bovine antral follicles. *Biology of Reprod Special Issue*. April: 269-270.
- 15 Buratini Jr J., Teixeira A.B., Costa I.B., Glapinski V.F., Pinto M.G.L., Giometti I.C., Barros C.M., Cao M., Nicola E.S. & Price C.A. 2005.** Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*. 130(3):343-350.
- 16 Buratini Jr J., Pinto M.G.L., Castilho A.C., Amorim R.L., Giometti I.C., Portela V.M., Nicola E.S. & Price C.A. 2007.** Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its

receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biology of Reproduction*. 77(4):743-50.

**17 Cantley L.C. 2002.** The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*. 296(5573):1655-1657.

**18 Castilho A.C. 2008b.** Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) mRNA expression around follicular deviation in *Bos indicus* heifers. In: *International Symposium on Animal Biology of Reproduction*, v. 2. (São Paulo, Brasil). p. 218.

**19 Castilho A.C., Giometti I.C., Berisha B., Schams D., Price C.A., Amorim R.L., Papa P.C. & Buratini Jr J. 2008a.** Expression of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in the Bovine Corpus Luteum. *Molecular Reproduction and Development*. 75(5):940-945.

**20 Castilho, A.C.S. 2008c.** Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. 80f. Botucatu, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

**21 Celestino J.J.H., Chaves R.N., Matos M.H.T., Saraiva M.V.A., Bruno J.B., Maia Júnior J.E., Silva J.R.V. & Figueiredo J.R. 2009.** Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Animal Reproduction*. 6(4):495-508.

**22 Chaves R.N., Lima-Verde I.B., Celestino J.J.H., Duarte A.B.G., Alves A.M.C.V., Matos M.H.T., Campello C.C., Name K.P.O., Bão S.N., Buratini Jr J. & Figueiredo J.R. 2010.** Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*. 39(4):249-258.

**23 Cho J., Itoh T., Sendai Y. & Hoshi H. 2008.** Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 75(12):1736-1743.

**24 Engelman J.A., Luo J. & Cantley L.C. 2006.** The evolution of PI3K as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 7(8):606-619.

**25 Eswarakumar V.P., Lax I. & Schlessinger J. 2005.** Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Review*. 16(2):139-149.

**26 Forman-Kay J.D. & Pawson T. 1999.** Diversity in protein recognition by PTB domains. *Current Opinion in Structural Biology*. 9(6):690-695.

**27 Fortune J.E. 2003.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78(3-4):135-163.

- 28 Goetz R., Beenken A., Ibrahimi O.A., Kalinina J., Olsen S.K., Eliseenkova A.V., Xu C., Neubert T.A., Zhang F., Linhardt R.J., Yu X., White K.E., Inagaki T., Klierer S.A., Yamamoto M., Kurosu H., Ogawa Y., Kuroo M., Lanske B., Razzaque M.S. & Mohammadi M. 2007.** Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology*. 27(9):3417-3428.
- 39 Guerra D.M., Giometti I.C., Price C.A., Andrade P.B., Castilho A.C., Machado M.F., Ripamonte P., Papa P.C. & Buratini Jr J. 2008.** Expression of fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum. *Reproduction, Fertility and Development*. 20(6):659-664.
- 30 Hadari Y.R., Gotoh N., Kouhara H., Lax I. & Schlessinger J. 2001.** Critical role for the docking-protein FRS2 in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(15):8578-8583.
- 31 Hadari Y.R., Kouhara H., Lax I. & Schlessinger J. 1998.** Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*. 18(7):3966-3973.
- 32 Harada M., Murakami H., Okawa A., Okimoto N., Hiraoka S., Nakahara T., Akasaka R., Shiraishi Y., Futatsugi N., Mizutani-Koseki Y., Kuroiwa A., Shirouzu M., Yokoyama S., Taiji M., Iseki S., Ornitz D.M. & Koseki H. 2009.** FGF9 monomer/ dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nature Genetics*. 41(3):289-298.
- 33 Igarashi M., Finch P.W. & Aaronson S.A. 1998.** Characterization of recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF)-10 Reveals Functional Similarities with Keratinocyte Growth Factor (FGF-7). *The Journal of Biological Chemistry*. 273(21):13230-13235.
- 34 Itoh N. & Ornitz D. 2004.** Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*. 20(11):563-569.
- 35 Itoh N. & Ornitz D.M. 2008.** Functional Evolutionary History of the Mouse Fgf Gene Family. *Developmental Dynamics*. 237(1):18-27.
- 36 Itoh N. & Ornitz D.M. 2011.** Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *The Journal of Biochemistry*. 149(2):121-130.
- 37 Itoh N. 2007.** The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30(10):1819-1825.

- 38 John G.B., Shidler M.J., Besmer P. & Castrillon D.H. 2009.** Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental Biology*. 331(2):292-299.
- 39 Kalinina J., Byron S.A., Makarenkova H.P., Olsen S.K., Eliseenkova A.V., Larochelle W.J., Dhanabal M., Blais S., Ornitz D.M., Day L.A., Neubert T.A., Pollock P.M. & Mohammadi M. 2009.** Homodimerization controls the fibroblast growth factor 9 subfamily's receptor binding and heparan sulfate-dependent diffusion in the extracellular matrix. *Molecular and Cellular Biology*. 29(17):4663-4678.
- 40 Kim I., Moon S., Yu K., Kim U. & Koh G.Y. 2001.** A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1518(1-2):152-156.
- 41 Kosman J., Carmean N., Leaf E.M., Dyamenahalli K. & Bassuk J.A. 2007.** Translocation of fibroblast growth factor-10 and its receptor into nuclei of human urothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 102(3):769-785.
- 42 Kusakabe M., Masuyama N., Hanafusa H. & Nishida E. 2001.** *Xenopus* FRS2 is involved in early embryogenesis in cooperation with the Src family kinase Laloo. *EMBO Reports*. 2(8):727-735.
- 43 Leanne M., Cotton M., O'Bryan K. & Hinton B.T. 2008.** Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrinology Review*. 29(2):193-216.
- 44 Lee Jr J.T. & McCubrey J.A. 2002.** The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*. 16(4):486-507.
- 45 Lima I.M.T., Celestino J.J.H., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P.R. 2011.** Papel da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 34(1):3-20.
- 46 Matos M.H.T., Lima-Verde I.B., Luque M.C.A., Maia J.E., Jr Silva J.R.V., Celestino J.J.H., Martins F.S., Bão S.N., Lucci C.M. & Figueiredo J.R. 2007.** Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*. 15(2):173-82.
- 47 Mcgee E.A., Chun S.Y., Lai S., He Y. & Hsueh, A.J.W. 1999.** Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth and differentiation of preantral follicles. *Fertility and Sterility*. 71(4):732-738.

- 48 McKeehan W.L., Wang F. & Kan M. 1998.** The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*. 59:135-176.
- 49 Mohammadi M., Dikic I., Sorokin A., Burgess W.H., Jaye M. & Schlessinger J. 1996b.** Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular Cell Biology*. 16(3):977-989.
- 50 Mohammadi M., Schlessinger J. & Hubbard S.R. 1996a.** Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*. 86(4):577-787.
- 51 Neufield G., Ferrara N., Schweigerer L., Mitchell R. & Gospodarowicz D. 1987.** Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*. 121(2):597-603.
- 52 Nilsson E., Parrott J.A. & Skinner M.K. 2001.** Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 175(1-2):123-130.
- 53 Ohuchi H., Ohchi H., Hori Y., Yamasaki M., Harada H., Sekine K., Kato S. & Itoh N. 2000.** FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 277(3):643-649.
- 54 Ong S.H., Guy G.R., Hadari Y.R., Laks S., Gotoh N., Schlessinger J. & Lax I. 2000.** FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Molecular Cell Biology*. 20(3):979-989.
- 55 Ornitz D.M. & Itoh N. 2001.** Fibroblast growth factors. *Genome Biology*. 2(3):Reviews3005.
- 56 Ornitz D.M., Xu J., Colvin J.S., Mcewen D.G., Macarthur G.A., Coullir F., Gao G. & Goldfarb M. 1996.** Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(25):15292-15297.
- 57 Parrott J.A. & Skinner M.K. 1998.** Thecal Cell-Granulosa Cell Interactions Involve a Positive Feedback Loop among Keratinocyte Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor, and Kit Ligand during Ovarian Follicular Development. *Endocrinology*. 139(5):2240-2245.
- 58 Peter K.G., Chen W.G. & Willians L.T. 1992.** Two FGF receptors are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis. *Development*. 114(1):233-243.



- 59 Peters K.G., Marie J., Wilson E., Ives H.E., Escobedo J., Del Rosario M., Mirda D. & Williams L.T. 1992.** Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca<sup>2</sup> flux but not mitogenesis. *Nature*. 358(6388):678-681.
- 60 Portela V.M., Gonçalves P.B.D., Veiga A.M., Nicola E., Buratini Jr J. & Price C.A. 2008.** Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*. 149(10):5004-5011.
- 61 Powers C.J., McLeskey S. W. & Wellstein A. 2000.** Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*. 7(3):165-197.
- 62 Robinson L.L., Sznajder N.A., Riley S.C. & Anderson R.A. 2001.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Molecular Human Reproduction*. 7(7):641-648.
- 63 Schams D., Steinberg V., Steffl M., Meyer H.H.D. & Berisha B. 2009.** Expression and possible role of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles during final maturation. *Reproduction*. 138(1):141-149.
- 64 Schlessinger J., Plotnikov A.N., Ibrahimi O.A., Eliseenkova A.V., Yeh B.K., Yayon A., Linhardt R.J. & Mohammadi M. 2000.** Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell*. 6(3):743-750.
- 65 Sleeman M., Fraser J., Mcdonald M., Yuan S., White D., Grandison P., Kumble K., Watson J.D. & Murison J.G. 2001.** Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. *Gene*. 271(2):171-82.
- 66 Spicer L.J. & Stewart R.E. 1996.** Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biology of Reproduction*. 54(1):255-263.
- 67 Taniguchi F., Harada T., Iwabe T., Ohama Y., Takenaka Y. & Terakawa N. 2008.** Aberrant expression of keratinocyte growth factor receptor in ovarian surface epithelial cells of endometrioma. *Fertility and Sterility*. 89(2):478-80.
- 68 Trueb B. & Taeschler S. 2006.** Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. *Molecular Endocrinology*. 17(4):617-620.
- 69 Turner N. & Grose R. 2010.** Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 10(2):116-129.
- 70 Wymann M.P., Zvelebil M. & Laffargue M. 2003.** PI3K signaling – which way to target? *Trends in Pharmacological Sciences*. 24(7):366-376.

- 71 Yamasaki M., Miyake A., Tagashira S. & Itoh N. 1996.** Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27):15918-15921.
- 72 Zhang K., Hansen P.J. & Ealy A.D. 2010.** Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. *Reproduction*. 140(6):815-826.
- 73 Zhang X., Ibrahimi O.A., Olsen S.K., Umemori H., Mohammadi M. & Ornitz D.M. 2006.** Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(23):15694-15700.

**Implicações da insulina na função ovariana e desenvolvimento embrionário**

*(Implications of insulin in ovarian function and embryonic development)*

**Periódico:** *Acta Veterinária Brasílica*, 5(2): 136-146, 2011.

## **Resumo**

A insulina é um hormônio essencialmente envolvido na regulação da concentração da glicose na circulação, além de atuar no crescimento celular e no desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo o ovário. Em geral, os efeitos desse hormônio nas células ovarianas de mamíferos são positivos, estimulando nas células da granulosa a sua proliferação, a atividade da aromatase e a produção de esteroides, além de ser um fator regulador da maturação oocitária. Assim, este artigo tem como objetivo relatar os principais efeitos biológicos da insulina na reprodução de fêmeas. Ao longo deste trabalho, foram mostrados aspectos relacionados à estrutura e ação da insulina e seu receptor, presença da insulina e seu receptor no ovário e o papel deste hormônio na reprodução de fêmeas. A insulina é um hormônio de caráter anabólico, produzido pelas células  $\beta$  pancreáticas. A sua ação na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. No ambiente ovariano, a insulina é um importante modulador do desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, hormônios metabólicos, como a insulina, regulam o desenvolvimento folicular modulando o recrutamento, o desenvolvimento e a maturação folicular. Apesar dos grandes avanços científicos ocorridos sobre os mecanismos de ação da insulina, ainda verifica-se a necessidade de mais estudos com a finalidade de explicar melhor seus efeitos na foliculogênese em mamíferos, bem como a influência desses efeitos na posterior maturação dos oócitos crescidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** Embrião, folículo ovariano, oócito, receptor.

# IMPLICAÇÕES DA INSULINA NA FUNÇÃO OVARIANA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

*(Implications of insulin in ovarian function and embryonic development)*

Roberta Nogueira Chaves<sup>\*</sup>, Márcia Viviane Alves Saraiva, Anelise Maria Costa Vasconcelos  
Alves, José Ricardo de Figueiredo

Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus Itaperi, Fortaleza, 60740-903, CE, Brazil.

## ABSTRACT

Insulin is a hormone essentially involved in the blood glucose level regulation, besides it acts on cell growth and development of a several variety of cell types, including the ovarian cells. In general, the effects of this hormone in ovarian cells of mammals are positive, it stimulates in granulosa cells proliferation, aromatase activity and steroid production, also it is a factor that regulates the oocyte maturation. Therefore, this review described the main biological effects of insulin in female mammalian reproduction, with emphasis on ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and embryonic development. This paper shows the structure and action aspects of insulin and its receptor, the presence of insulin and its receptor in the ovary and the role of this hormone in female reproduction. Insulin is an anabolic hormone produced by pancreatic  $\beta$  cells. Its action starts in the cell by binding to the in cell plasma membrane receptor. In the ovarian environment, insulin is an important modulator of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and subsequent embryonic development. Thus, metabolic hormones such as insulin regulate the follicular development by modulating the follicular recruitment, development and maturation. Despite significant scientific advances that have occurred on the mechanisms of insulin action, there is yet to be better explained its effects on folliculogenesis in mammals, as well as the influence of these effects in the subsequent maturation of oocytes grown *in vitro*.

**Keywords:** Embryo, oocyte, ovarian follicle, receptor

## INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio essencialmente envolvido na regulação da concentração da glicose na circulação, além de estar envolvido no crescimento celular e no desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos celulares (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). Mais de trinta anos após a determinação da sequência de aminoácidos da insulina, em 1955, sugeriu-se o envolvimento dessa substância como reguladora da atividade ovariana (Ponchirolli, 2003). O interesse por estudos relacionados à atuação da insulina na função ovariana iniciou de fato com observações de mulheres com hiperandrogenismo com extrema resistência à insulina (Nandi et al., 2010), e a partir destas observações foi levantada a hipótese de que altos níveis de insulina circulante podem causar excessiva produção de andrógenos em pacientes (Taylor et al., 1982). No entanto, somente em 1982 a presença de insulina no ovário foi relatada pela primeira vez em porcas (Ponchirolli, 2003).

Desta forma, um grande progresso nesta área de pesquisa vem sendo alcançado nas últimas décadas, pois houve um aumento significativo nos trabalhos que resultaram em acúmulo de informações sobre o papel da insulina no ovário a nível molecular, celular e clínico, tanto em condições normais como patológicas (Poretsky et al., 1999). Em geral, os efeitos desse hormônio nas células ovarianas de mamíferos são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa, a atividade da aromatase e a produção de esteroides, além de ser um fator regulador da maturação oocitária (Duleba et al., 1997).

A presente revisão tem como objetivo descrever a caracterização estrutural da insulina e os principais efeitos biológicos desse hormônio na reprodução de fêmeas mamíferas, com ênfase na foliculogênese ovariana, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário.

## ESTRUTURA E AÇÃO DA INSULINA E SEU RECEPTOR

A insulina é um hormônio de caráter anabólico, produzido pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas, em resposta aos níveis plasmáticos de nutrientes, especialmente a glicose (Shuldiner et al., 1998). Esse hormônio também é secretado em proporção direta ao grau de adiposidade, e em condições normais se liga a receptores inseridos na membrana das células insulino-dependentes. Além de atuar no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade (Volp et al., 2008). A insulina pode ainda atuar sobre uma grande variedade de tecidos corporais, tais como fígado, músculos, glândulas mamárias e ovário (Sasaki et al., 2002).

A insulina humana está localizada no cromossomo 11 (Dumonteil & Philippe, 1996) e codifica a pré-proinsulina, um polipeptídeo de cadeia simples, precursor da insulina (Shuldiner et al., 1998). A pré-proinsulina é proteoliticamente convertida à pró-insulina, a qual consiste de uma cadeia A, uma cadeia B e um peptídeo C. A pró-insulina é homóloga aos fatores de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF-I e IGF-II), podendo estes se ligarem aos receptores de insulina com aproximadamente 10% de afinidade da insulina. Desta forma, a insulina pode atuar por meio dos receptores específicos de insulina, que estão amplamente distribuídos nos ovários, pelos receptores do IGF-I ou ainda por receptores híbridos, que contêm combinação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  dos receptores de insulina e IGF-I (Yarak et al., 2005). A insulina é produzida após a clivagem do peptídeo-C, a partir da pró-insulina, por endopeptidases ativas provenientes do complexo de Golgi e dos grânulos secretórios. As endopeptidases clivam preferencialmente o peptídeo-C/junções de cadeia B, entre Arg31 e Arg32 (endopeptidase tipo I), ou peptídeo-C/junções de cadeia A entre Lys64 e Arg65 (endopeptidase tipo II). A molécula de insulina resultante consiste então de uma cadeia A (contendo 21 aminoácidos) e uma cadeia B (contendo 30 aminoácidos), com três pontes dissulfídicas: duas entre as cadeias A e B (A7-B7 e A20-B12) e uma com a cadeia A (A6-A11) (Figura 1; Poretzky et al., 1999).

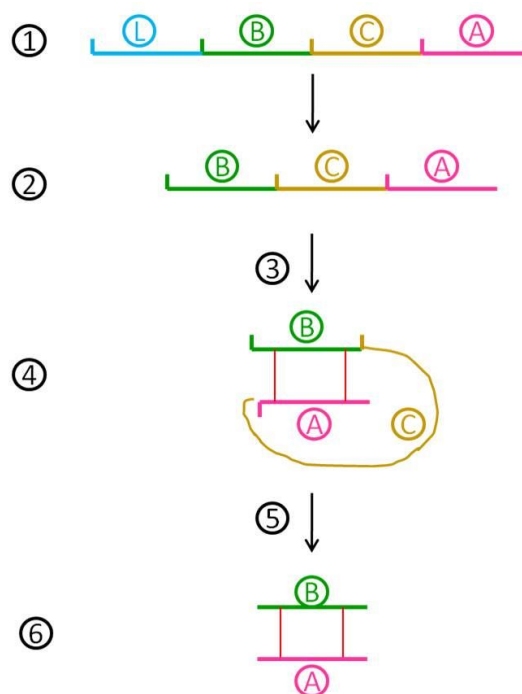


Figura 1 - Esquema da síntese da insulina onde 1. Pré-proinsulina (Líder, cadeia B, cadeia C, cadeia A); 2. Pró-insulina consiste em BCA, sem L; 3. Dobra espontânea; 4. As cadeias A e B ligadas por enxofre; 5. A cadeia C é clivada; 6. Molécula de insulina final.

O receptor de insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina-quinase intrínseca (Carvalho et al., 2002). O gene para o receptor de insulina está localizado em uma curta região do cromossomo 19 (Seino et al., 1990), contém 22 exons, possui mais que 150 kB de comprimento e codifica o pró-receptor, um polipeptídeo de cadeia simples com massa molecular de 190 kDa, que também contém uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ . Este receptor específico de membrana é uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  (massa molecular 135 kDa) e duas subunidades  $\beta$  (massa molecular 95 kDa) unidas por uma ponte dissulfídica (Lawrence et al., 2007), que atua como uma enzima alostérica. A forma heterotetramérica madura ( $\alpha_2\beta_2$ ) dos receptores resulta de dimerizações e muitos processos pós-translacionais, incluindo clivagem proteolítica. A subunidade  $\alpha$  dos receptores de insulina são estruturas extracelulares que possuem domínio rico em cisteína que serve como sítio para ligação da insulina. Já a subunidade  $\beta$  do receptor possui um domínio transmembranário e um intracelular, o qual é responsável pela transmissão do sinal, contém um sítio de ligação ATP e vários sítios tirosina de autofosforilação (Belfiore et al., 2009).

A subunidade  $\alpha$  inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1/-2: Insulin receptor substrate-1/-2), que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (Lawrence et al., 2007). Uma vez fosforilado, o IRS-1/-2 interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de fosforilação e desfosforilação (Cheatham & Kahn, 1996). Em adição a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) também é fosforilada após a ligação da insulina ao seu receptor (Cheatham & Kahn, 1996; White, 1996). A ativação do MAPK é responsável pelos efeitos no crescimento promovidos pela insulina (Lawrence et al., 2007). O MAPK pode ser ativado não apenas pelo receptor de insulina, mas também por outros receptores tirosina-quinase, tais como receptores de IGF-I, receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF), receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), bem como receptores ligados a proteína G (Lawrence et al., 2007; Suga et al., 1997). A ligação molecular entre a cascata do MAPK e o receptor de insulina pode ser mediada pelo fator p21 Ras, uma proteína altamente conservada envolvida no crescimento celular que pode ser um elemento crítico na ação do receptor de insulina tirosina-quinase e dos receptores de uma série de fatores de crescimento (Lawrence et al., 2007; Cheatham & Kahn, 1996; White, 1996).



Acredita-se que a ativação da tirosina-quinase seja o principal mecanismo de sinalização dos receptores de insulina (Belfiore et al., 2009) e parece ser o evento pós ligação hormônio/receptor responsável por quase todos os efeitos da insulina nos tecidos (Cama et al., 1991). No entanto, uma via alternativa para os receptores de insulina tem sido descrita na literatura. Tal via envolve a geração de inositolglicano como segundo mensageiro, após a ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  de seu receptor na membrana plasmática, sendo este evento, independente da ativação da tirosina-quinase na subunidade  $\beta$  (Figura 2). Esta via de sinalização alternativa para os receptores de insulina pode mediar alguns efeitos da insulina, incluindo a estimulação da esteroidogênese no ovário (Nestler et al., 1998), mas o papel deste sistema na propagação dos sinais de insulina para o transporte de glicose e outros dos seus efeitos ainda não está completamente estabelecido.

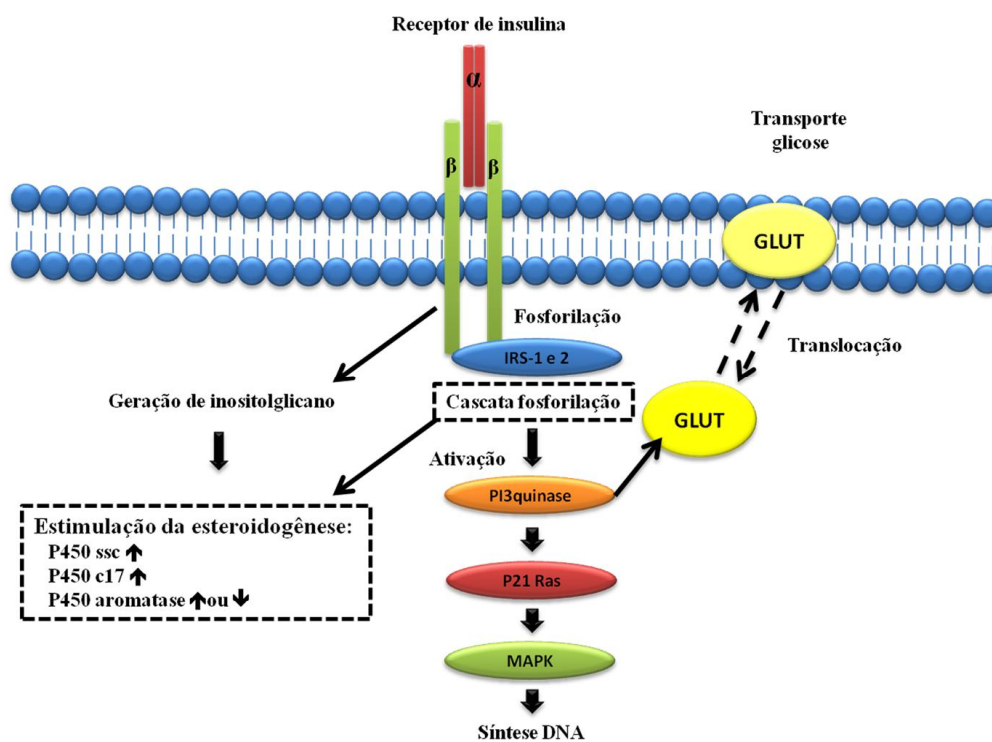


Figura 2 - Receptor de insulina, sua via de sinalização para o transporte de glicose e mecanismo hipotético de estimulação ou inibição da esteroidogênese. Após a ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  de seu receptor, a subunidade  $\beta$  tirosina-quinase é ativada e então os IRS-1 e -2 são fosforilados. A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose é ativada, os transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT) são translocados para a membrana e a captação da glicose é estimulada. Um sistema de sinalização alternativo pode envolver a geração de inositolglicano na membrana da célula após a ligação da insulina ao seu receptor. Esse

sistema de sinalização inositolglicano pode mediar a modulação da insulina nas enzimas esteroidogênicas como P450 scc, P450 c17 ou P450 aromatase.

### PRESENÇA DA INSULINA E SEU RECEPTOR NO OVÁRIO MAMÍFERO

No ambiente ovariano, a insulina é um importante modulador do desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (Yaseen et al., 2001). A insulina também leva a um aumento no número de folículos primários e uma menor taxa de atresia folicular, e conseqüentemente, aumento da taxa de ovulação (Almeida et al., 2001).

O efeito direto da insulina no ovário pode ser comprovado pela presença de seus receptores. Tanto em modelos humanos (Figura 3), como animais, os receptores de insulina são amplamente distribuídos em todos os compartimentos ovarianos, incluindo células da granulosa, células da teca, estroma e oócito (Myers et al. 1991; Sirotkin et al., 1998; Louhio et al., 2000). A concentração de insulina no fluido folicular proveniente da circulação foi constante em todos os estágios de desenvolvimento folicular em ovário bovino. No entanto, a expressão de RNAm para receptor de insulina nas células da granulosa e teca de folículos pré-ovulatórios foi maior que em todos os outros estágios de desenvolvimento (Shimizu et al., 2008).

	Receptor de insulina
<b>Antrais iniciais (3-5 mm)</b>	
Oócito	+2
Granulosa	+1
Teca	+1
<b>Antrais tardios (7-20mm)</b>	
Oócito	+2
Granulosa	+2
Teca	+2
<b>Corpos lúteos</b>	
Granulosa	+2
Teca	-

Figura 3 - Expressão de receptores de insulina em ovários humanos após a realização da técnica de hibridização *in situ*. Os dados são mostrados como marcação positiva moderada (+2) e positiva fraca (+1). Adaptado de Poretsky et al. (1999). Dados pertencentes a El-Roeiy et al. (1993) e Samoto et al. (1993).

A insulina atua na reprodução por regular a síntese de neurotransmissores de GnRH e, conseqüentemente, controlar a secreção das gonadotrofinas, principalmente na liberação de LH pela hipófise, juntamente aos IGF-I e IGF-II, cujos receptores estão presentes nas células foliculares (granulosa e teca; Kawauchi et al., 2006). A ligação da insulina ao seu receptor resulta em uma série de efeitos metabólicos, sendo o mais importante à estimulação do transporte de glicose para o interior das células, utilizado como a principal fonte energética para o ovário (Souza et al., 2009).

Estudos mostram que a insulina possui ação direta no ovário. A incapacidade do folículo em responder ao aumento na frequência de pulsos de LH pode ser devido à menor capacidade de reposta pelos receptores de LH nas células da granulosa, que são dependentes da ação combinada de FSH e de  $17\beta$  estradiol. Por sua vez, o  $17\beta$  estradiol folicular depende da produção de andrógenos nas células da teca, que é estimulada pelo LH, e cuja resposta parece ser aumentada pela insulina e pelo IGF-I (Stewart et al., 1995). Assim, as baixas concentrações plasmáticas de insulina, em animais submetidos à restrição alimentar crônica, podem reduzir a produção de andrógenos e estrógenos e, assim, comprometer a habilidade dos folículos em produzirem receptores para LH (Diskin et al., 2003). Além dessa ação direta, o efeito da insulina pode ser exercido indiretamente sobre o ovário pela elevação das concentrações de hormônio do crescimento (Kawauchi et al., 2006).

## **PAPEL DA INSULINA NA FUNÇÃO OVARIANA**

### **Foliculogênese**

O desenvolvimento e crescimento folicular são controlados por gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH) e por fatores locais, como hormônios esteroides e fatores de crescimento. No entanto, os fatores endócrinos relacionados com o metabolismo, como a insulina e hormônio do crescimento também são cruciais para o desenvolvimento folicular em ovário mamífero (Shimizu et al., 2008). Na foliculogênese inicial, a insulina tem ação na manutenção da viabilidade e crescimento dos folículos primordiais e primários, e em baixas concentrações pode aumentar os índices de formação de folículos primários (Louhio et al., 2000). Este efeito pode ser devido ao papel da insulina em estimular o fator inibidor de leucemia e Kit Ligand podendo, portanto, ser um corregulador no padrão de sinalização controlando a transição de folículos primordiais para primários (Van den Hurk & Zhao, 2005). Confirmando a atuação da insulina nesta transição, estudos *in vitro* têm mostrado que este

hormônio estimulou a formação de folículos primários em tecido ovariano cultivado em diferentes espécies como humanos (Louhio et al., 2000), bovinos (Yang & Fortune, 2002) e murinos neonatais (Kezele et al., 2002).

O papel da insulina no crescimento folicular tem sido mostrado em células da granulosa humanas cultivadas *in vitro*, as quais respondem a esse hormônio por aumento na produção de estrógeno e progesterona (Willis et al., 1996), ocasionando proliferação celular na granulosa em ratos (Peluso et al., 1991) e nas células da teca e em células ovarianas em hamster (Duleba et al., 1997; Li et al., 1997). Em bovinos, concentrações fisiológicas (10 ng/mL) ou próximas à fisiológica (20 ng/mL) de insulina estimularam o crescimento folicular e oocitário em folículos pré-antrais isolados e induziram uma alta porcentagem de formação de antro (> 60%) após 13 dias de cultivo (McLaughlin et al., 2010; Itoh et al., 2002). Similarmente em ovinos, a insulina (10 ng/mL) suportou o desenvolvimento dos folículos secundários (Arunakumari et al., 2010). Em caprinos, cultivo com folículos pré-antrais inseridos em fragmentos ovarianos ou isolados mecanicamente apresentaram maior crescimento e sobrevivência com a utilização de insulina a 10 ng/mL (Chaves et al., dados não publicados). Jewgenow et al. (1998) mostraram também que a adição, ao meio de cultivo, de insulina como componente do ITS (Insulina-Transferrina-Selênio), bem como de outras substâncias como piruvato, glutamina e hipoxantina é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*. Recentes estudos em bovinos revelaram que a utilização de ITS como componente do meio de base apresenta ativação no segundo dia de cultivo, enquanto que meios sem insulina, os folículos permaneceram no estágio primordial por 10 dias de cultivo, implicando que a insulina age como ativador de folículos primordiais em bovinos (Smitz et al., 2010).

Em espécies domésticas, tem sido verificado que a administração da insulina em diferentes fases reprodutivas, como moduladora das funções reprodutivas, aumentou os níveis intrafoliculares e periféricos de fatores de crescimento, tais como o IGF-I. Além disso, em suínos e bovinos, a insulina aumenta o recrutamento de folículos responsivos as gonadotrofinas, reduz a atresia folicular e atua como um sinal metabólico, influenciando a liberação de LH pela hipófise (Monget et al., 1997).

*In vivo*, as populações de folículos ovarianos de ruminantes são muito sensíveis à manipulação nutricional, podendo esta ferramenta ser utilizada a fim de incrementar prontamente a foliculogênese e a taxa de ovulação (Scaramuzzi et al., 2006). As concentrações plasmáticas de insulina foram positivamente correlacionadas com a energia da dieta e foi proposto que este hormônio é um fator chave que modula os efeitos da nutrição sobre a função ovariana. Tal fato é explicado pelas observações que as células da granulosa do folículo bovino

são dependentes de concentrações fisiológicas de insulina e que a infusão de insulina em novilhas de corte aumenta o diâmetro de folículos dominantes (Glister et al., 2001). Beam & Butler (1997) observaram que falhas na ovulação durante a primeira onda folicular em vacas foram associadas às baixas concentrações de insulina, sugerindo que a baixa fertilidade pode estar associada a este hormônio. Em ovinos, verificou-se uma redução nos níveis de insulina no fluido folicular à medida que os folículos cresciam, especialmente nos maiores, mais próximos do tamanho pré-ovulatório (Souza et al., 2009).

A insulina tem efeito direto em células ovarianas cultivadas, exercendo uma ação específica em células da granulosa não luteinizadas através do aumento da estimulação do FSH para produção de estrógeno e progesterona (Bhatia et al., 2001). De fato, estudos *in vitro* têm demonstrado que esse hormônio age como um potente estimulador da diferenciação e estereoidogênese folicular (Diskin et al., 2003). A insulina e LH sistêmicos estimulam a formação de andrógenos tecais em folículos secundários que induzem a formação de receptores para FSH na granulosa (Van den Hurk & Zhao, 2005).

Um aumento no suprimento sanguíneo para folículos antrais dominantes pode maximizar a oferta de LH e FSH. Além das gonadotrofinas e fatores de crescimento, outros componentes de suprimento sistemático, como a insulina, pode influenciar a proliferação e/ou diferenciação das células da granulosa e teca e assim afetar o destino de um folículo antral (VAN DEN HURK & Zhao, 2005).

Recentemente, estudos revelaram que em ovinos, modificações no fornecimento de glicose mediado pela insulina nas células da teca e da granulosa, modulam a função folicular, pois o transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) está presente nestas células (Somchit et al., 2007). Além disso, o *status* de desenvolvimento folicular no momento em que há concentrações máximas de glicose e insulina pode ser um dos fatores que determinam a eficiência da taxa de ovulação (Viñoles et al., 2005), uma vez que o aumento no fornecimento de glicose mediado pela insulina nas células foliculares é crítico para o crescimento folicular e prevenção de atresia, o que eleva o *pool* de folículos pré-ovulatórios (Somchit et al., 2007). Outros estudos têm sugerido ainda que a insulina pode afetar o reinício dos pulsos de LH em animais submetidos a períodos de subnutrição, por modificações na utilização de combustíveis metabólicos oxidáveis (Szymanski et al., 2007).

Altas concentrações de insulina em novilhas não lactantes foram associadas com um número aumentado de pequenos folículos (<4 mm) (Gong et al., 1997). Além disso, esse hormônio induziu uma secreção de estradiol progressivamente em folículos após formação de antro (Itoh et al., 2002). Segundo Zhang et al. (2010) uma contínua exposição dos ovários

murinos a níveis elevados de insulina *in vitro* afeta a formação do folículo e capacidade de desenvolvimento.

Dessa forma, a insulina pode atuar tanto no controle dos estágios do desenvolvimento folicular independentes de gonadotrofinas, quanto em sinergia com gonadotrofinas para modular o recrutamento folicular, maturação de folículos pré-ovulatórios e o desenvolvimento embrionário.

### **Maturação oocitária**

O papel da insulina na maturação oocitária tem sido descrita (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). Tsafiriri & Channing (1975) demonstraram que a insulina estimula a progressão nuclear de oócitos de porcas além da metáfase I e extrusão do primeiro corpúsculo polar. Subsequentemente, Lessman & Schuetz (1981) reportaram que esse hormônio facilita a quebra da vesícula germinativa em rãs leopardo (*Rana pipiens*), além de induzir a maturação meiótica em oócitos de rãs *Xenopus laevis* (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). No entanto, alguns estudos demonstram que oócitos mamíferos ou folículos em crescimento na presença prolongada de altas doses de insulina tem um impacto negativo na competência de desenvolvimento oocitária, definida como a habilidade do oócito em suportar o desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto e/ou gestação normal estabelecida. Entretanto, esse mecanismo ainda é desconhecido (Acevedo et al., 2007).

Vários estudos mostram que a presença de insulina como insulina-transferrina-selênio (ITS; a uma concentração de 10 µg/mL) tem permitido o crescimento folicular e maturação de oócitos *in vitro* em diversas espécies (hamster: Roy (1993); humanos: Willis et al. (1996); bovinos: Coelho et al. (1998); búfalos: Raghu et al. (2002); caprinos: Zhou e Zhang (2005); suínos: Jeong et al. (2008); marsupiais: Nation & Selwood (2009); ovinos: Arunakumari et al. (2010)). Recentemente, Xu et al. (2010) confirmaram que insulina associada ao FSH promove a sobrevivência e crescimento de folículos secundários isolados em macacas *Rhesus*, além de fornecer um maior número de oócitos saudáveis e maturados *in vitro*. No entanto, quando ovários de camundongos fêmeas foram cultivados na presença de 5 µg/mL de insulina foi demonstrado um profundo efeito negativo na oogênese e foliculogênese *in vitro*, devido a um retardo no crescimento oocitário (Sun et al., 2010).

Administração exógena de insulina por meio da alimentação tem mostrado afetar não somente o crescimento folicular, mas também a qualidade do oócito. Mudanças na ingestão de alimentos energéticos são capazes de influenciar negativamente a morfologia e a competência

de oócitos (Boland et al., 2001). A exposição de oócitos de camundongos fêmeas a condições de diabetes durante a foliculogênese tem um efeito negativo na maturação meiótica, devido a um decréscimo na comunicação entre os compartimentos das células somáticas e célula germinal (Colton et al., 2003).

A adição da insulina ao meio de maturação acelera a progressão meiótica e exerce um efeito positivo nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário (Augustin et al., 2003). Além disso, a insulina exerce uma atividade mitogênica e anti-apoptótica em folículos antrais cultivados *in vitro* (Leroith et al., 1995). Segundo Stefanello et al. (2006), os folículos cultivados na presença da insulina têm efeito positivo sobre a estrutura do oócito e parece promover a maturação citoplasmática.

Modelos em camundongos de hipoinsulinemia e hiperglicemia materna na produção de oócitos e folículos ovarianos de menores tamanhos, reduziu o percentual de quebra da vesícula germinativa e um aumento na ocorrência de apoptose (Chang et al., 2005). No entanto, ainda há um número limitado de estudos sobre os efeitos da insulina na maturação oocitária e desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006).

### **EFEITO DA INSULINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

A regulação do desenvolvimento e crescimento embrionários tem sido tradicionalmente atribuída à insulina e aos IGFs (Sasaki et al., 2002). Como um potente hormônio anabólico em células diferenciadas, a insulina estimula o transporte de glicose e aminoácidos e a síntese de RNA, proteínas e glicogênio (Summers et al., 1999). Experimentos realizados *in vivo* demonstraram que a insulina melhora a taxa de desenvolvimento embrionário e a taxa de gestação em animais diabéticos, resgatando os embriões dos efeitos prejudiciais da hiperglicemia materna (De Hertogh et al., 1992). Além disso, estudos com embriões em fase de pré-implantação constataram que o desenvolvimento embrionário é melhorado após suplementação do meio de cultivo com insulina e IGF-I (Spanos et al., 2000). Em vacas, RNAm que codifica o receptor para insulina tem sido detectado em todos os estágios embrionários de zigoto a blastocisto (Schultz et al., 1992).

Em camundongos, receptores funcionais para insulina são expressos a partir do estágio pré-implantacional de oito células, mais especificamente durante a compactação (Smith et al., 1993). A partir desse último estágio, que marca o início da diferenciação embrionária levando à formação do blastocisto, muitos parâmetros da fisiologia embrionária podem ser regulados por insulina exógena (Kaye et al., 1997). Em bovinos, a insulina estimula o desenvolvimento de

embriões com oito células até o estágio de blastocisto eclodido e durante os estágios de mórula e blastocisto estimula a síntese de RNA e DNA (Paria et al., 1990).

Nesse contexto, sabe-se que embriões em estágio de pré-implantação não sintetizam insulina ou seu RNAm específico (Kaye, 1997), mas têm acesso à insulina materna *in vivo* via oviduto e fluidos uterinos (Taniguchi et al., 2006). Deste modo, em condições *in vitro*, embriões em estágios iniciais são privados de tal hormônio materno, sofrendo um retardo no seu desenvolvimento morfológico e na sua proliferação celular durante a embriogênese pré-implantacional (Gardner et al., 1991). Assim, é possível constatar a importância da adição de insulina exógena para o sucesso do cultivo *in vitro* de embriões.

Estudos têm relatado que a adição de níveis fisiológicos de insulina durante o cultivo *in vitro*, além de resultar em uma redução da apoptose (Augustin et al., 2003), promove um aumento da proliferação celular em blastocistos de humanos, camundongos, coelhos e bovinos (Herrler et al., 1998; Makarevich et al., 2002; Augustin et al., 2003). Além disso, outros trabalhos demonstraram que, em bovinos e murinos, a adição exógena de insulina em embriões promove um aumento no número de células, especificamente na massa celular interna (MCI) de blastocistos em desenvolvimento (Sirisathien et al., 2003).

De acordo com Harvey & Kaye (1990), a insulina aumenta as taxas de compactação e formação de blastocistos *in vitro*, sendo os blastocistos resultantes dotados de 25% a mais de células, sendo todas localizadas na MCI. Considerando que a proporção de células presentes na MCI é um fator determinante para o crescimento fetal, o acesso do embrião à insulina materna durante a pré-implantação é requerido para a obtenção de um crescimento fetal ótimo.

Matsui et al. (1997) reportaram que a insulina em concentrações de 0,5–10 µg/mL tem um efeito benéfico na taxa de desenvolvimento para o estágio de mórula no dia 5 do cultivo embrionário e que essa estimulação do desenvolvimento embrionário foi mediada através do receptor para IGF-I. Entretanto, esses autores não reportaram a progressão do desenvolvimento para o estágio de blastocisto.

## CONCLUSÕES

A função ovariana é controlada, primariamente, pela interação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Contudo, há hormônios envolvidos nos processos metabólicos, como a insulina que regulam o desenvolvimento folicular modulando o recrutamento, o desenvolvimento e a maturação folicular. Além disso, é possível verificar que a insulina e os



fatores de crescimento semelhantes à insulina fornecem também um importante suporte ao crescimento e desenvolvimento embrionário.

Apesar dos grandes avanços científicos ocorridos sobre os mecanismos de ação da insulina, ainda verifica-se a necessidade de mais estudos com a finalidade de explicar melhor seus efeitos na foliculogênese inicial e final em mamíferos, bem como a influência desses efeitos na posterior maturação dos oócitos crescidos *in vitro*. Desta forma, futuras pesquisas deveriam focar no estudo dos mediadores hormonais que influenciam esse microambiente ovariano.

## REFERÊNCIAS

- Acevedo N., Ding J. & Smith G.D. 2007. Insulin Signaling in Mouse Oocytes. *Biol. Reprod.* 77(5):872-879.
- Almeida F.R.C.L., Mao J., Novack S., Cosgrove J.R. & Foxcroft G.R. 2001. Effects of different patterns of feed restriction and insulin treatment during the luteal phase on reproductive, metabolic and endocrine parameters in cyclic gilts. *J. Anim. Sci.* 799(1):200-212.
- Arunakumari G., Shanmugasundaram N. & Rao V.H. 2010. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, in press.
- Augustin R., Pocar P., Wrenzycki C., Niemann H. & Fischer B. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction.* 126(1):91-99.
- Beam S.W. & Butler W.R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56(1):133-142.
- Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L. & Vigneri R. 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrinol. Rev.* 30:586-623.
- Bhatia B. & Price C.A. 2001. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells *in vitro*. *Steroid.* 66(6):511-519.
- Boland M.P., Lonergan P. & Callaghan D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology.* 55(6):1323-1340.

- Cama A., Sierra M.L., Ottini L., Kadowaki T., Gorden, P., Imperato – McGinley J. & Taylor S.I. 1991. A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73(4):894-901.
- Carvalho J.B.C., Zecchin H.G. & Saad M.J.A. 2002. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46(4):419-425.
- Chang A.S., Dale A.N. & Moley K.H. 2005. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*.146(5):2445-2453.
- Cheatham B. & Kahn C.R. 1996. The biochemistry of insulin action. p. 139-147. In: LeRoith D., Taylor S.I. & Olefsky J.M. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Coelho L.A., Esper C.R., Garcia J.M., Vantini R., Silva Filho I.R. & Almeida Jr. I.L. 1998. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 35(3):120-122.
- Colton S.A., Humpherson P.G., Leese H.J. & Downs S.M. 2003. Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. *Biol. Reprod.* 69(3)761-770.
- De Hertogh R., Vanderheyden I., Pampfer S., Robin D. & Delcourt J. 1992. Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. *Diabetologia*. 35(5):406-408.
- Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F. & Sreenan J.M. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78(3-4)345-370.
- Duleba A.J., Spaczynski R.Z., Olive D.L. & Behrman H.R. 1997. Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod.* 56(4):891-897.
- Dumonteil E. & Philippe J. 1996. Insulin gene: organisation, expression and regulation. *Diab. Med.* 22(3):164-173.
- El-Roeiy A., Chen X., Roberts V.J., Leroith D., Roberts Jr. C.T. & Yen S.S. 1993. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(5):1411-1418.

- Fouladi-Nashta A.A. & Campbell K.H.S. 2006. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction*. 131(3):449-460.
- Gardner H.G. & Kaye P.L. 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod. Fertil. Develop.* 3(1):79-91.
- Glister C., Tannetta D.S., Groome N.P. & Knight P. 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 65(4):1020-1028.
- Gong J.G., Bramley T.A. & Webb R. 1993. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 97(1):247-254.
- Harvey M.B. & Kaye P.L. 1990. Insulin increases the cell number of inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocyst *in vitro*. *Development*. 110(3):963-967.
- Herrler A., Krusche C.A. & Beier H.M. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59(6):1302-1310.
- Itoh T., Kacchi M., Abe H., Sendai Y. & Hoshi H. 2002. Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium. *Biol. Reprod.* 67(4):1099-1105.
- Jeong Y.W., Hossein M.S., Bhandari D.P., Kim Y.W., Kim J.H. & Park S.W. 2008. Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 106(1-2):13-24.
- Jewgenow K., Penfold L.M., Meyer H.H.D. & Wildt D.E. 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 112(1):39-47.
- Kawauchi H. & Sower S.A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohipophysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148(1):3-14.
- Kaye P.L. & Harvey M.B. 1995. The role of growth factors in preimplantation development. *Progress Growth Fact. Res.* 6(1):1-24.
- Kaye P.L. 1997. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.* 2(2):121-127.

- Kezele P.R., Nilsson E.E. & Skinner M.K. 2002. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 192(1-2):37-43.
- Lawrence M.C., Mckern N.M. & Ward C.W. 2007. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:699–705.
- Leroith D., Werner H., Beitner-Johnson D. & Roberts Jr. C.T. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endoc. Rev.* 16(2):143-63.
- Lessman C.A. & Schuetz A.W. 1981. Role of follicle wall in meiosis reinitiation induced by insulin in *Rana pipiens* oocytes. *Am. J. Phys.* 241(1):51-56.
- Li J.S., Ito Y., Zheng J. & Imanishi Y. 1997. Enhancement of artificial juxtacrine stimulation of insulin by co-immobilization with adhesion factors. *J. Biomed. Mat. Res.* 37(2):190–197.
- Louhio H., Hovatta O., Sjoberg J. & Tuuri T. 2000. The effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol. Hum. Reprod.* 6(8):694-698.
- Makarevich A.V. & Markkula M. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol. Reprod.* 66(2):386-392.
- Matsui M., Takahashi Y., Hishinuma A. & Kanagawa H. 1997. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology.* 48(4):605-616.
- McLaughlin M., Bromfield J.J., Albertini D.F. & Telfer E.E. 2010. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 16:644–653.
- Monget P. & Martin G.B. 1997. Involvement of insulin-like growth factor in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum. Reprod.* 12(1):33-52.
- Myers M.G., Backer J.M., Siddle K. & White M.F. 1991 The insulin receptor functions normally in Chinese hamster ovary cells after truncation of the C terminus. *J. Biol. Chem.* 266:10616–10623.
- Nandi A., Wang X., Accili D. & Wolgemuth D.J. 2010. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. *Endocrinology.* 151(4):1863-1871.
- Nation A. & Selwood L. 2009. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction.* 138(2):247-255.

Nestler J.E., Jakubowicz D.J., De Vargas A.F., Brik C., Quintero N. & Medina F. 1998. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(6):2001-2005.

Paria B.C. & Dey S.K. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Develop. Biol.* 87(12):4756-4760.

Peluso J.J., Delidow B.C., Lynch J. & White B.A. 1991. Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of 17 beta-estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology.* 128(1):191-196.

Ponchirolli C.B. 2003. Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular. In: SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2003, São Paulo. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2003, p. 12.

Poretsky L., Cataldo N.A., Rosenwaks Z. & Giudice L.C. 1999. The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease. *Endoc. Rev.* 20(4):535-582.

Raghu H.M., Nandi S. & Reddy S.M. 2002. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage *in vitro* in serum-free, semidefined media. *The Vet. Record.* 151(9):260-265.

Roy, S.K. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor: modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol. Reprod.* 48(3):552-557.

Saltiel A.R. 1991. Second messengers of insulin action. *Diabetes Care.* 13(3):244-256.

Samoto T., Maruo T., Ladines-Llave C.A., Matsuo H., Deguchi J., Barnea E.R. & Mochizuki M. 1993. Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endoc. J.* 40(6):715-726.

Sasaki, S. 2002. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim. Sci. J.* 73(9):423-433.

Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Munoz-Gutierrez M. & Somchit A. 2006. A review of the affects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nut. Develop.* 46(4):339-354.

Schultz G.A., Hogan A., Watson A.J., Smith R.M. & Taniguchi S. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Develop.* 4(4):361-371.

Seino S., Seino M. & Bell G.I. 1990. Human insulin-receptor gene. *Diabetes.* 39(2):129-133.

Shimizu T., Murayama C., Sudo N., Kawashima C., Masa Tetsuka M. & Miyamoto A. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim. Reprod. Sci.* 106(1-2):143-152.

Shuldiner A.R., Barbetti F., Raben N., Scavo L. & Serrano J. Insulin. In: Leroith, D. *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects.* CRC Press, Boca Raton, 1998, p. 181-219.

Sirisathien S., Hernandez-Fonseca H.J. & Brackett B.G. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 77(1-2):21-32.

Sirotkin A.V., Taradajnik T.E., Makarevich A.V. & Bulla J. 1998. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 51(4):333-344.

Smith R.M., Garside W.T., Aghayan M., Shi C.Z., Shah N., Jarett L. & Taniguchi S. 1993. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* 49(1):1-12.

Somchit A., Campbell B.K., Khalid M., Kendall N.R. & Scaramuzzi R.J. 2007. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology.* 68(7):1037-1046.

Souza F.A., Canisso I.F., Borges A.M., Vale Filho V.R., Lima A.L. & Silva E.C. 2009. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(2):61-65.

Spanos S., Becker D.L., Winston R.M. & Hardy K. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.* 63(5):1413-1420.

Stefanello J.R., Barreta M.H., Porciuncula P.M., Arruda J.N., Oliveira J.F., Oliveira M.A. & Gonçalves P.B. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology.* 66(9):2068-2076.

Stewart R.E., Spicer L.J., Hamilton T.D. & Keefer B.E. 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced

steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 73(12):3719-3731.

Suga J., Yoshimasa Y., Yamada K., Yamamoto Y., Inoue G., Okamoto M., Hayashi T., Shigemoto M., Kosaki A., Kuzuya H. & Nakao K. 1997. Differential activation of mitogen-activated protein kinase by insulin and epidermal growth factor in 3T3-L1 adipocytes: a possible involvement of PI3-kinase in the activation of the MAP kinase by insulin. *Diabetes.* 46(5):735-741.

Summers S.A., Yin V.P., Whiteman E.L., Garza L.A., Cho H., Tuttle R.L. & Birnbaum M.J. 1999. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. *Annals of the New York Acadm. Sci.* 892(892):169-186.

Sun L.L., Sun Z.Y., Zhang P., Zhai X.W., Tang J., Pan Q.J., Shi Q.H. & Shen W. 2010. Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system. *Reprod. BioMed. Online.* 20:11–25.

Smitz J., Dolmans M.M., Donnez J., Fortune J.E., Hovatta O., Jewgenow K., Picton H.M., Plancha C., Shea L.D., Stouffer R.L., Telfer E.E., Woodruff T.K. & Zelinski M.B. 2010. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum. Reprod. Update.* 16:395–414.

Szymanski L.A., Schneider J.E., Friedman M.I., Ji H., Kurose Y., Blache D., Rao A., Dunschea F.R. & Clarke I.J. 2007. Changes in insulin, glucose and ketone bodies, but not leptin or body fat content precede restoration of luteinizing hormone secretion in ewes. *J. Neuroendocrinol.* 19(6):449-460.

Taniguchi C.M., Emanuelli B. & Kahn C.R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:85–96.

Taylor S.I., Dons R.F., Hernandez E., Roth J. & Gorden P. 1982. Insulin resistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Annals Int. Med.* 97(6):851-855.

Tsafiriri A. & Channing C.P. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 43(1):149-152.

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.

Viñoles C., Forsberg M., Martin G.B., Cajarville C., Repetto J. & Meikle A. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction.* 129(3):299-309.

- Volp A.C.P., Rezende F.A.C. & Alfenas R.C.G. 2008. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Rev. Bras. Nut. Clín.* 23(2):158-64.
- White M.F. 1996. The role of IRS-1 during insulin signaling. In: LeRoith D., Taylor S.I., Olefsky J.M. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 154-160.
- Willis D., Mason H., Gilling-Smith C. & Franks S. 1996. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(1):302-309.
- Xu J., Bernuci M.P., Lawson M.S., Yeoman R.R., Fisher T.E., Zelinski-Wooten M.B. & Stouffer R.L. 2010. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young and older adult, rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional (3D) culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction*. in press.
- Yang M.Y. & Fortune J.E. 2002. Insulin and insulin-like growth factor I exert opposite effects on the activation of bovine primordial follicles *in vitro*. *Biol. Reprod.* 66(1):111.
- Yarak S., Bagatin E., Hassun K.M., Parada M.O.A.B. & Talarico Filho S. 2005. Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. *Anais Bras. Dermat.* 80(4):395-410.
- Yaseen M.A., Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J.W. & Niemann H. 2001. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. *Reproduction*. 122(4):601-610.
- Zhang P., Chao H., Sun X., Li L., Shi Q. & Shen W. 2010. Murine folliculogenesis *in vitro* is stage-specifically regulated by insulin via the Akt signaling pathway. *Histochem. Cell Biol.* 134:75-82.
- Zhou H. & Zhang Y. 2005. Impact of growth factors on *in vitro* development of caprine oocytes at preantral stage. *Reprod. Dom. Anim.* 40(2):161-65.



**Fator de Crescimento do Nervo promove a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos  
cultivados *in vitro***

*(Nerve Growth Factor Promotes the Survival of Goat Preantral Follicles Cultured in vitro)*

**Periódico:** *Cells Tissues Organs*, 192(4): 272-282, 2010.

## Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do fator de crescimento do nervo (NGF) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Fragmentos do córtex ovariano foram cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> suplementado com 0, 1, 10, 50, 100 ou 200 ng/mL de NGF por 1 ou 7 dias. Pequenos fragmentos de tecido ovariano não cultivado bem como daqueles cultivados por 1 ou 7 dias foram processados por histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que após 1 ou 7 dias de cultivo em todas as concentrações de NGF, exceto a 1 ng/mL após 1 dia de cultivo houve uma redução significativa no percentual de folículos normais quando comparado aos tecidos não cultivados. Em altas concentrações de NGF (100 e 200 ng/mL) após 7 dias de cultivo, houve uma redução significativa no percentual de folículos normais quando comparado aos tecidos cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho ou em outras concentrações de NGF. É importante notar que as análises ultraestruturais e de fluorescência confirmaram somente a integridade de folículos cultivados com 1 ng/mL de NGF após 7 dias. Em contraste aos tecidos não cultivados, o percentual de folículos em desenvolvimento foi significativamente maior em todas as concentrações de NGF após 1 ou 7 dias de cultivo. Observamos que o diâmetro folicular foi maior em 1 e 10 ng/mL de NGF por 7 dias que em outras concentrações, mas foi similar aos folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho. Em conclusão, o NGF promove a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* de maneira dose-dependente.

**Palavras-chave:** Caprino, folículos ovarianos, NGF, sobrevivência.

## **Nerve growth factor promotes the survival of goat preantral follicles cultured *in vitro***

NGF and goat preantral follicles

R.N. Chaves<sup>a\*</sup>, A.M.C.V. Alves<sup>a</sup>, A.B.G. Duarte<sup>a</sup>, V.R. Araújo<sup>a</sup>, J.J.H. Celestino<sup>a</sup>, M.H.T. Matos<sup>a</sup>, C.A.P. Lopes<sup>a</sup>, C.C. Campello<sup>a</sup>, K.P.O. Name<sup>b</sup>, S.N. Bão<sup>b</sup>, J.R. Figueiredo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Veterinary, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceara, Av. Paranjana 1700, Campus Itaperi, Fortaleza, 60740-903, CE, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasilia 70910-900, DF, Brazil.

\* Correspondence should be addressed to:

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 – Brazil. CEP: 60740-000

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rncvet@gmail.com (Roberta Nogueira Chaves)

**Key words:** Goat, ovarian follicles, NGF, survival.

## **Abstract**

The aim of this study was to investigate the effects of nerve growth factor (NGF) on the *in vitro* culture of goat preantral follicles. Ovarian cortex fragments were cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 0, 1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL NGF for 1 or 7 days. Small fragments of non-cultured ovarian tissue as well as those cultured for 1 or 7 days were processed for classical histology and transmission electron microscopy. The results showed that after 1 or 7 days of culture at all concentrations of NGF, except at 1 ng/mL after 1 day of culture, there was a significant reduction in the percentage of normal follicles as compared to non-cultured tissues. At higher NGF concentrations (100 and 200 ng/mL) after 7 days of culture, there was a significant reduction in the percentage of normal follicles as compared to tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or at the other concentrations of NGF. It is important to note that ultrastructural and fluorescent analyses confirmed only the integrity of follicles cultured with 1 ng/mL of NGF after 7 days. In contrast to non-cultured control tissues, the percentage of developing follicles was significantly increased at all concentrations of NGF after 1 or 7 days of culture. We observed that follicular diameter was higher at 1 and 10 ng/mL NGF for 7 days than at the other concentrations but was similar to follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone. In conclusion, NGF improved the survival of goat preantral follicles cultured *in vitro* in a dose-dependent manner.

## **Introduction**

Understanding the signals responsible for the initiation of folliculogenesis is an important step towards developing a successful *in vitro* system that promotes the growth and maturation of primordial follicles [ABIR et al., 1998]. However, follicular development is a complex process regulated by hormonal factors, the nervous system, and several paracrine and autocrine factors in the ovary [RICHARDS, 1994]. It is possible that various growth factors, such as nerve growth factor (NGF), may be involved in this process [VAN DEN HURK et al., 2000].

NGF is a polypeptide, member of the neurotrophin family, which is related to the transforming growth factor- $\beta$  superfamily [ANDERSON et al., 2002]. This growth factor plays a crucial role in the maintenance of the sympathetic and sensory nervous systems [LARA et al., 1991]. In addition to its actions on nerve growth, NGF plays important functions in the initiation and maintenance of inflammation in several organs. It has also been suggested that NGF takes part in the process of recovery after injury [HARSUM et al., 2001].

NGF is synthesized by and released from ovarian cells [LARA et al., 1990b] and therefore, can be considered a component of the intragonadal system of paracrine/autocrine regulators that influence ovarian function. NGF receptors are expressed by oogonia and oocytes of several species [mice: SPEARS et al., 2003; rats: DISSEN et al., 2001; rhesus monkeys: DEES et al., 1995; human fetuses: ANESETTI et al., 2001] as well as in theca cells of rat antral follicles [DISSEN et al., 1996a] and granulosa and theca cells of growing bovine follicles [DISSEN et al., 2000a]. The presence of NGF receptors in the ovary [DISSEN et al., 1991] and the loss of ovarian innervation resulting from the immunoneutralization of NGF actions [LARA et al., 1990a] indicate that NGF is one of the target-derived neurotrophins involved in the development and maintenance of ovarian innervation. Furthermore, NGF and its receptors, TrkA and p75, have an important role in sexual development in rats [LARA et al., 1990a] and early follicular development and ovulation in hamsters [SHI et al., 2004].

*In vitro* studies suggest that neurotrophins, such as NGF, are involved not only in ovarian innervation but also in follicular assembly and initiation of folliculogenesis in rats and mice [OJEDA et al., 2000]. In addition, mice carrying a null mutation of the NGF gene exhibit a reduction in the development of primary and secondary follicles [DISSEN et al., 2001]. Moreover, NGF can act as an intragonadal molecule, regulating the ovarian response to gonadotropins [ROMERO et al., 2002]. Furthermore, NGF can initiate the growth of human fetuses [ABIR et al., 2005] and of rat primordial ovarian follicles [ROMERO et al., 2002]. Although the influence of NGF on rat ovarian follicles has been studied, its effects on the follicular development of economically important domestic species, such as the goat, have not been investigated. Thus, the aim of the present study was to investigate whether NGF has a beneficial role on the *in vitro* survival, activation and growth of preantral follicles after culture of goat ovarian tissues.

## **Materials and Methods**

### *Source of ovaries*

Ovaries (n = 8) from 4 adult, non-pregnant, mixed-breed goats that were 1-3 years of age were collected from a local slaughterhouse. All animals were cyclic and in good body condition. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% ethanol for 10 seconds and then washed again in MEM supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported to the laboratory in MEM at 4 °C within 1 h

postmortem [CHAVES et al., 2008]. Unless otherwise mentioned, NGF and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

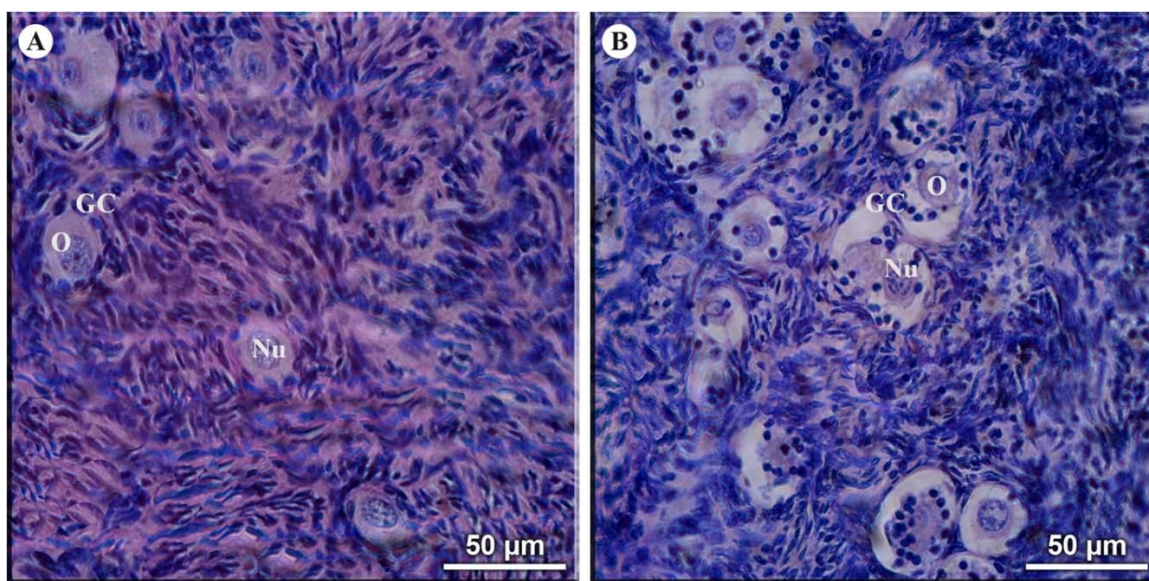
### *Experimental protocol*

In the laboratory, the ovaries were stripped of surrounding fat and fibrous tissue, and the ovarian cortex was recovered, placed in MEM supplemented with HEPES and divided into 13 pieces/ovary of approximately 3 mm x 3 mm (1 mm thick) in size using a needle and scalpel under sterile conditions. For each animal, one slice of tissue was randomly selected and immediately fixed for histological and ultrastructural analyses (fresh control - Day 0). The remaining slices of ovarian cortex were cultured individually in 1 mL of culture medium in 24-well tissue culture dishes and incubated at 39 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The basic control medium, hereafter referred to as  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, consisted of  $\alpha$ -MEM (pH 7.2 – 7.4) supplemented with ITS (insulin 10  $\mu$ g/mL, transferrin 5.5  $\mu$ g/mL and selenium 5 ng/mL), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, and 1.25 mg/mL BSA. The medium was supplemented with human recombinant NGF at different concentrations (0, 1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL). Ovarian slices from each animal were cultured for 1 or 7 days in media supplemented with different concentrations of NGF and each treatment was repeated four times. The culture media was stabilized at 39 °C for 1 h prior to use and was replenished every second day in the tissue cultures.

### *Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth*

Fresh control and cultured tissues were fixed in Carnoy for 12 h and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), the wax blocks containing the caprine tissues were completely and serially sectioned (7- $\mu$ m sections), mounted on individual glass slides and stained with Periodic Acid Schiff – hematoxylin (PAS staining system; Sigma). Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined using a Nikon microscope (Japan) under 400 $\times$  magnification. Care was taken to count each follicle only once as we have previously done in our earlier studies [MATOS et al., 2007]. Each follicle was examined in every section and matched with the same follicle on adjacent serial sections in order to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once regardless of its size.

The developmental stages of follicles have been defined previously [SILVA et al., 2004] as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or developing follicles. Developing follicles can be subdivided into intermediate (both flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte) and secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). In the current study, follicles were individually classified as histologically normal even when an intact oocyte was present, and the follicle was surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and had no pyknotic nucleus (Fig. 1A). Atretic (degenerated) follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane (Fig. 1B). Overall, 120 preantral follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per animal  $\times$  4 repetitions = 120 follicles). The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated on day 0 (fresh control) and after culture at each concentration of NGF.



**Fig. 1.** Histological sections of ovarian fragments after Periodic Acid Schiff- hematoxylin staining showing morphologically normal (A) and degenerated (B) follicles after culture with 10 ng/mL NGF after 7 days of culture. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell (Original magnification 400 $\times$ ). Scale bars represent 50  $\mu$ m.

To evaluate follicular activation and growth, only intact follicles with a visible oocyte nucleus were recorded, and the proportion of primordial and growing follicles were calculated at day 0 (fresh control) and after 1 or 7 days of culture in the various culture conditions tested. In addition, using only normal follicles, major and minor axes of each oocyte and follicle were

measured using a light microscope fitted with an eyepiece micrometer (Zeiss, Cologne, Germany) under 400× magnification. The average of these two measurements was used to determine the diameters of each oocyte and follicle.

#### *Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles*

For better evaluation of follicular morphology, ultrastructural studies were carried out on fragments of fresh control tissues and those tissues with the best results obtained from histological analysis after 7 days of culture. Briefly, 1-mm<sup>3</sup> pieces of goat ovarian tissues were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 4 h at room temperature. After fixation, fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated through an acetone gradient, and the tissues were embedded in Spurr's resin. For light microscopy studies, sections of 3-µm thickness were cut on an ultramicrotome (Reichert Supernova, Heidelberg, Germany) and stained with toluidine blue. Ultra-thin sections of 60–70 nm thickness were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron microscope (TEM). The density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, as well as vacuolization and basement membrane integrity, were evaluated.

#### *Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy*

Based on the results of the morphological and ultrastructural analyses, the viability of follicles cultured with the concentration of NGF which provided the best outcome was further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes. Additional pairs of goat ovaries (n = 2) were cut into fragments, one of which was immediately processed for follicle isolation.

Goat preantral follicles were isolated from ovarian fragments using the mechanical method described by Lucci et al. [1999]. Briefly, using a tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) adjusted for a sectioning interval of 75 µm, samples were cut into small pieces, placed in MEM, resuspended 40 times using a large Pasteur pipette (approximate diameter of 1600 µm) and resuspended again 40 times with a smaller Pasteur pipette (approximate of diameter 600 µm) in order to dissociate preantral follicles from stroma. The material obtained was passed through 100-µm nylon mesh filters, resulting in a



suspension containing preantral follicles of less than 100  $\mu\text{m}$  in diameter. This procedure was carried out at room temperature within a 10 min time frame.

Preantral follicles were analyzed using a two-color fluorescence cell viability assay based on the simultaneous detection of live and dead cells with calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively. While the first probe detects intracellular esterase activity in viable cells, the latter labels nucleic acids in non-viable cells with plasma membrane disruption. The test was performed by adding 4  $\mu\text{M}$  calcein-AM and 2  $\mu\text{M}$  ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) to a suspension of isolated follicles and incubating at 37 °C for 15 min. After being labeled, follicles were washed once by centrifugation at 100 $\times$ g for 5 min and resuspension in MEM. Cells were then mounted on glass microscope slides in 5  $\mu\text{l}$  of anti-fading medium (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Germany), to prevent photobleaching, and examined using a DMLB fluorescence microscope (Leica, Germany). The emitted fluorescence signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered viable if their cytoplasm stained positively with calcein-AM (green) and their chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red).

#### *Statistical analysis*

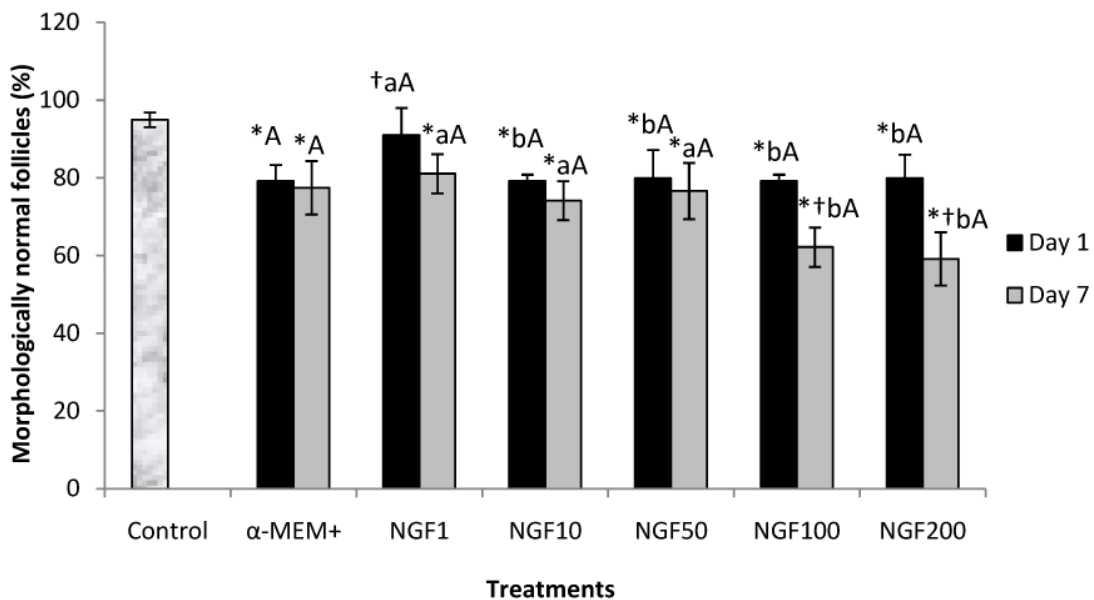
Means of surviving follicles at all stages (primordial and developing), obtained after 1 or 7 days in the various culture conditions, were subjected to ANOVA using the GLM procedure of SAS (1999). In addition, Dunnett's test was applied in order to compare NGF-treated groups against the control and  $\alpha\text{-MEM}^+$  groups; the Student's-Neuman-Keuls test was used to compare differences between NGF concentrations and means between 1 and 7 days of culture [STEEL et al., 1997]. Data of follicular viability assessed through fluorescence microscopy were analyzed as dispersion of frequencies using the chi square test. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$  and results are expressed as the mean  $\pm$  SD.

## **Results**

#### *Effect of NGF on follicular survival*

In the present study, 120 follicles in each culture condition were analyzed using classical histology, totaling 1,560 preantral follicles (400 primordial, 594 intermediate, 497 primary and

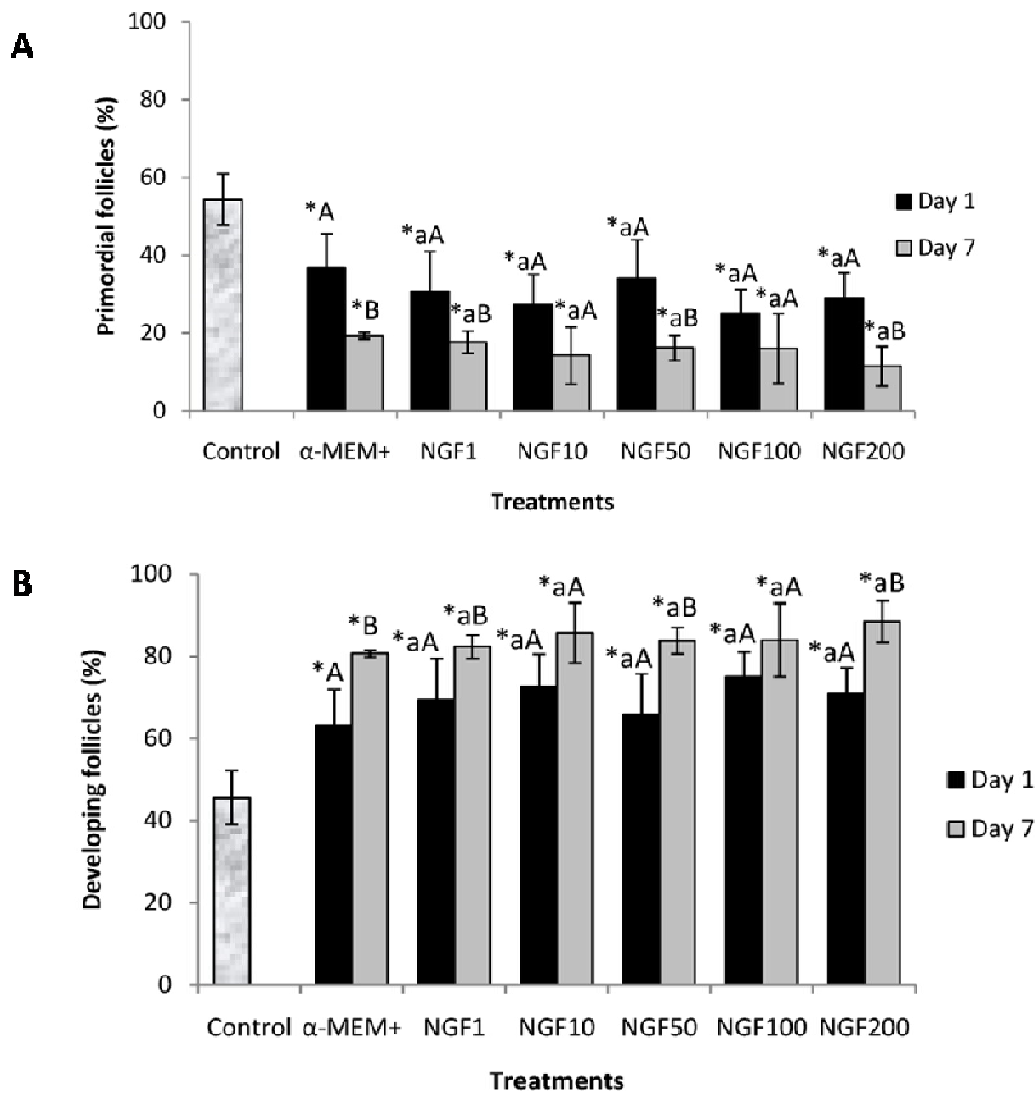
68 secondary). The percentages of morphologically normal follicles in the fresh control (non-cultured tissue) and after 1 or 7 days of culture, in the absence or presence of NGF, are shown in Figure 2. After 1 or 7 days of *in vitro* culture at all concentrations of NGF, except at 1 ng/mL after 1 day of culture ( $P>0.05$ ), we observed a significant reduction in the percentage of normal follicles when compared to the fresh control ( $P<0.05$ ). In addition, after 1 day of culture, tissues cultured in the lowest concentration of NGF (1 ng/mL) exhibited a significantly higher percentage of normal follicles than did tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or with the other concentrations of NGF ( $P<0.05$ ). After 7 days, there was a significant decrease ( $P<0.05$ ) in the percentage of normal follicles for tissues cultured in 100 or 200 ng/mL NGF compared to tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone and with the other concentrations of NGF (1, 10 and 50 ng/mL).



**Fig. 2.** Percentage (mean  $\pm$  S.D.) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in the absence or presence of NGF. \* $P<0.05$  compared with fresh control (Day 0). † $P<0.05$  compared with  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Different lowercase letters denote significant differences between treatment groups for the same culture period ( $P<0.05$ ). Different capital letters denote significant differences between culture periods within each treatment group ( $P<0.05$ ).

*Preantral follicle activation during in vitro culture of cortical fragments*

The percentages of normal primordial and developing follicles in fresh tissues or in tissues cultured for 1 or 7 days in the different culture conditions are shown in Figure 3. Fresh ovarian tissues predominantly contained primordial follicles (54.4%) and developing follicles (45.6%). After 1 or 7 days of culture, in all culture conditions, the percentage of primordial follicles (Fig. 3A,  $P<0.05$ ) was significantly reduced, concomitant with a significant increase in the percentage of developing follicles (Fig. 3B,  $P<0.05$ ), as compared to the fresh control. The addition of NGF to the tissues had no effect on the percentage of developing follicles when compared to tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone ( $P>0.05$ ). With the progression of the culture period from 1 to 7 days, we observed a significant increase ( $P<0.05$ ) in the percentage of developing follicles in all culture conditions except when follicles were cultured with 10 and 100 ng/mL NGF. The mean distribution of developing follicles after 7 days of culture was 33.7%, 36.0% and 9.9% for intermediate, primary and secondary follicles, respectively.



**Fig. 3.** Percentage (mean  $\pm$  S.D.) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of NGF. \* $P < 0.05$  compared with fresh control (Day 0). Different lowercase letters denote significant differences between treatment groups for the same culture period ( $P < 0.05$ ). Different capital letters denote significant differences between culture periods within each treatment group ( $P < 0.05$ ).

*Evaluation of oocyte and follicular cell diameters in fresh and cultured tissues*

Follicle and oocyte diameters were measured and are shown in Table 1. Compared with fresh cortical fragments (non-cultured), a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the diameter of unilaminar follicles (i.e., primordial, intermediate and primary follicles) was observed when

tissues were cultured for 1 day in all media tested ( $P<0.05$ ), except when tissues were cultured with 10 and 200 ng/mL NGF ( $P>0.05$ ). At these concentrations of NGF (10 and 200 ng/mL), there was a significant reduction in follicular diameter as compared to follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone ( $P<0.05$ ). In addition, from days 1 to 7 of culture, follicular diameter was maintained only in follicles cultured with 1 and 10 ng/mL NGF while follicles cultured at the other NGF concentrations exhibited a significant reduction in this parameter ( $P<0.05$ ). When we compared between the different NGF concentrations after 7 days, follicular diameter was higher when follicles were cultured with 1 ng/mL NGF ( $P<0.05$ ) than when cultured at the other concentrations (50, 100 and 200 ng/mL); however, there was no difference between follicles cultured with 1 or 10 ng/mL NGF ( $P>0.05$ ).

With respect to oocyte diameter, there was no difference between follicles cultured with the different concentrations of NGF when compared to fresh control after 1 day of culture ( $P>0.05$ ) indicating that there is no positive effect of NGF on oocyte growth. However, after 7 days of culture, in all culture conditions, there was a significant reduction in oocyte diameter ( $P<0.05$ ) when compared to day 1 of culture. In addition, when compared to oocytes from the fresh control, oocytes cultured for 7 days with 50 and 200 ng/mL NGF exhibited a reduction in oocyte diameter.

**Table 1.** Caprine oocyte and follicle diameters (mean  $\pm$  S.D.) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 days in the absence or presence of NGF.

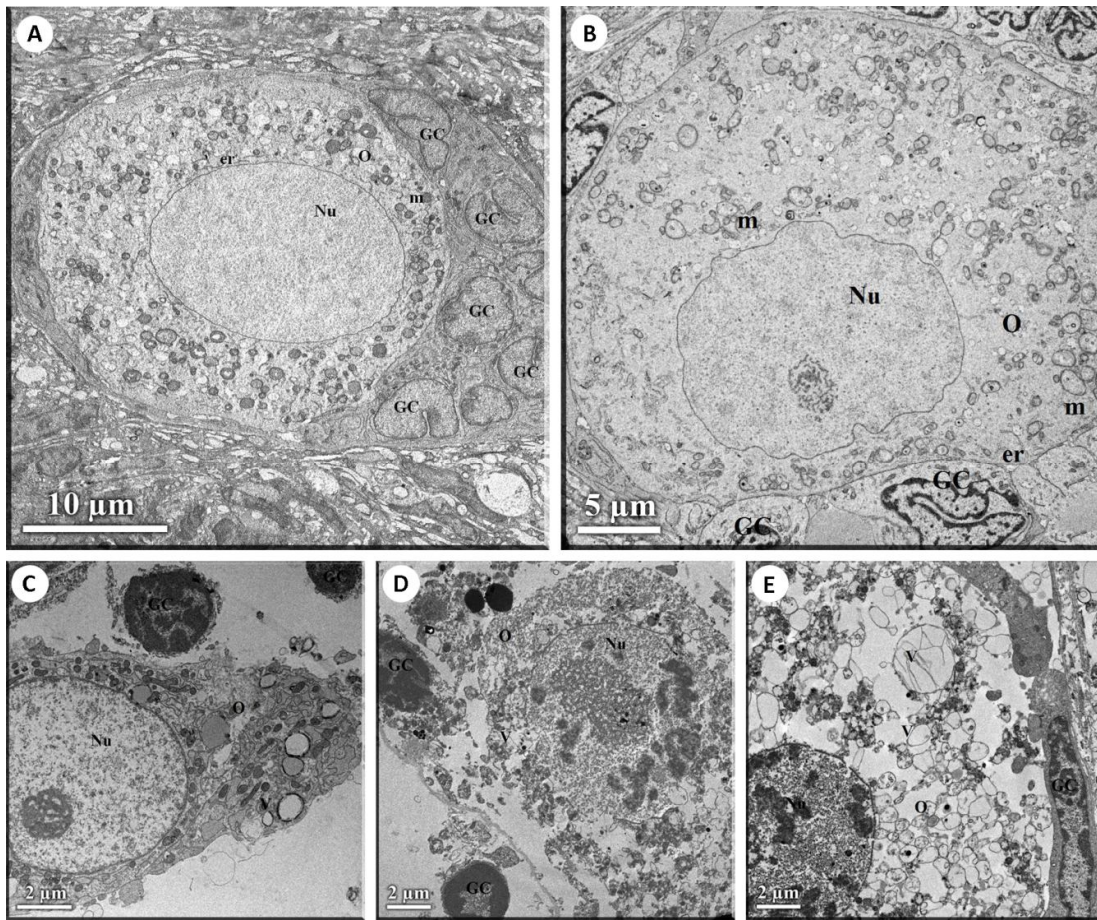
	Follicle diameter ( $\mu\text{m}$ )		Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
Control	69.88 $\pm$ 12.95		52.12 $\pm$ 9.64	
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	81.97 $\pm$ 12.37 <sup>*A</sup>	70.30 $\pm$ 12.33 <sup>B</sup>	54.79 $\pm$ 9.25 <sup>A</sup>	48.28 $\pm$ 12.43 <sup>B</sup>
NGF 1	80.00 $\pm$ 11.27 <sup>*aA</sup>	75.16 $\pm$ 11.09 <sup>aA</sup>	56.35 $\pm$ 9.24 <sup>aA</sup>	50.98 $\pm$ 8.91 <sup>Ab</sup>
NGF 10	75.16 $\pm$ 9.98 <sup>†aA</sup>	71.22 $\pm$ 12.52 <sup>abA</sup>	50.60 $\pm$ 6.13 <sup>aA</sup>	46.43 $\pm$ 11.14 <sup>abB</sup>
NGF 50	77.79 $\pm$ 9.01 <sup>*aA</sup>	66.20 $\pm$ 11.17 <sup>bcB</sup>	53.30 $\pm$ 8.30 <sup>aA</sup>	43.10 $\pm$ 10.42 <sup>*bB</sup>
NGF 100	79.18 $\pm$ 11.17 <sup>*aA</sup>	67.05 $\pm$ 11.02 <sup>bcB</sup>	54.43 $\pm$ 9.07 <sup>aA</sup>	46.19 $\pm$ 10.42 <sup>abB</sup>
NGF 200	75.32 $\pm$ 11.06 <sup>†aA</sup>	62.96 $\pm$ 13.99 <sup>†cB</sup>	53.30 $\pm$ 8.62 <sup>aA</sup>	43.03 $\pm$ 12.15 <sup>*bB</sup>

\* $P<0.05$  when compared with fresh control (Day 0). † $P<0.05$  when compared with  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. a, b, c Different letters in the same column denote significant differences between treatments in

the same time period ( $P < 0.05$ ). A, B Different letters in the same row denote significant differences between culture periods with the same treatment ( $P < 0.05$ ).

#### *Ultrastructural features of cultured follicles*

In order to better evaluate follicular integrity, ultrastructural analysis was performed in tissues from fresh control, tissues cultured for 7 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (cultured control) and tissues cultured with 1, 10 and 50 ng/mL of NGF which showed satisfactory results with respect to follicular health, growth and activation upon histological evaluation. The ultrastructural features of the follicles from the fresh control or from tissues cultured for 7 days with 1 ng/mL NGF were similar and exhibited intact oocyte and nuclear membranes as well as large oocyte nuclei (Fig. 4A and 4B, respectively). In addition, the follicles exhibited uniformly distributed organelles in the ooplasm, especially mitochondria and endoplasmic reticulum. In addition, granulosa cells were ultrastructurally normal, showing elongated and large nuclei with irregular membranes and a high proportion nuclei-to-cytoplasm. Nevertheless, follicles cultured with  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (cultured control) or 10 and 50 ng/mL NGF showed signs of degeneration, such as high levels of cytoplasmic vacuolization, absence of basement membrane integrity and disorganization of granulosa cells (Figure 4C, 4D and 4E, respectively). There were few variations in follicular ultrastructure in these different conditions. When the oocyte nucleus was evident, the nuclear membrane was damaged in some places, and the chromatin showed typical features of apoptosis. In most of the electron micrographs where the nucleus was not present, it is possible to see a different pattern of granulation in the cytoplasm, as well as discreet fragments of nuclear membrane, suggesting that the nucleus was destroyed.

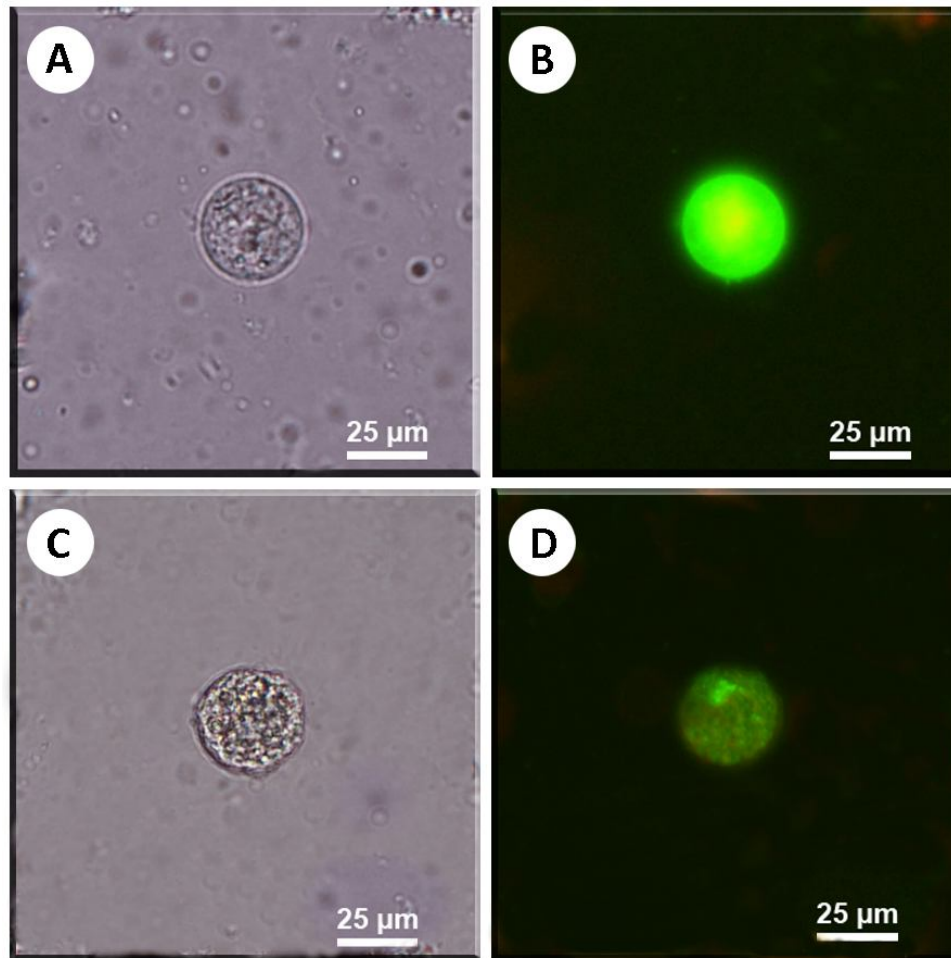


**Fig. 4.** Electron micrographs of follicles before and after 7 days of culture. (A) normal preantral follicles from non-cultured ovarian tissues (control; original magnification 3000×); (B) normal preantral follicles after culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 1 ng/mL NGF (original magnification 4000×); (C) degenerated follicles after 7 days of culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone (original magnification 4000×) or supplemented with (D) 10 ng/mL NGF (original magnification 4000×) or (E) 50 ng/mL NGF (original magnification 8000×) showing characteristic high levels of cytoplasmic vacuolization, lack of basal membrane integrity and disorganization of granulosa cells. O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cell; V: vacuoles; er: endoplasmic reticulum; m: mitochondria.

#### *Assessment of follicle viability after culture*

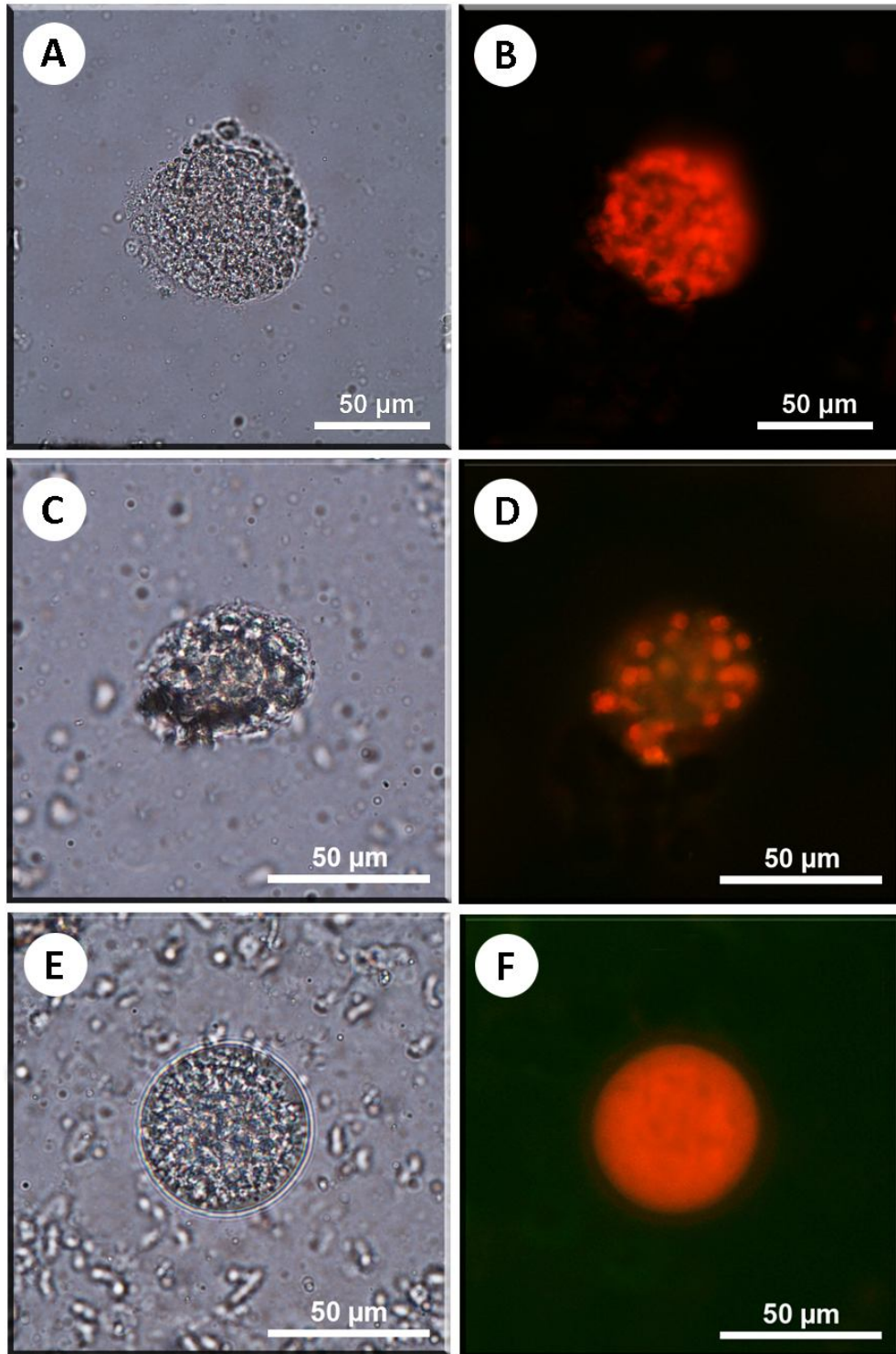
In the present study, 120 caprine preantral follicles were analyzed after 7 days of culture with  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone (cultured control) or  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 1, 10 or 50 ng/mL NGF. A quantitative analysis of cell viability showed that viable follicles with viable oocyte and granulosa cells from fresh control tissues (96,7%) and tissues cultured with 1 ng/mL NGF

(80,0%) stained green with calcein-AM (Fig. 5). In addition, degenerated follicles stained red with ethidium homodimer-1 after culture with  $\alpha$ -MEM+ and 10 and 50 ng/mL NGF (Fig. 6).



**Fig. 5.** Assessment of the viability of caprine preantral follicles using fluorescent probes. Isolated control (**A, B**) and treated preantral follicles cultured for 7 days in medium supplemented with 1 ng/mL NGF (**C, D**) classified as viable since cells were labeled with calcein-AM (green fluorescence).





**Fig. 6.** Assessment of the viability of caprine preantral follicles using fluorescent probes. Follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone (arrows) (**A**, **B**) or with 10 (**C**, **D**) or 50 ng/mL (**E**, **F**) NGF. Cells were considered non-viable since they were labeled with ethidium homodimer-1 (red fluorescence).

## Discussion

Much is known about the endocrine hormonal mechanisms that control ovarian development. However, more recently, attention has focused on identifying the regulatory pathways that operate within the ovarian microenvironment and contribute to ovarian reproductive competence. Within this framework, the hypothesis has developed that, in addition to their requirement for nervous system development, neurotrophins and their tyrosine kinase receptors (Trk) can also control ovarian maturation [DISSEN et al., 2002]. The ovaries of several species, including rodents, sheep, cows, non-human primates, and humans, produce neurotrophins and express both the high-affinity receptors and the common p75 receptor required for signaling [MATTIOLI et al., 1999; ANESETTI et al., 2001; SPEARS et al., 2003]. Here, we show for the first time that the neurotrophin NGF has a role in the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. NGF was used at 10, 50 and 100 ng/mL because these concentrations have been previously tested in other species [bovine: DISSEN et al., 2000a; rodent: ROMERO et al., 2002; human: SALAS et al., 2006]. In addition to these concentrations, lower and higher concentrations (1 and 200 ng/mL) of NGF were also evaluated.

In our study, culture of ovarian tissues at the lowest concentration of NGF (1 ng/mL) resulted in a greater percentage of histologically normal follicles than did culture of the tissues in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or at other concentrations of NGF after 1 day of culture. Nevertheless, after 7 days, we observed an elevated rate of follicular survival in tissue fragments cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or with the addition of 1, 10 and 50 ng/mL NGF by classical histology. However, using more accurate methods for the evaluation of follicular viability, such as TEM and fluorescence microscopy, the results of follicular survival observed with classical histology were confirmed only in tissues cultured with 1 ng/mL NGF. Using TEM, we found that, only in the fresh control tissue and in tissues cultured for 7 days in the presence of 1 ng/mL NGF, important structures, such as mitochondria, endoplasmic reticulum and granulosa cells, as well as basement and nuclear membranes, were preserved. TEM is considered an important tool because it reveals more information about the quality of follicles and oocytes and can detect damage to cellular membranes and organelles [LUCCI et al., 2001]. Additionally to ultrastructural analysis, preantral follicles were further analyzed using a more accurate method based on fluorescent probes. The fluorescent probes calcein-AM and ethidium homodimer-1 have been successfully used to assess the viability of bovine [SCHOTANUS et al., 1997], canine [LOPES et al., 2009] and caprine [ROSSETO et al., 2009] early-stage follicles. In the

present study, the results of this assay were similar to those obtained by ultrastructural analysis, suggesting that TEM is a reliable method for the assessment of viability of preantral follicles.

NGF is extremely important for the survival, differentiation and function of sympathetic and sensorial neurons of the central and peripheral nervous systems [OJEDA et al., 2000]. However, similar functions have also been described in non-neural organs, such as in ovaries. In addition, previous studies have demonstrated that some growth factors, such as NGF, can inhibit apoptosis and therefore, contribute to the follicular survival [MARKSTRÖM et al., 2002]. Nevertheless, high concentrations of NGF (100 and 200 ng/mL) reduce follicular survival after 7 days of culture. At these high concentrations, NGF may be toxic during the earlier stages of follicular development. Interestingly, an excess of NGF, rather than being beneficial, has been shown to initiate pathological changes in both endocrine and non-endocrine tissues [HOYLE et al., 1998]. Such changes can contribute to ovarian dysfunctions, such as the induction of follicular cysts [DISSEN et al., 2009b], and to a reduction in the number of normal antral follicles [DISSEN et al., 2000b].

In the context of follicular atresia, the investigation of the localization and expression of *trkA* and *p75* receptors in goat ovaries may be important for analyzing the deleterious effects exerted by high NGF concentrations on follicle development. It is known that the *p75* receptor mediates proapoptotic pathways when expressed alone. Conversely, cell death due to apoptosis mediated by *p75* does not take place if high affinity receptors (*TrkA*) are coexpressed [BOTCHKAREV et al. 2000]. Therefore, the pro or anti-apoptotic action of neurotrophins is highly dependent on the relative expression of both receptors within the target cell population [BARKER, 2004].

Expression of the receptor *Trk* was detected in oogonia, [SPEARS et al., 2003], oocytes [PAREDES et al., 2004] and GCs [PAREDES et al., 2004] of mice [SPEARS et al., 2003; PAREDES et al., 2004], rats [DISSEN et al., 1995] and human fetuses and adult ovarian follicles from primordial stages onwards as well as in the stroma cells [ANDERSON et al., 2002]. Receptors *p75* and *TrkA* were found in granulosa cells from primordial and primary follicles and in oocytes and granulosa cells within secondary and tertiary follicles in sows. In cows, *p75* was present in the oocyte whilst *TrkA* was detected both in the oocyte and in granulosa cells [LEVANTI et al., 2005].

With respect to follicular activation (i.e., the transition from primordial to developing follicles), even after 1 day of culture, there was a high level of activation in all culture conditions as compared to the fresh control. NGF is considered a mitogenic factor and an inducer of cell proliferation [CANTARELLA et al., 2002], taking part in the differentiation of

mesenchymal cells to create primary follicles in the mouse [DISSEN et al., 2001] and in the proliferation and differentiation of theca and granulosa cells to create secondary follicles in the rat [OJEDA et al., 1999]. However, in the present study, we did not observe a significant effect of this factor on follicular activation when compared to tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. This can be due to the fact that  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> is a medium rich in nutrients (amino acids, carbohydrates and vitamins) and DNA precursors, all of which promote cell division [HARTSHORNE, 1997].

Our findings are in agreement with those obtained in earlier *in vitro* studies with bovine [BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997], caprine [SILVA et al., 2004], primate [FORTUNE et al., 1998] and human [HOVATTA et al., 1997] follicles. These studies demonstrated that activation of primordial follicles can occur ‘spontaneously,’ i.e., without the addition of growth factors or hormones. Therefore, the *in vitro* conditions used in the current study have facilitated the development of follicles from slices of cultured ovarian tissues, possibly through the release of stimulatory factors or by preventing the production of inhibitory factors by oocytes or stromal, granulosa or pre-thecal cells within the cortical ovarian tissue [SILVA et al., 2006].

In general, in the current study, NGF alone was not adequate to promote follicle and oocyte growth. After 7 days of culture, at all culture conditions except at the lowest concentrations of NGF (1 and 10 ng/mL), there was a significant reduction in follicle and oocyte diameter when compared with day 1 of culture. These results differ from the results observed by Dissen et al. [2009a] which demonstrated that, in addition to promoting the growth of rat antral follicles, NGF also contributes to the development of follicles into gonadotropin-responsive structures [DISSEN et al., 2001]. The reduction in follicle and oocyte diameter observed during culture can be attributed to the culture media employed, which may not be adequate enough to sustain the survival of larger preantral follicles. Consequently, as only morphologically normal follicles were considered for diameter evaluation, the reduction in the number of larger follicles at the end of the culture period leads to a decrease in the mean value for this parameter. In addition, Silva et al. [2002] demonstrated that smaller caprine preantral follicles are less sensitive to degeneration than are larger follicles.

Studies evaluating the ability of NGF to induce the proliferation of purified theca cells from bovine animals revealed that these cells express mRNA for NGF, TrkA and p75 *in vivo*. However, since theca cells were cultured *in vitro*, the levels of TrkA mRNA were drastically reduced, compromising the role of NGF in the process of cell proliferation [DISSEN et al., 1996b]. Studies have shown that TrkA receptor-deficient mice [DISSEN et al., 2002] exhibit a reduced number of follicles and oocytes [SPEARS et al., 2003; PAREDES et al., 2004] as well as a decrease in follicular growth [OJEDA et al., 2000]. The divergence between our results in

goats and those in rodents [PAREDES et al., 2004], cows [ABIR et al., 2005], sheep [MATTIOLI et al., 1999] and humans [SALAS et al., 2006] may likely be explained by the differences between the species, differences in the culture conditions and differences in the follicular stages analyzed.

We can conclude that, at 1 ng/mL, NGF plays an important role in early folliculogenesis in goats, acting as a survival factor and maintaining follicular viability after 7 days of *in vitro* culture. These results provide a basis for future studies aimed at growing caprine oocytes and follicles from the earliest (primordial) follicle stage up to the pre-ovulatory stage at which oocytes can be matured and fertilized *in vitro*.

### **Acknowledgments**

This research was supported by grants from CNPQ (RENORBIO: grant number 554812/2006-1) and FINEP – Brazil. Roberta Nogueira Chaves is the recipient of a grant from CNPq (Brazil).

### **References**

- Abir R., B. Fisch, A.H. Raz, S. Nitke, Z. Ben Rafael (1998) Preservation of fertility in women undergoing chemotherapy—current approach and future prospects. *J Assist Reprod Genet* 15:469–478.
- Abir R., B. Fisch, S. Jin, M. Barnnet, A. Ben-Haroush, C. Felz, G. Kessler-Icekson, D. Feldberg, S. Nitke (2005) Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod* 11:229–236.
- Anderson R.A., L.L.L. Robinson, J. Brooks, N. Spears (2002) Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 87:890–897.
- Anesetti G., P. Lombide, H. D'albora, S.R. Ojeda (2001) Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res* 306:231–237.
- Barker, P.A. (2004) p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42:529–533.
- Botchkarev, V.A., N.V. Botchkareva, K.M. Albers, L. Chen, P. Welker, R. Paus (2000) A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *The FASEB Journal* 14:1931-1942.

- Braw-Tal R., S. Yossefi (1997) Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 109:165-171.
- Cantarella G., L. Lempereur, M. Presta, D. Ribatti, G. Lombardo, F. Lazarovici, G. Zappalà, C. Pafumi, R. Bernardini (2002) Nerve growth factor endothelial cell interaction leads to angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *The FASEB Journal* 21:21-29.
- Chaves R.N., F.S. Martins, M.V.A. Saraiva, J.J.H. Celestino, C.A.P. Lopes, J.C. Correia, I.B. Lima-Verde, M.H.T. Matos, S.N. Bão, K.P.O. Name, C.C. Campello, J.R.V. Silva, J.R. Figueiredo (2008) Chilling ovarian fragments during transportation improve viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 20:640-647.
- Dees W.L., J.K. Hiney, T.D. Schulte, A. Meyerhofer, M. Danilchik, G.A. Dissen, S.R. Ojeda (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expression nerve growth factor receptors. *Endocrinology* 136:5760–5768.
- Dissen G.A., D.F. Hill, M.E. Costa, Y.J. Ma, S.R. Ojeda (1991) Nerve growth factor in the peripubertal rat ovary. *Mol Endocrinol* 5:1642–1650.
- Dissen G.A., A.N. Hirshfield, S. Malam, S.R. Ojeda (1995) Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 136, 4681–4692.
- Dissen G.A., D.F. Hill, M.E. Costa, W.L. Dees, H.E. Lara, S.R. Ojeda (1996a) A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* 137:198–209.
- Dissen G.A., A. Mayerhofer, S.R. Ojeda (1996b) Participation of nerve growth factor in the regulation of ovarian function. *Zygote* 4:309-312.
- Dissen G.A., J.A. Parrott, M.K. Skinner, D.F. Hill, M.E. Costa, S.R. Ojeda (2000a) Direct effects of nerve growth factor on theca cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology* 141:4736–4750.
- Dissen G.A., H.E. Lara, V. Leyton, A. Paredes, D.F. Hill, M.E. Costa, A. Martinez-Serrano, S.R. Ojeda (2000b) Intraovarian Excess of Nerve Growth Factor Increases Androgen Secretion and Disrupts Estrous Cyclicity in the Rat. *Endocrinology* 141:1073–1082.
- Dissen G.A., C. Romero, A. Newman Hirshfield, S.R. Ojeda (2001) Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 142:2078–2086.
- Dissen G.A., C. Romero, A. Paredes, S.R. Ojeda (2002) Neurotrophic control of ovarian development. *Microsc Res Tech* 59:509–515.
- Dissen G.A., C. Garcia-Rudaz, S.R. Ojeda (2009a) Role of Neurotrophic Factors in Early Ovarian Development. *Semin Reprod Med* 27:24-31.

- Dissen G.A., C. Garcia-Rudaz, A. Paredes, C. Mayer, A. Mayerhofer, S.R. Ojeda (2009b) Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology* 150:2906–2914.
- Fortune, J.E., S. Kito, S.A. Wandji, V. Srsen (1998) Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology* 49:441-449.
- Harsum S., J.D. Clarke, P. Martin (2001) A reciprocal relationship between cutaneous nerves and repairing skin wounds in the developing chick embryo. *Dev Biol* 238:27-29.
- Hartshorne G.M. (1997) *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod* 2:94-104.
- Hovatta O., R. Silye, R. Anir, T. Krausz, R.M.L. Winston (1997) Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reprod* 12:1032-1036.
- Hoyle G.W., R.M. Graham, J.B. Finkelstein, K.P.T. Nguyen, D. Gozal, M. Friedman (1998) Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:149–157.
- Lara H.E., J.K. McDonald, S.R. Ojeda (1990a) Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126:364-375.
- Lara H.E., D.F. Hill, K.H. Katz, S.R. Ojeda (1990b) The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 126:357-363.
- Lara H.E., W.L. Dees, J.K. Hiney, G.A. Dissen, C. Rivier, S.R. Ojeda (1991) Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervations. *Endocrinology* 129:1849-1860.
- Levanti, M.B., A. Germana, F. Abbate, G. Montalbano, J.A. Vega, G. Germana (2005) TrkA and p75NTR in the ovary of adult cow and pig. *J. Anat* 207:93-96.
- Lucci C.M., C.A. Amorim, S.N. Bão, J.R. Figueiredo, A.P.R. Rodrigues, J.R. Silva, P.B.D. Gonçalves (1999) Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 56:39-49.
- Lucci C.M., R.V. Silva, C.A. Carvalho, J.R. Figueiredo, S.N. Bão (2001) Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin Res* 41:61-69.
- Lopes C.A., R.R. Dos Santos, J.J. Celestino, M.A. Melo, R.N. Chaves, C.C. Campello, J.R. Silva, S.N. Bão, K. Jewgenow, J.R. Figueiredo (2009) Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Anim Reprod Sci* 115:201-214.

- Markström E., E.C. Svensson, R. Shao, B. Svanberg, H. Billig (2002) Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123:23-30.
- Mattioli M., B. Barboni, L. Gioia, P. Lucidi (1999) Nerve growth factor production in sheep antral follicles. *Dom Anim Endocrinol* 17:361–371.
- Matos M.H.T., I.B. Lima-Verde, M.C.A. Luque, J.E. Maia Jr, J.R.V. Silva, J.J.H. Celestino, F.S. Martins, S.N. Bão, C.M. Lucci, J.R. Figueiredo (2007) Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote* 15:173-182.
- Ojeda S.R., G.A. Dissen, C. Romero (1999) Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. *Front Endocrinol* 21:171–178.
- Ojeda S.R., C. Romero, V. Tapia, G.A. Dissen (2000) Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 163:67–71.
- Paredes A., C. Romero, G.A. Dissen, T.M. Dechiara, L. Reichardt, A. Cornea, S.R. Ojeda, B. Xu (2004) TrkB receptors are required for growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Dev Biol* 267: 430–449.
- Richards J.S. (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15:725–751.
- Romero C., A. Paredes, G.A. Dissen, S.R. Ojeda (2002) Nerve Growth Factor Induces the Expression of Functional FSH Receptors in Newly Formed Follicles of the Rat Ovary. *Endocrinology* 143:1485–1494.
- Rosseto R., I.B. Lima-Verde, M.H.T. Matos, M.V.A. Saraiva, F.S. Martins, L.S. Faustino, V.R. Araújo, C.M. Silva, K.P. Name, S.N. Bão, C.C. Campello, J.R. Figueiredo, H. Blume (2009) Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domest Anim Endocrinol* 37:112-123.
- Salas C., M. Julio-Pieper, M. Valladares, R. Pommer, M. Vega, C. Mastronardi, B. Kerr, S.R. Ojeda, H.E. Lara, C. Romero (2006) Nerve Growth Factor-Dependent Activation of trkA Receptors in the Human Ovary Results in Synthesis of Follicle-Stimulating Hormone Receptors and Estrogen Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2396–2403.
- Schotanus K., W.J. Hage, H. Vanderstichele, R. Van Den Hurk (1997) Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology* 48:471, 483.



- Shi Z., W. Jim, G. Watanabe, A.K. Suzuki, S. Takahashi, K. Taya (2004) Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors trkA and p75 in ovaries of the cyclic golden hamster and the regulation of their production by luteinizing hormone. *J Reprod Dev* 50:605-611.
- Silva J.R., M.A.L Ferreira, S.H.F. Costa, R.R. Santos, F.C.A. Carvalho, A.P.R. Rodrigues, C.M. Lucci, S.N. Bao, J.R. Figueiredo (2002) Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Res* 43:203–209.
- Silva J.R.V., R. Van Den Hurk, M.H.T. Matos, R.R. Santos, C. Pessoa, M.O. Moraes, J.R. Figueiredo (2004) Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 61:1691-1704.
- Silva J.R., T. Tharasanit, M.A. Taverne, G.C. Van Der Weijden, R.R. Santos, J.R. Figueiredo, R. Van Den Hurk (2006) The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *J Endocrinol* 29:113-125.
- Spears N., M.D. Molinek, L.L.L. Robinson, N. Fulton, H. Cameron, K. Shimoda, E.E. Telfer, R.A. Anderson, D.J. Price (2003) The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development* 130:5481–5491.
- Steel R.G.D., J.H. Torrie, D.A. Dickey (1997) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3rd Ed. McGraw-Hill, New York, NY, pp. 666.
- Van Den Hurk R., R. Abir, E.E. Telfer, M.M. Bevers (2000) Preantral and antral follicles as possible source for fertilizable oocytes in human and bovine. *Hum Reprod Update* 6:457–474.

**Fator de Crescimento de Fibroblasto-10 mantém a sobrevivência e promove o crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados**

*(Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles)*

**Periódico:** *Domestic Animal Endocrinology*, 39: 249-258, 2010.

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) na sobrevivência, ativação (transição de folículos primordiais para primários), e crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. Fragmentos de córtex ovariano foram cultivados por 1 e 7 dias na ausência ou presença de FGF-10 (1, 10, 50, 100 e 200 ng/mL). Os tecidos não cultivados e cultivados foram processados e analisados por histologia, microscopia eletrônica de transmissão e teste de viabilidade. Os resultados mostraram que após 7 dias, um grande percentual (79,9%) de folículos morfológicamente normais (contendo um oócito com bordas regulares e citoplasma uniforme, e células da granulosa com camadas organizadas e sem núcleo picnótico) foi observado quando cultivado com 50 ng/mL de FGF-10 quando comparado com outras concentrações de FGF-10 (0 ng/mL, 67,3%; 1 ng/mL, 68,2%; 10 ng/mL, 63,3%; 100 ng/mL, 64,4%; 200 ng/mL, 52,7%). A análise ultraestrutural e o teste de viabilidade usando marcadores fluorescentes confirmaram a integridade folicular dos fragmentos tratados com FGF-10 (50 ng/mL) após 7 dias de cultivo. Após 7 dias, todas as concentrações de FGF-10 reduziram o percentual de folículos primordiais e aumentaram o percentual de folículos em desenvolvimento. Na presença de 50 ng/mL de FGF-10, os folículos aumentaram o diâmetro após 7 dias de cultivo quando comparado com outras concentrações testadas. Em conclusão, esse estudo demonstrou que o FGF-10 mantém a integridade morfológica de folículos pré-antrais caprinos e estimula o crescimento de folículos ativados no cultivo. As condições de cultivo identificadas aqui contribuem para o entendimento de fatores envolvidos no desenvolvimento folicular inicial em caprinos.

**Palavras-chave:** Caprino, folículos iniciais, viabilidade, ovário, FGF-10.

**Fibroblast Growth Factor -10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles**

Effects of FGF-10 on goat preantral development

R.N. Chaves<sup>a\*</sup>, I.B. Lima-Verde<sup>b</sup>, J.J.H. Celestino<sup>a</sup>, A.B.G. Duarte<sup>a</sup>, A.M.C.V. Alves<sup>a</sup>, M.H.T. Matos<sup>c</sup>, C.C. Campello<sup>a</sup>, K.P.O. Name<sup>d</sup>, S.N. Bão<sup>d</sup>, J. Buratini Jr<sup>e</sup> and J.R. Figueiredo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus Itaperi, Fortaleza, 60740-903, CE, Brazil.

<sup>b</sup>Technology and Research Institute, Tiradentes University, Aracaju, 49032-490, SE, Brazil.

<sup>c</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, 48902-300, PE, Brazil

<sup>d</sup>Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, DF, Brazil.

<sup>e</sup>Department of Physiology, Institute of Biosciences, State University Paulista, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil.

\* Correspondence should be addressed to:

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: 60740-000

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rncvet@gmail.com (Roberta Nogueira Chaves)

## Abstract

The aim of the present study was to investigate the effects of fibroblast growth factor-10 (FGF-10) on the survival, the activation (transition from primordial to primary follicles) and the growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. Pieces of ovarian cortex were cultured for 1 and 7 d in the absence or presence of FGF-10 (0, 1, 10, 50, 100 and 200 ng/mL). Non-cultured and cultured tissues were processed and analyzed by histology, transmission electron microscopy and viability testing. Results showed that after 7 d, a higher percentage (79.9%) of morphologically normal follicles (containing an oocyte with regular shape and uniform cytoplasm, and organized layers of granulosa cells without a pyknotic nuclei) was observed when cultured with 50 ng/mL of FGF-10 than compared with other concentrations of FGF-10 (0 ng/mL – 67.3%; 1 ng/mL – 68.2%; 10 ng/mL – 63.3%; 100 ng/mL – 64.4%; 200 ng/mL – 52.7%). Ultrastructural analyses and viability testing using fluorescent markers confirmed the follicular integrity of FGF-10 (50 ng/mL) treated fragments after 7 d of culture. After 7 d, all FGF-10 concentrations reduced the percentage of primordial follicles and increased the percentage of developing follicles. In the presence of 50 ng/mL of FGF-10, follicles increased in diameter after 7 d of culture when compared with other concentrations tested. In conclusion, this study demonstrates that FGF-10 maintains the morphological integrity of goat preantral follicles and stimulates the growth of activated follicles in culture. The culture conditions here identified contribute to the understanding of the factors involved in goat early follicular development.

**Keywords:** Goat, early follicles, viability, ovary, FGF-10.

## 1. Introduction

The fibroblast growth factor (FGF) family constitutes one of the most important groups of paracrine factors that act during cell development [1] and consists of at least 23 different members of signaling polypeptides [2]. Several studies demonstrated that this family plays an important role in maintaining homeostasis in many tissues and organs [3]. FGFs are involved in various cellular processes including chemotaxis, cell migration, differentiation, cell survival, apoptosis, embryonic development, angiogenesis, wound healing and oncogenesis [4, 5]. In addition, experimental studies have shown the critical involvement of the FGF family and its receptors in the regulation of reproductive processes, particularly in ovarian folliculogenesis [6,

7, 8]. Some FGFs are involved in regulation of preantral and antral follicular development, angiogenesis, survival and proliferation of granulosa cells [9, 10]. However, some FGFs inhibit steroidogenesis in both theca and granulosa cells in the bovine [7]. These biological activities are mediated through one of the four FGF receptors (FGFR 1-4), a complex family of transmembrane receptor tyrosine kinases [11].

Among the members of the FGF family, fibroblast growth factor-10 (FGF-10), also known as keratinocyte growth factor-2 (KGF-2), is a 13.9-kDa heparin binding protein. FGF-10 promotes epithelial cell motility, differentiation, migration and wound healing [12]. In mice, FGF-10 is essential for the normal development of lungs, limbs, teeth, skin, mammary buds, the stomach and the heart [13, 14, 15, 16, 17, 18]. Expression of FGF-10 was also found in the adult ovine uterus [19] and the bovine corpus luteum [20], and FGF-10 mRNA was detected in human normal ovarian theca, stroma and endometrial stromal cells [21]. In the bovine ovary, FGF-10 mRNA was detected in theca cells, oocytes of antral follicles and also in primordial, primary and secondary follicles [7]. Immunohistochemistry revealed the presence of FGF-10 protein in the oocyte of bovine preantral and antral follicles and in theca and granulosa cell layers of antral follicles. Also, thecal expression of FGF-10 mRNA changes with follicle viability [7].

Although FGF-10 expression was detected in all classes of preantral follicles, it is unknown if it plays a role in the mechanisms controlling preantral folliculogenesis. Therefore, the hypothesis tested was that FGF-10 may affect the *in vitro* survival and development of goat preantral follicles. Considering the ovarian FGF-10 expression pattern in ruminants and its role in cell differentiation in other organs, this study aimed to determine if FGF-10 affects the *in vitro* survival, activation (transition from primordial to primary follicles) and growth of early goat preantral follicles.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Source of ovaries**

Ovaries (n = 12) from six adult, non-pregnant, mixed-breed goats (*Capra hircus*) that were 1 to 3 yr of age were collected from a local slaughterhouse. All animals were cyclic and in good body condition. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% ethanol for 10 seconds and then washed again in MEM supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported to the laboratory in MEM at 4 °C

within 1 h postmortem [22]. Unless otherwise mentioned, the chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

## 2.2 Experimental protocol

In the laboratory, the ovaries were stripped of surrounding fat and fibrous tissue, and the ovarian cortex was recovered and divided into 13 pieces approximately 3 mm x 3 mm (1 mm thick) in size using a needle and scalpel under sterile conditions. For each animal, one slice of tissue was randomly selected and immediately fixed by immersion for 12 h in Carnoy, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). Sections of 7  $\mu\text{m}$  were stained with Periodic Acid Schiff – hematoxylin (PAS staining system; Sigma) for histological analysis (fresh control - Day 0), while a smaller fragment (1 mm<sup>3</sup>) was cut from the previous one and subsequently fixed for ultrastructural examination. The remaining slices of ovarian cortex were cultured individually in 1 mL of culture medium in 24-well culture dishes at 39 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. The basic control medium, referred to as  $\alpha\text{-MEM}^+$ , consisted of  $\alpha\text{-MEM}$  (pH 7.2–7.4) supplemented with insulin-transferrin-selenium (ITS: 10  $\mu\text{g/mL}$  insulin, 5.5  $\mu\text{g/mL}$  transferrin, 5.0 ng/mL sodium selenite), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/mL BSA. The medium was supplemented with recombinant human FGF-10 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) at different concentrations (0, 1, 10, 50, 100 or 200 ng/mL). Ovarian slices from each animal were cultured for 1 or 7 d in media supplemented with different concentrations of FGF-10 and each treatment was repeated six times, thus using the ovaries of six different animals. The culture media was stabilized at 39 °C for 4 h prior to use and was replenished every second day. The concentrations of FGF-10 used in this experiment were based on data previously published in several species (human: [23], bovine: [7], goat: [24] and murine: [25]).

## 2.3 Morphological analysis and assessment of *in vitro* follicular growth

Fresh control and cultured tissues were fixed in Carnoy for 12 h and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), the wax blocks containing the goat tissues were completely and serially sectioned at a thickness of 7  $\mu\text{m}$ , and every 5<sup>th</sup> section was mounted on individual glass slides and stained with Periodic Acid Schiff – hematoxylin (PAS staining system; Sigma). The stage of follicular development (e.g., primordial, intermediate, primary and secondary follicles) of serially sectioned ovarian

tissues and survival were assessed microscopically. Coded anonymized slides were examined using a Nikon microscope (Japan) under 400× magnification. Care was taken to count each follicle only once as performed in our earlier studies [26]. Each follicle was examined in every section and matched with the same follicle on adjacent serial sections in order to avoid double counting, which ensures that each follicle was only counted once regardless of its size.

The developmental stages of preantral follicles have been previously defined [27] as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or developing follicles. Developing follicles can be subdivided into intermediate (both flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte) and secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte and no sign of antrum formation) categories. In the current study, follicles were individually classified as morphologically normal when an intact oocyte was present, the follicle was surrounded by granulosa cells that were well organized into one or more layers and had no pyknotic nucleus. Atretic (degenerated) follicles were defined as having a retracted oocyte possibly displaying a pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells. Overall, 180 preantral follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per animal × six repetitions), and the percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated on day 0 (fresh control) and after culture in each treatment.

To evaluate follicular activation (transition from primordial to primary follicles, when surrounding squamous pré-granulosa cells become cuboidal and begin to proliferate) and growth, only morphologically normal follicles with a visible oocyte nucleus (equatorial section) were recorded, and the proportion of primordial and growing follicles were calculated at day 0 (fresh control) and after 1 or 7 d of culture with treatment. In addition, from the basement membrane, major and minor axes of each oocyte and follicle were measured using a light microscope fitted with an eyepiece micrometer (Zeiss, Cologne, Germany) under 400× magnification. The average of these two measurements was used to determine the diameters of both the oocyte and the follicle.

#### 2.4 Ultrastructural analysis of goat preantral follicles

For more in-depth evaluation of follicular morphology after histological analysis, ultrastructural studies were performed on fragments of fresh control and treatment groups that maintained follicular morphology and promoted the growth. Briefly, 1 mm<sup>3</sup> pieces of goat ovarian tissues were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium



cacodylate buffer (pH 7.2) for 4 h at room temperature (RT, approximately 25 °C). After fixation, fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated through an acetone gradient, and the tissues were embedded in Spurr's resin. For light microscopy studies, 3- $\mu\text{m}$  thick sections were cut on an ultramicrotome (Reichert Supernova, Heidelberg, Germany) and stained with toluidine blue. Ultra-thin sections of 60 to 70 nm thickness were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron microscope (TEM). The density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles as well as vacuolization and basement membrane integrity were evaluated. For ultrastructural analysis, three to five follicles were examined per group.

## 2.5 Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy

Based on the results of the morphological and ultrastructural analyses, the viability of follicles cultured with the concentration of FGF-10 that maintained follicular morphology and ultrastructural integrity was further analyzed using fluorescent probes.

Additional pairs of goat ovaries ( $n = 2$ ) were collected from a slaughterhouse, and then cut into fragments at the laboratory. One of these fragments was immediately processed for follicle isolation (fresh control) and the remaining fragments were cultured for 7 d with FGF-10 (50 ng/mL) as described above. After the culture period, fragments were processed for mechanical isolation using the method described by Lucci et al. [28]. Briefly, using a tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) adjusted for a sectioning interval of 75  $\mu\text{m}$ , samples were cut into small pieces. Next, the fragments were placed in MEM, resuspended 40 times using a large Pasteur pipette (approximate diameter of 1600  $\mu\text{m}$ ) and resuspended again 40 times with a smaller Pasteur pipette (approximate diameter 600  $\mu\text{m}$ ) in order to dissociate preantral follicles from the stroma. The material obtained was passed through 100  $\mu\text{m}$  nylon mesh filters, resulting in a suspension containing preantral follicles less than 100  $\mu\text{m}$  in diameter. This procedure was carried out at RT within a 10 min time frame.

Isolated preantral follicles were analyzed using a two-color fluorescence cell viability assay based on the simultaneous detection of live and dead cells with calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively. The first probe detects intracellular esterase activity in viable cells, whereas the latter labels nucleic acids in non-viable cells with plasma membrane disruption.

The test was performed by adding 4  $\mu$ M calcein-AM and 2  $\mu$ M ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) to a suspension of isolated follicles and incubating at 37 °C for 15 min. After being labeled, follicles were washed once by centrifugation at 100 x g for 5 min and resuspended in MEM. Follicles were then mounted on glass microscope slides in 5  $\mu$ l of anti-fading medium (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Germany), to prevent photobleaching, and examined using a DMLB fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i, Tokyo, Japan). The emitted fluorescence signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered viable if their cytoplasm stained positively with calcein-AM (green) and their chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red).

## 2.6 Statistical analysis

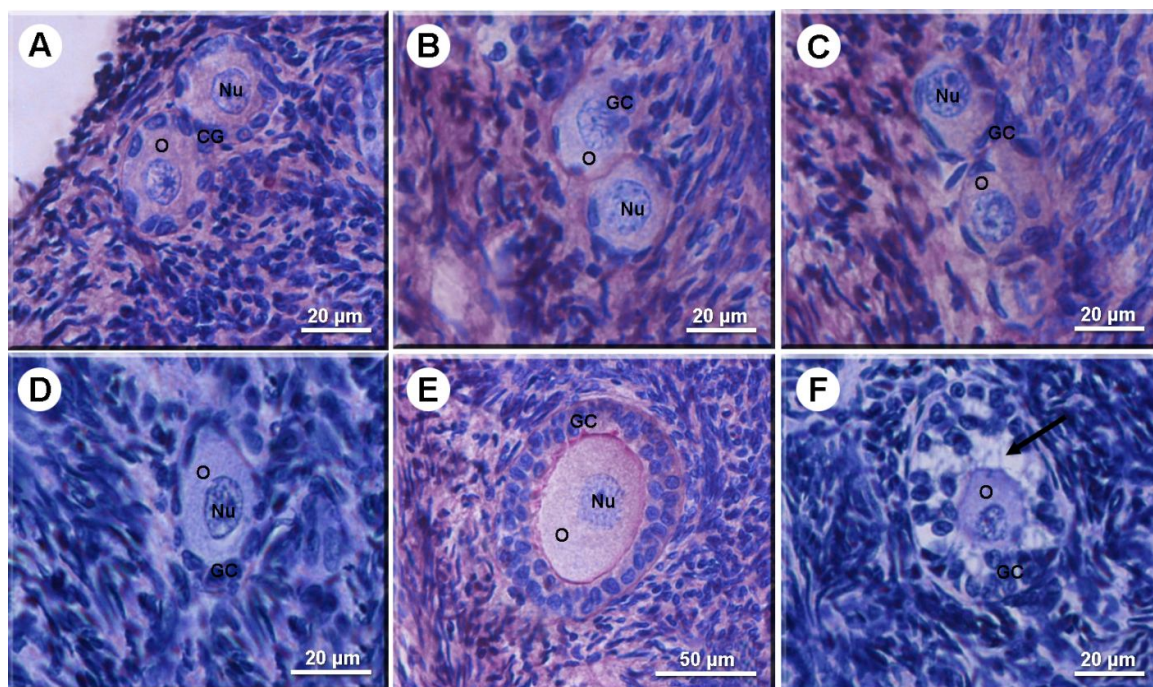
The mean number of surviving follicles at all stages (primordial and developing), obtained after 1 or 7 d in the various culture conditions, were initially submitted to Kolmogorov–Smirnov and Bartlett’s tests to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Analysis of variance was then performed using the GLM procedure of SAS (1999), and Dunnett’s test was applied in order to compare FGF-10 treated groups against 0 ng/mL of FGF-10 group. Student’s-Neuman-Keuls test was used for comparisons amongst FGF-10 concentrations and numbers of surviving follicles between 1 and 7 d of culture [29]. Data of follicular viability assessed through fluorescence microscopy were analyzed as dispersion of frequencies using the chi square test. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ , and results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of means (SEM).

## 3. Results

### 3.1 Effects of FGF-10 on follicular survival

In the present study, 180 follicles were analyzed by classical histology in each treatment, totaling 2,340 preantral follicles (1,104 primordial, 825 intermediate, 384 primary and 27 secondary). Figure 1A-E shows morphologically normal follicles after 0 (control), 1 and 7 d culture with FGF-10 at 0 ng/mL and 50 ng/mL; Figure 1F shows a degenerated follicle after

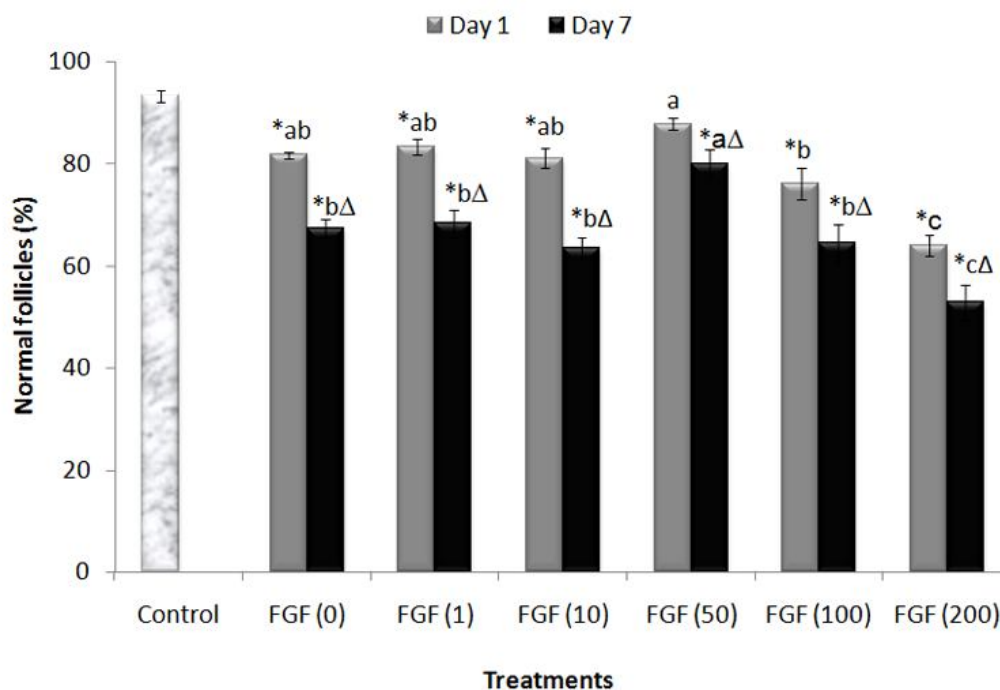
7-day culture with FGF-10 at 100 ng/mL. In degenerated follicles, we observed retracted oocytes, pyknotic nuclei, and disorganized granulosa cells.



**Figure 1.** Representative image of goat ovarian fragments on day 0 (control - A) and after 1 or 7-day culture in the presence of 0 ng/mL (B-C) and 50 ng/mL (D-E) of FGF-10 or after 7-day culture with 100 ng/mL (F) of FGF-10. Degenerated preantral follicles often displayed oocyte retraction (F, arrow) and disorganization of granulosa cell layers. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$  (E) and 20  $\mu\text{m}$  (A-D; F). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; GC: granulosa cells (x400), PAS-Hematoxylin.

The percentage of morphologically normal follicles in the fresh control (non-cultured tissue) and after 1 or 7 d of culture, in the absence or presence of FGF-10, are shown in Figure 2. In all treatments, after 1 or 7-day culture, a reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of morphologically normal follicles occurred compared to the fresh control, except in the treatment with FGF-10 at 50 ng/mL after 1 d of culture ( $P > 0.05$ ). In addition, a significantly higher percentage of morphologically normal follicles was observed in tissues cultured with 50 ng/mL of FGF-10 than with 100 and 200 ng/mL ( $P < 0.05$ ). Moreover, treatment with 200 ng/mL of FGF-10 caused a significant reduction in the percentage of morphologically normal follicles when compared to 0 ng/mL of FGF-10 dose or the other concentrations of FGF-10 ( $P < 0.05$ ). After 7 d, a higher percentage ( $P < 0.05$ ) of normal follicles in tissues cultured with

50 ng/mL of FGF-10 was observed compared to all other treatments with FGF-10. Similar to the results after 1 d of culture, the highest concentration of FGF-10 (200 ng/mL) caused the lowest percentage of morphologically normal preantral follicles ( $P<0.05$ ) compared with 0 ng/mL of FGF-10 dose and all other concentrations of FGF-10. With the progression of the culture period from 1 to 7 d, a decrease ( $P<0.05$ ) in the percentage of morphologically normal follicles in all treatments was observed ( $P<0.05$ ).



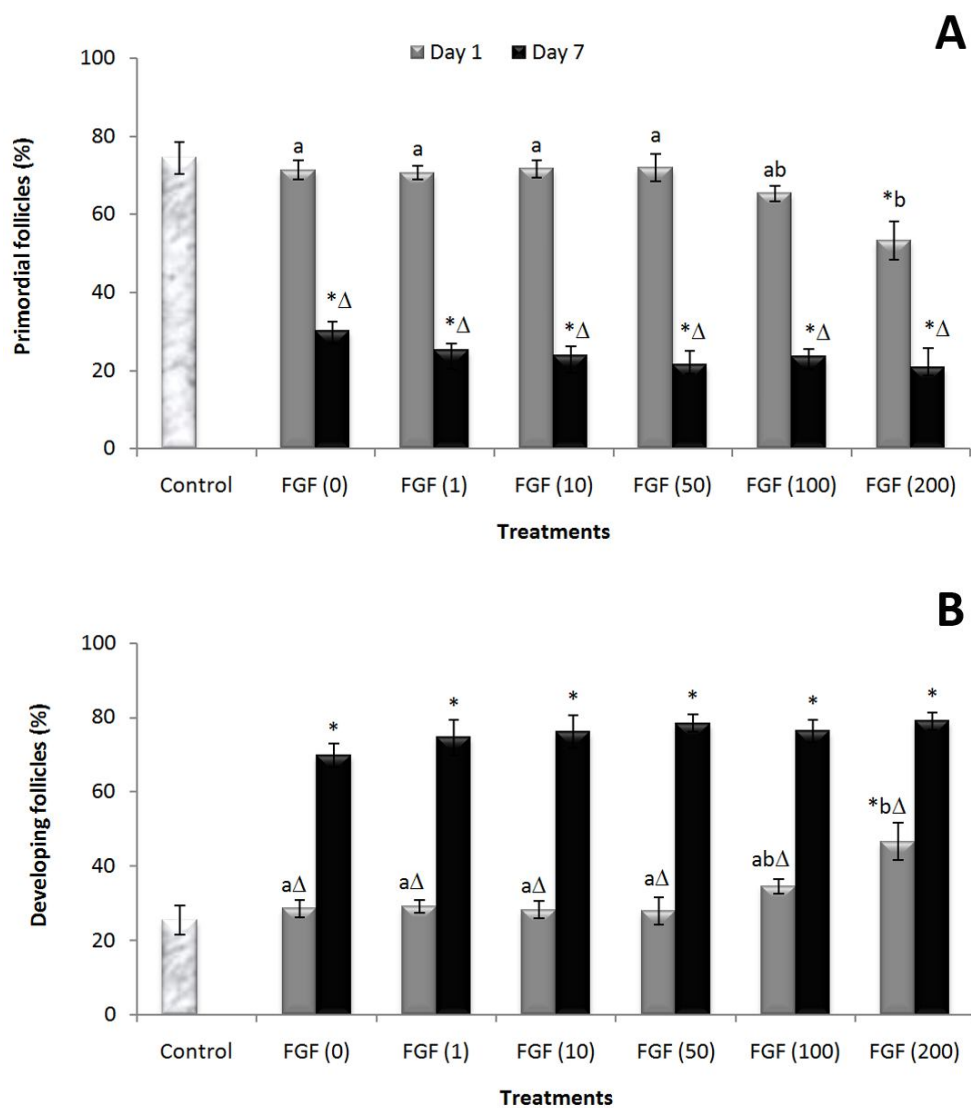
**Figure 2.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (non-cultured) and after 1 or 7 d culture with varying concentrations of FGF-10. \* Differs significantly from the fresh control ( $P<0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P<0.05$ ). <sup>Δ</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P<0.05$ ).

### 3.2 Follicular activation during *in vitro* culture of cortical fragments

The percentage of morphologically normal primordial and developing follicles (intermediate, primary and secondary) in fresh tissue or in tissues cultured for 1 or 7 d with different treatments is shown in Figure 3. Fresh ovarian tissues predominantly contain primordial follicles (74.5%) and a lower percentage of developing follicles (25.5%). After 7 d of culture, in all treatments, the percentage of primordial follicles (Figure 3A,  $P<0.05$ ) was

reduced, concomitant with a significant increase in the percentage of developing follicles (Figure 3B,  $P < 0.05$ ) compared to the fresh control. Moreover, on day 1, the addition of FGF-10 (200 ng/mL) to the culture medium significantly increased follicular transition from primordial compared to the fresh control, 0 ng/mL of FGF-10 dose and other groups cultured with FGF-10, except when used 100 ng/mL of FGF-10.

With the progression of the culture period from 1 to 7 d, the percentage of developing follicles in all treatments increased ( $P < 0.05$ ) in contrast to non-cultured control tissues. The mean distribution of developing follicles after 7 d of culture in all cultures combined was 64.0%, 33.5% and 2.5% for intermediate, primary and secondary follicles, respectively.



**Figure 3.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of (A) primordial and (B) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in non-cultured (fresh control) and tissues cultured for 1

or 7 d in the presence of varying concentrations of FGF-10. \* Differs significantly from the fresh control ( $P<0.05$ ). <sup>a,b</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P<0.05$ ). <sup>Δ</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P<0.05$ ).

### 3.3 Evaluation of oocyte and follicle diameter in fresh and cultured tissue

Table 1 shows the follicle and oocyte diameters before and after *in vitro* culture. After comparing fragments cultured for 1 d with non-cultured fragments, no significant differences were observed regarding to follicle diameter. However, after 7 d, follicular diameter was significantly higher in ovarian tissues cultured with 50 ng/mL of FGF-10 ( $P<0.05$ ) than those cultured with the same concentration at day 1 and the other treatments after 7 d. In addition, no significant influence of FGF-10 on oocyte diameter was observed after 1 and 7 d of culture ( $P>0.05$ ).

Table 1. Goat oocyte and follicle diameters (mean  $\pm$  SEM) in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 1 or 7 d in the absence or presence of various concentrations of FGF-10. The doses of FGF-10 were in ng/mL.

	Follicle diameter ( $\mu\text{m}$ )		Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
Non-cultured	69.22 $\pm$ 1.56		49.59 $\pm$ 1.41	
Cultured	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
FGF-10 (0)	70.92 $\pm$ 2.00	72.27 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>	52.68 $\pm$ 1.79	50.68 $\pm$ 1.85
FGF-10 (1)	72.15 $\pm$ 2.00	73.39 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	51.29 $\pm$ 1.58	54.69 $\pm$ 1.40
FGF-10 (10)	71.84 $\pm$ 1.65	69.83 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup>	51.91 $\pm$ 1.18	49.44 $\pm$ 2.44
FGF-10 (50)	74.16 $\pm$ 2.16 <sup>Δ</sup>	80.50 $\pm$ 2.20 <sup>*a</sup>	52.22 $\pm$ 1.31	55.00 $\pm$ 2.04
FGF-10 (100)	69.83 $\pm$ 2.29	69.99 $\pm$ 2.05 <sup>b</sup>	48.20 $\pm$ 1.43	49.90 $\pm$ 1.92
FGF-10 (200)	71.69 $\pm$ 1.53	68.29 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>	49.13 $\pm$ 1.55	49.29 $\pm$ 1.68

\* Differs from the fresh (non-cultured) control ( $P<0.05$ ). a,b Differs among concentrations within a column ( $P<0.05$ ). <sup>Δ</sup> Differs with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment within a row ( $P<0.05$ ).

### 3.4 Ultrastructural features of cultured follicles

Ultrastructural features of follicles evaluated in the fresh control (Figure 4A) and in the 50 ng/mL of FGF-10 (Figure 4B) treated group were similar. These follicles exhibited sparse vesicles spread throughout the ooplasm and had an intact oocyte, nuclear and basement membranes, as well as a large oocyte nucleus with decondensed chromatin and a visible nucleolus. In addition, the organelles were uniformly distributed in the homogeneous ooplasm such as rounded mitochondria with peripheral cristae and continuous mitochondrial membranes and both smooth and rough endoplasmic reticulum. Granulosa cells were ultrastructurally normal and well organized around the oocyte, showing an elongated and large nucleus with irregular membrane and a high nucleus-cytoplasm ratio.

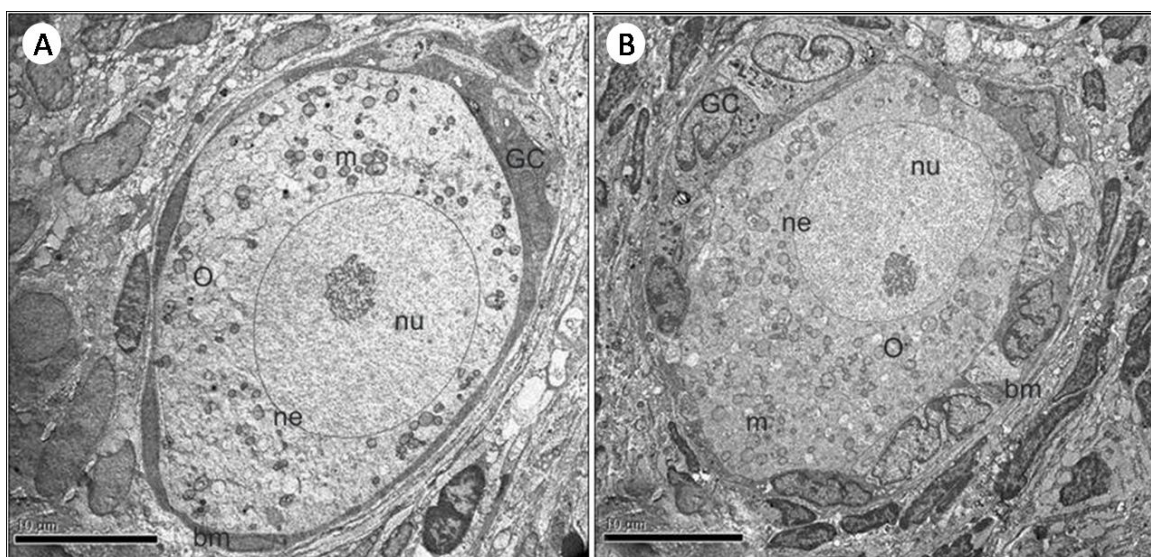


Figure 4. Electron micrographs of follicles before and after 7 d of culture. (A) Morphologically normal preantral follicle from non-cultured ovarian fragments (control; original magnification 3000 $\times$ ); (B) Morphologically normal preantral follicles after culture with 50 ng/mL FGF-10 (original magnification 3000 $\times$ ). O: oocyte; nu: nucleolus; GC: granulosa cell; ne: nuclear envelope; m: mitochondria; bm: basement membrane. Scale bars = 10  $\mu$ m.

### 3.5 Assessment of follicle viability after culture

Preantral follicles ( $n = 30$ ) were analyzed after 7 d of culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 50 ng/mL FGF-10. After this quantitative analysis, all follicles (100%;  $P > 0.05$ ) remained viable and were stained green by calcein-AM assays (Figure 5), confirming that this treatment

was able to maintain follicular viability. In addition, the percentage of viable follicles was similar to that seen in the fresh control group ( $P>0.05$ ).

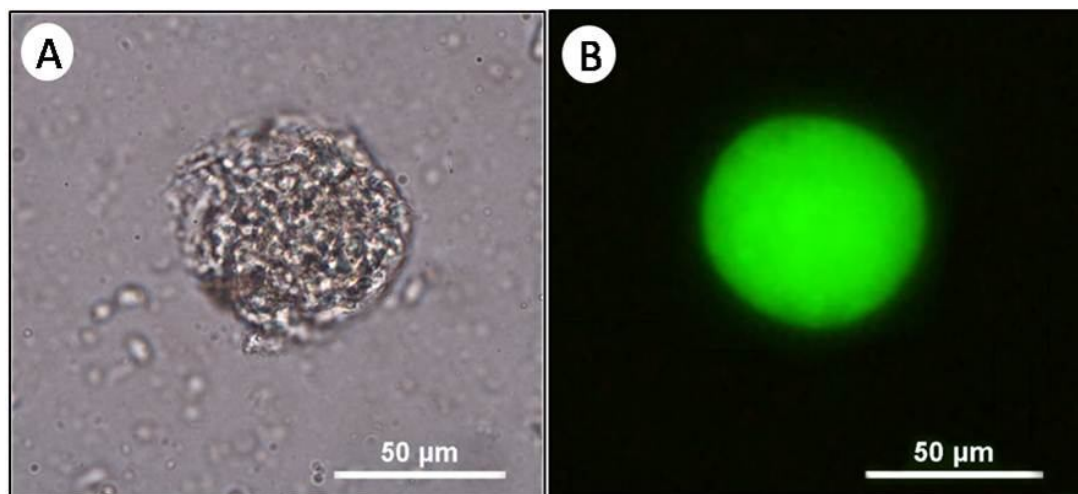


Figure 5. Viability assessment of goat preantral follicles using fluorescent probes. (A) An isolated preantral follicle after culture with 50 ng/mL FGF-10 that was classified as viable, (B) because cells were labeled by calcein-AM (green fluorescence). Scale bars = 50 µm.

#### 4. Discussion

The present study reports the influence of FGF-10 on the development of goat preantral follicles *in vitro*, demonstrating its importance in the maintenance of viability and further follicular growth. Maintenance of follicular viability is the prerequisite for culture of preantral follicles. The current study shows that addition of 50 ng/mL of FGF-10 was effective in maintaining a high percentage of morphologically follicles in cortical tissue cultured for 7 d. Thus, this FGF-10 concentration acts as a survival factor and/or atresia inhibitor, which progressively occurs with time in culture. This result is in agreement with results of Goldfarb [30] who demonstrated that FGF family members have a critical role in cell survival. Moreover, Kwabi-Addo et al. [31] demonstrated that FGFs can inhibit cell death in several tissues by preventing DNA injury induced by oxygen reactive species, which reduces the formation of  $H_2O_2$  [32]. Alternatively, in our study, extreme FGF-10 concentrations (i.e., 0, 1, 10, 100 or 200 ng/mL) caused a decrease in follicular viability after 7 d of culture. We infer that small concentrations of FGF-10 may be not sufficient to promote the maintenance of goat follicular survival. Nevertheless, high concentrations of FGF-10 may have a detrimental effect on follicular health, probably increasing follicular apoptosis via the activation of mitogen-activated



protein kinases (MAPK) pathway [23], which is involved in both cell survival and apoptosis with the specific cell response depending on the cellular context [33].

This study demonstrates a decrease in the number of primordial follicles and concomitant increase in the number of developing follicles in all treatments compared to the fresh control during *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue for 7 d in a defined medium. FGF-10 did not have an additional beneficial effect, except on day 1 of culture, in which the concentration of 200 ng/mL of FGF-10 promoted a higher percentage of developing follicles than 0 ng/mL of FGF-10 dose. Some studies using several growth factors and hormones were performed with goat species, showing similar results of follicular activation [24, 34, 35, 23, 36, 37]. Moreover, other study has shown that 10 ng/mL of FGF-2, another member of the FGF family, did not influence bovine primordial follicle activation [38]. According to other authors [39, 40], the transition from primordial to developing follicles during *in vitro* culture occurs spontaneously, i.e., without the addition of growth factors or hormones. The *in vitro* culture conditions may support the development of follicles enclosed in ovarian fragments, possibly through the release of stimulatory factors in the oocyte, granulosa, theca and stromal cells [36]. Another hypothesis is that *in vitro* culture appears to induce activation of primordial follicles because the media are richer in nutrients and/or oxygen than the ovarian cortex *in vivo* because the cortical region of the ovary is less vascularized than the medullary region [40].

An increase in follicular diameter was observed only after culture ovarian tissue for 7 d with 50 ng/mL of FGF-10 compared to the fresh control and other FGF-10 concentrations. However, FGF-10 did not have any influence on oocyte diameter. The FGF family is emerging as a group of factors that are potentially important for follicle growth [6]. Others have shown that FGF-10 is a mitogenic factor for epithelial cells [41, 42, 31] and has a high affinity for the FGFR-2b receptor [42]. Granulosa cells express the FGFR-2b receptor [10], and FGF-10 derived from the oocyte and theca cells most likely acts as a paracrine signal among oocyte, theca and granulosa cells. Most likely, 50 ng/mL of FGF-10 was a high enough concentration to stimulate the growth of numerous early unilaminar follicles, i.e., primordial and intermediate, but was not enough to promote further primary follicle growth. Moreover, in the present study, probably it is not possible to visualize any significant increase in oocyte growth because primordial and intermediate follicles had similar diameters [43].

Our results on follicular survival after classical histology were confirmed by ultrastructural analysis. Using TEM, it was observed that important cellular structures such as mitochondria, the endoplasmic reticulum, granulosa cells, and the basement and nuclear membranes were preserved after 7 d of culture in the presence of 50 ng/mL of FGF-10.

Therefore, this technique is an important tool to detect early morphological changes after follicular culture *in vitro*. In addition, according to Lopes et al. [44], follicular atresia changes occur first at the ultrastructural level before being able to be identified by light microscopy.

In addition to ultrastructural analysis, preantral follicles cultured for 7 d with 50 ng/mL of FGF-10 were further analyzed using a more accurate method based on fluorescent probes, which confirmed the previous results obtained with light and electron microscopy regarding to follicular survival. Thus, viability assessment appears to be a reliable, practical and fast method to analyze follicular viability. Recently, this method has also been used successfully to evaluate preantral follicle viability in goats [45, 46].

In conclusion, this study demonstrates that FGF-10 acts in a concentration (50 ng/mL)-dependent manner to maintain the morphological integrity of goat preantral follicles, and stimulate the growth of activated goat preantral follicles in culture. These results provide a basis for future studies of the appropriated culture conditions required to support complete preantral follicle growth and subsequent oocyte maturation *in vitro*.

### **Acknowledgments**

This research was supported by grants from CNPQ (RENORBIO: grant number 554812/2006-1) and FINEP – Brazil. Roberta Nogueira Chaves is a recipient of a grant from CNPq (Brazil).

### **Disclosures**

The authors declare that there is no potential conflict of interest that can be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **References**

- [1] Powers CJ, Mcleskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*. 2000; 7:165–197.
- [2] Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*. 2001; 2:1–12.
- [3] Baird A, Hsueh AJ. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul Pept*. 1986; 16:243–250.

- [4] Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 1992; 59:115-165.
- [5] Bottcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews.* 2005; 26:63–77.
- [6] Buratini J, Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MGL, Giometti I, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction.* 2005; 130:343-350.
- [7] Buratini J, Pinto MGL, Castilho AC, Amorim RL, Giometti IC, Portela VM, Nicola ES, Price CA. Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in Bovine Follicles. *Biol Reprod.* 2007; 77:743-750.
- [8] Machado MF, Portela MF, Price CA, Costa IB, Ripamonte P, Amorim RL, Buratini Jr J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *J Endocrinol.* 2009; 202:347–353.
- [9] Sordoillet C, Savona C, Chauvin MA, De Peretti E, Feige JJ, Morera AM, Benahmed M. Basic fibroblast growth factor enhances testosterone secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Mol Cell Endocrinol.* 1992; 89:163-171.
- [10] Berisha B, Sinowatz F, Schams D. Expression and Localization of Fibroblast Growth Factor (FGF) Family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev.* 2004; 67:162-171.
- [11] Berisha B, Steffl M, Amselgruber W, Schams D. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reprod Res.* 2006; 131:319-329.
- [12] Ware LB, Matthey MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation and repair. *Am. J. Physiol.* 2002; 282:924–940.
- [13] Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. FGF10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* 1999; 21:138-141.
- [14] Komi-Kuramochi A, Kawano M, Oda Y, Asada M, Suzuki M, Oki J, Imamura T. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *J Endocrinol.* 2005; 186:273–289.
- [15] Marguerie A, Bajolle F, Zaffran S, Brown NA, Dickson C, Buckingham ME, Kelly RG. Congenital heart defects in FGFR2-IIIb and FGF10 mutant mice. *Cardiovasc Res.* 2006; 71:50-60.

- [16] Spencer-Dene B, Sala FG, Bellusci S, Gschmeissner S, Stamp G, Dickson C. Stomach development is dependent on fibroblast growth factor 10/fibroblast growth factor receptor 2b mediated signaling. *Gastroenterology*. 2006; 130:1233-1244.
- [17] Veltmaat JM, Relaix F, Le LT, Kratochwil K, Sala FG, Van Veelen W, Rice R, Spencer-Dene B, Mailloux AA, Rice DP, Thiery JP, Bellusci S. Gli3-mediated somitic Fgf10 expression gradients are required for the induction and patterning of mammary epithelium along the embryonic axes. *Development*. 2006; 133:2325-2335.
- [18] Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, Harada H. Cessation of FGF10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 2006; 133:1359-1366.
- [19] Chen C, Spencer TE, Bazer FW. Fibroblast growth factor-10: a stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biol Reprod*. 2000; 63:959–966.
- [20] Castilho AC, Giometti IC, Berisha B, Schams D, Price CA, Amorim RL, Papa PC, Buratini JR. Expression of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in the Bovine Corpus Luteum. *Mol Reprod Dev*. 2008; 75:940–945.
- [21] Taniguchi F, Harada T, Iwabe T, Ohama Y, Takenaka Y, Terakawa N. Aberrant expression of keratinocyte growth factor receptor in ovarian surface epithelial cells of endometrioma. *Fertil Steril*. 2008; 89:478–480.
- [22] 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. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*. 2008; 20:640-647.
- [23] Taniguchi F, Harada T, Sakamoto Y, Yamauchi N, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway by Keratinocyte Growth Factor or Fibroblast Growth Factor-10 Promotes Cell Proliferation in Human Endometrial Carcinoma Cells. *Endocrinol Metab*. 2003; 88:773–780.
- [24] Zhou H, Zhang Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats Domestic. *Anim Endocrinol*. 2005; 28:235–242.
- [25] Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, Sekine K, Ohuchi H. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*. 2002; 129:1533-1541.

- [26] Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia Jr JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão SN, Lucci CM, Figueiredo JR. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*. 2007; 15:173-182.
- [27] Silva JRV, Hurk VD, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci*. 2004; 81:273-286.
- [28] Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. 1999; 56:39-49.
- [29] Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 3rd Ed. McGraw-Hill, New York, NY, 666p., 1997.
- [30] Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1996; 7:311-325.
- [31] Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2004; 11:709-724.
- [32] Upadhyay D, Bundesmann M, Panduri V, Correa-Meyer E, Kamp DW. Fibroblast Growth Factor-10 Attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Alveolar Epithelial Cell DNA Damage. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31:107-113.
- [33] Lin A. 2002. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioassays*, 25:17-24.
- [34] Martins FS, Van Den Hurk R, Santos RR, Silva JRV, Matos MHT, Celestino JJH, Rodrigues APR, Pessoa C, Ferreira FVA, Figueiredo JR. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Anim Reprod*. 2005; 2:106-113.
- [35] Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, Van Der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van Den Hurk R. The Activin-Follistatin System and *In vitro* Early Follicle Development in Goats. *J Endocrinol*. 2006; 189:113-125.
- [36] Bruno JB, Lima-Verde IB, Martins FS, Matos MHT, Lopes CAP, Maia-Jr JE, Bão SN, Nobre Junior HV, Maia FD, Pessoa C, Moraes MO, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2008; 60:1329-1337.
- [37] Lima-Verde IB, Matos MHT, Bruno JB, Martins FS, Santos RR, Bão SN, Luque MCA, Vieira GAB, Silveira ER, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Oliveira MAL, Lima PF. Effects of

$\alpha$ -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2009; 61:57-65.

[38] Derrar N, Price CA, Sirard MA. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. Theriogenology. 2000; 54:587–598.

[39] Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srsen V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. Theriogenology. 1998; 49:441-449.

[40] Cushman RA, Wahl CM, Fortune JE. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: A model for studies on the activation of primordial follicles. Hum Reprod. 2002; 17:48-54.

[41] Spencer TE, Stagg AG, Joyce MM, Jenster G, Wood CG, Bazer FW, Wiley AA, Bartol FF. Discovery and characterization of endometrial epithelial messenger ribonucleic acids using the ovine uterine gland knockout model. Endocrinology. 1999; 140:4070–4080.

[42] Ohuchi H, Ohchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. Biochem Bioph Res Comm. 2000; 277:643-649.

[43] Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev. 1996; 17:121-155.

[44] Lopes CAP, Santos RR, Celestino, JJH, Melo MA, Chaves RN, Campello CC, Silva JR, Bao SN, Jewgenow K, Figueiredo JR. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. Anim Reprod Sci. 2009; 115:201-214.

[45] Bruno JB, Celestino JJH, Lima-Verde IB, Lima LF, Matos MHT, Araújo VR, Saraiva MVA, Martins FS, Name KPO, Campello CC, Bao SN, Silva JRV, Figueiredo JR. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. Reprod Fertil Dev. 2009; 21:679–687.

[46] Rosseto R, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Martins FS, Faustino LS, Araújo VR, Silva CM, Name KP, Bao SN, Campello CC, Figueiredo JR, Blume H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. Domest Anim Endocrinol. 2009; 37:112-123.

**Como a concentração de insulina afeta o desenvolvimento de folículos pré-antrais em cabras**

*(How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats)*

**Periódico:** *Cell & Tissue Research*, 346(3): 451-456, 2011.

## **Resumo**

Esse estudo investigou o efeito da adição de diferentes concentrações de insulina ao meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Os fragmentos ovarianos foram imediatamente fixados ou cultivados por 7 dias em MEM com insulina (0, 5, 10 ng/mL e 5 ou 10 µg/mL). Os resultados mostraram que, após 7 dias de cultivo, insulina a 10 ng/mL foi a melhor concentração para preservar a viabilidade e ultraestrutura folicular, resultando em altas taxas de folículos normais. Após 7 dias, somente o tratamento com 10 ng/mL e 5 µg/mL de insulina aumentou a ativação folicular quando comparada a outras concentrações. Com relação ao crescimento folicular e oocitário, a presença de 10 ng/mL de insulina promoveu um maior diâmetro que os outros tratamentos. Em conclusão, esse estudo mostrou que a adição de 10 ng/mL de insulina ao meio de cultivo melhorou a sobrevivência e estimulou o crescimento de folículos pré-antrais caprinos.

**Palavras-chave:** Insulina, folículo pré-antral, cabra, viabilidade, ovário.



## **How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats**

R.N. Chaves<sup>a\*</sup>, A.M.C.V. Alves<sup>a</sup>, L.R. Faustino<sup>a</sup>, K.P.L. Oliveira<sup>a</sup>, C.C. Campello<sup>a</sup>, C.A.P. Lopes<sup>a</sup>, S.N. Bão<sup>b</sup>, J.R. Figueiredo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Campus Itaperi, Fortaleza, 60740-903, CE, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, DF, Brazil.

\* Correspondence should be addressed to:

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: 60740-903

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rncvet@gmail.com (Roberta Nogueira Chaves)

## Abstract

This study investigated the effect of adding different insulin concentrations to the culture medium for goat preantral follicle development *in vitro*. The ovarian fragments were immediately fixed or cultured for 7 d in MEM with insulin (0, 5, 10 ng/mL and 5 or 10 µg/mL). The results showed that, after 7 d of culture, insulin at 10 ng/mL was the best concentration to preserve follicular viability and ultrastructure, resulting in the highest rates of normal follicles. After 7 d, only treatments with 10 ng/mL and 5 µg/mL of insulin increased follicular activation when compared to other concentrations. Regarding follicular and oocyte growth, the presence of 10 ng/mL of insulin promoted a larger diameter than other treatments. In conclusion, this study shows that addition of 10 ng/mL of insulin to the culture medium improved the survival and stimulated growth of goat preantral follicles.

**Keywords:** Insulin, preantral follicle, goat, viability, ovary.

## Introduction

Insulin is a protein secreted by pancreatic  $\beta$ -cells, and it plays a central role in body metabolism and acts in the regulation of ovarian function (Selvaraju et al. 2003). Many studies have identified the ovary as a target organ because its receptors are widely distributed in all of the ovarian compartments, including granulosa, theca, stroma and oocyte (Phy et al. 2004) and due to its effects on follicle cells, from early developmental stages to oocyte maturation (Young and McNeilly 2010). In goats, a supra-physiological concentration of insulin has routinely been added to basic culture medium through the use of a commercial product called ITS (10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin and 5 ng/mL sodium selenite). This procedure has produced positive results in the survival and development of preantral follicles but only when other hormones and growth factors are employed (Matos et al. 2007; Saraiva et al. 2008; Celestino et al. 2009; Martins et al. 2010). Nevertheless, if used alone in culture medium, 10 µg/mL of insulin (ITS) is not able to maintain the follicle ultrastructure after *in vitro* culture for 7 d (Chaves et al. 2010; Faustino et al. 2011). In this context, the question arises whether the use of lower insulin concentrations could maintain the follicle ultrastructure and promote the survival and development goat preantral follicles. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of adding different concentrations of insulin to the culture medium on the survival and growth of goat preantral follicles after *in vitro* culture.

## Material and Methods

Ovaries from 7 adult, mixed-breed goats were collected from a local slaughterhouse. After slaughter, the ovaries were washed once in 70% alcohol and then twice in MEM with HEPES supplemented with antibiotics. Unless mentioned otherwise, all chemicals were used from Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). In the laboratory, the cortex from each pair of ovaries was then removed and cut into 13 fragments (9 mm<sup>3</sup>). The fragments were placed in MEM with HEPES and then one slice of tissue was immediately fixed for histological and ultrastructural analysis (fresh control: day 0). The remaining slices of ovarian cortex were cultured individually for 1 and 7 d in 1 mL of culture medium, in 24-well culture dishes at 39 °C, in an atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> in air. The basic control medium consisted of  $\alpha$ -MEM (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) supplemented with 1.25 mg/mL BSA, 5.5  $\mu$ g/mL transferrin, 5.0 ng/mL sodium selenite, 2 mM glutamine and 2mM hypoxanthine. The ovarian slices were distributed into treatments: with  $\alpha$ -MEM alone (0 ng/mL of insulin) or associated with recombinant human insulin at different concentrations (5 or 10 ng/mL and 5 or 10  $\mu$ g/mL). Every two days, half of the culture medium was refreshed.

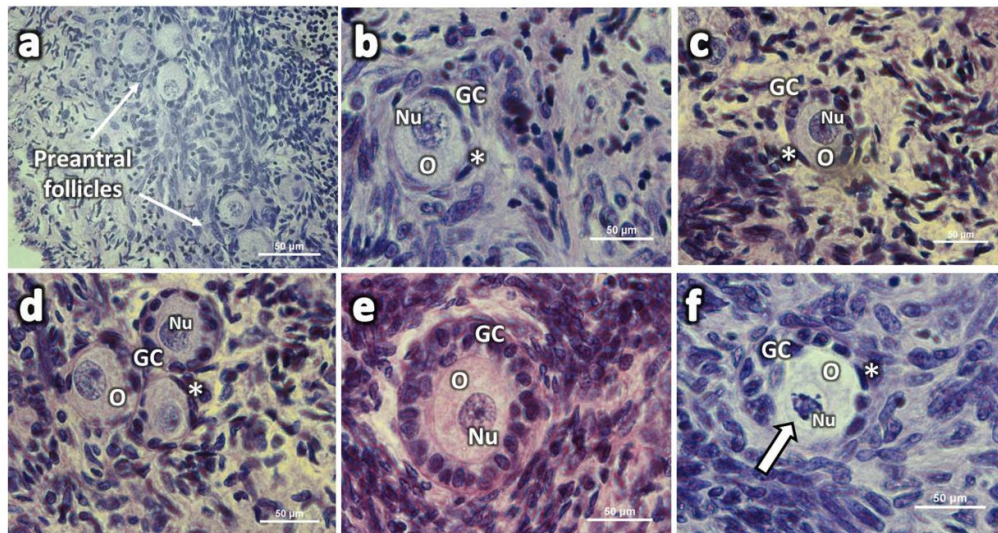
Fresh control and cultured tissues were processed for histology and analyzed in regard to development parameters as described by Silva et al. (2004). Follicular viability was assessed by epifluorescence microscopy using a marker for live (calcein-AM) or dead (ethidium homodimer-1) cells as previously described by Silva et al. (2010). Ultrastructural analysis followed the parameters applied by Nottola et al. (2008) with moderate modifications.

The mean number of the surviving follicles was submitted to Shapiro-Wilk and Bartlett's tests. ANOVA and Dunnett's test was applied to compare the insulin-treated groups to the group insulin-free. The SNK test was used for comparisons among the treatments with different insulin concentrations and between follicles found at 1 and 7 d of culture. Follicular viability was analyzed using the Chi-square test. The differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

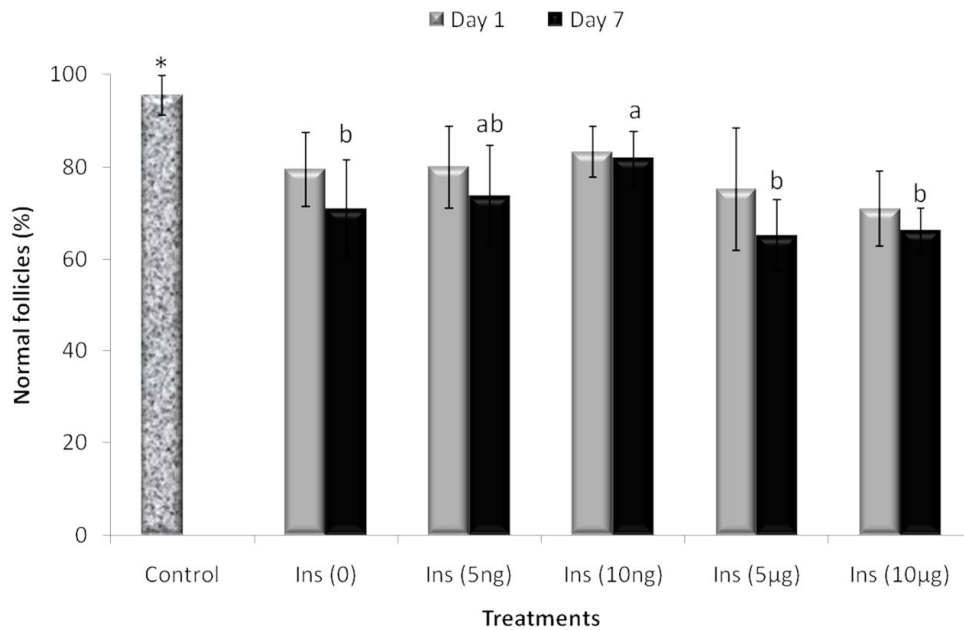
## Results

Fig. 1 shows the morphologically normal or degenerated follicles after *in vitro* culture. After 1 or 7 d of *in vitro* culture, a reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of normal follicles occurred in all of the treatments when compared to the fresh control (Fig. 2). After 7 d, a higher

percentage of normal follicles in tissues cultured with 10 ng/mL of insulin was observed compared to all other treatments ( $P<0.05$ ; Fig. 2).

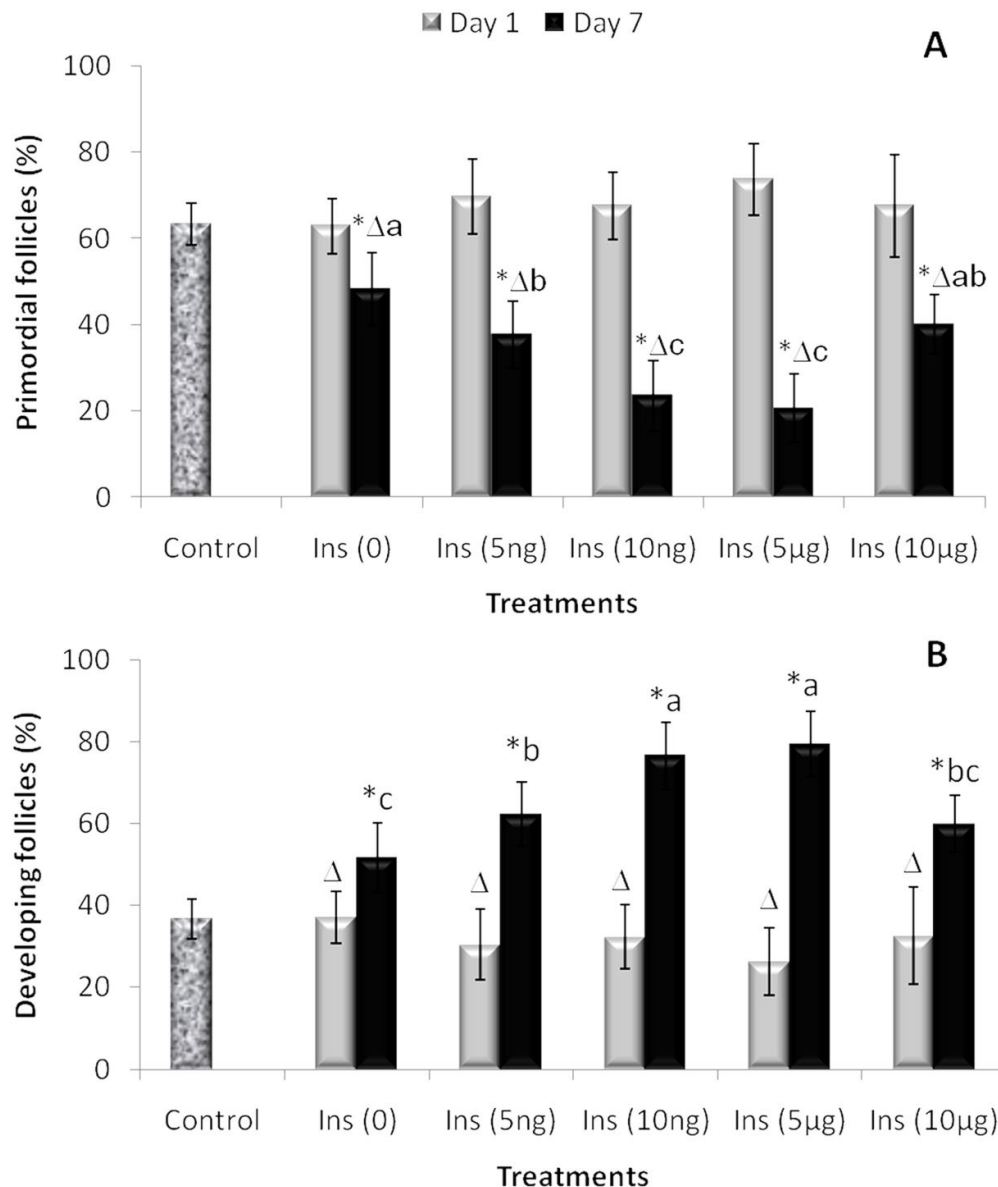


**Fig. 1** Representative image of goat ovarian fragments on day 0 (fresh control, a) and after 1 or 7 d culture in the presence of 0 ng/mL (b-c) and 10 ng/mL (d-e) of insulin or after 7 d culture with 5  $\mu$ g/mL (f) of insulin. Degenerated preantral follicles often displayed pyknotic nuclei (f, arrow). Scale bars represent 50  $\mu$ m. O, oocyte; Nu, oocyte nucleus; GC, granulosa cells. 400x magnification, PAS-hematoxylin



**Fig. 2** Percentage (mean  $\pm$  SD) of morphologically normal preantral follicles in the fresh control (noncultured) and after *in vitro* culturing for 1 or 7 d with varying concentrations of insulin. \* Differs significantly from the fresh control ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P < 0.05$ )

After 7 d of culture, the percentage of primordial follicles (Fig. 3a,  $P < 0.05$ ) was reduced, in all treatments, concomitant with a significant increase in the percentage of developing follicles (Fig. 3b,  $P < 0.05$ ), when compared to the fresh control. Moreover, on day 7, the addition of insulin (10 ng/mL and 5  $\mu$ g/mL) to the culture medium significantly increased follicular activation compared to the other treatments.



**Fig. 3** Percentage (mean  $\pm$  SD) of (a) primordial and (b) developing follicles (intermediate, primary and secondary) in fresh control (noncultured) and tissues cultured for 1 or 7 d in the presence of varying concentrations of insulin. \* Differs significantly from the fresh control ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P < 0.05$ ). <sup>Δ</sup> Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P < 0.05$ )

The follicle and oocyte diameters were evaluated and shown in Table 1. After 7 d of culture, a significant increase in follicular diameter was observed in all of the treatments compared to the fresh control, except in the treatment containing 10  $\mu\text{g/mL}$  of insulin. In

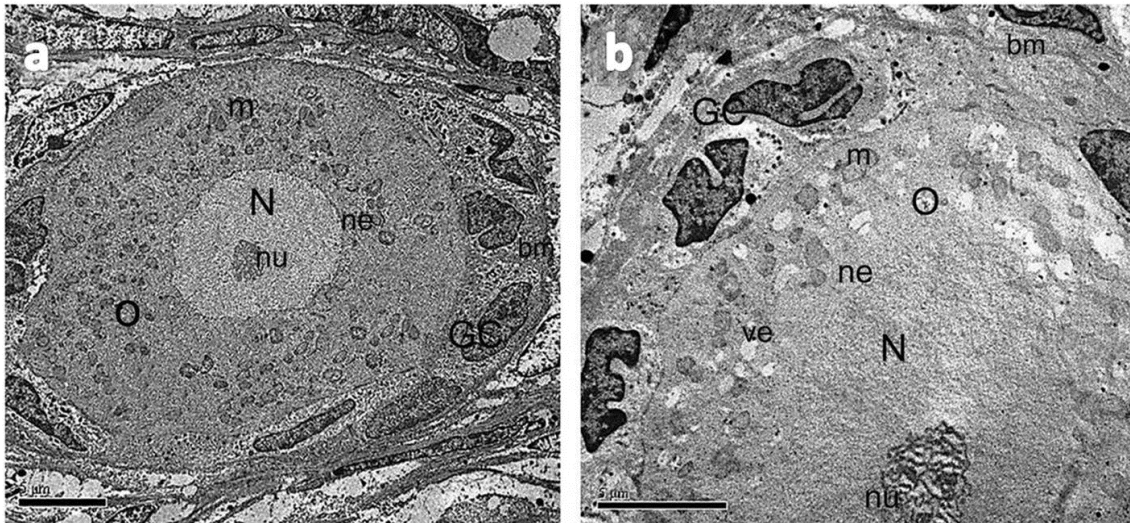
general, the tissues cultured in the presence of 10 ng/mL of insulin showed significantly larger oocyte and follicle diameters than the other treatments in the same period ( $P<0.05$ ).

**Table 1** Goat oocyte and follicle diameters (mean  $\pm$  SD) in fresh control (noncultured) and in tissues cultured for 1 or 7 d in the absence or presence of various concentrations of insulin.

	Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ )		Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )	
Noncultured	27.96 $\pm$ 3.80		21.05 $\pm$ 4.38	
Cultured	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
Ins (0 ng/mL)	27.64 $\pm$ 4.15	29.69 $\pm$ 6.05 <sup>*bc</sup>	19.61 $\pm$ 3.94	20.82 $\pm$ 3.59 <sup>ab</sup>
Ins (5 ng/mL)	28.95 $\pm$ 5.92	30.89 $\pm$ 4.21 <sup>*b</sup>	20.49 $\pm$ 5.31	19.86 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>
Ins (10 ng/mL)	29.12 $\pm$ 5.22 <sup><math>\Delta</math></sup>	35.08 $\pm$ 3.92 <sup>*a</sup>	18.90 $\pm$ 2.72 <sup><math>\Delta</math></sup>	23.04 $\pm$ 3.64 <sup>a</sup>
Ins (5 $\mu\text{g/mL}$ )	28.03 $\pm$ 5.07 <sup><math>\Delta</math></sup>	32.21 $\pm$ 4.34 <sup>*b</sup>	18.47 $\pm$ 2.77 <sup><math>\Delta</math></sup>	20.96 $\pm$ 3.00 <sup>ab</sup>
Ins (10 $\mu\text{g/mL}$ )	28.27 $\pm$ 6.04	28.45 $\pm$ 3.18 <sup>c</sup>	18.66 $\pm$ 4.45	20.07 $\pm$ 2.82 <sup>b</sup>

\* Differs significantly from the fresh control ( $P<0.05$ ). <sup>a,b,c</sup> Differs significantly among concentrations within each day of culture ( $P<0.05$ ).  <sup>$\Delta$</sup>  Differs significantly with the progression of the culture period from days 1 to 7 in the same treatment ( $P<0.05$ )

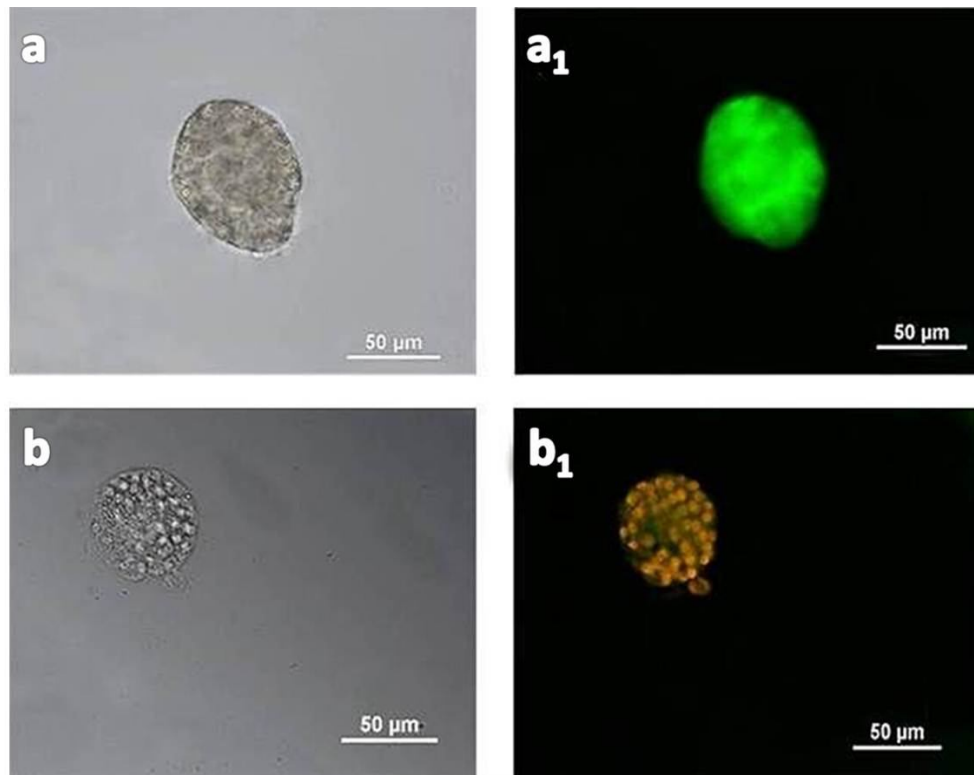
The ultrastructural features of the follicles evaluated in the fresh control (Fig. 4a) and in the group treated with 10 ng/mL of insulin (Fig. 4b) were similar ( $P>0.05$ ). These follicles exhibited an intact cytoplasmic membrane, normal and uniformly distributed organelles, especially mitochondria and endoplasmic reticulum, and intact oocyte nucleus. Only the cultured follicles exhibited sparse vesicles spread throughout the ooplasm (Fig. 4b).



**Fig. 4** Electron micrographs of follicles before and after 7 d of culture. (a) Morphologically normal preantral follicle from noncultured ovarian fragments (fresh control; original magnification 4000x); (b) Morphologically normal preantral follicles after culture with 10 ng/mL insulin (original magnification 6000x). O, oocyte; nu, nucleolus; N, nucleus; GC, granulosa cell; ve, vesicle; ne, nuclear envelope; m, mitochondria; bm, basement membrane. Scale bars = 5  $\mu$ m

Viable follicles (Fig. 5a-a<sub>1</sub>) were positively stained with calcein-AM, while non-viable were stained with ethidium homodimer (Fig 5b-b<sub>1</sub>). After this quantitative analysis, all of the follicles (100%) remained viable in treatment with 10 ng/mL of insulin and were similar to the fresh control and stained green by calcein-AM assays (Fig. 5a-a<sub>1</sub>;  $P < 0.05$ ).





**Fig. 5** Viability assessment of goat preantral follicles using fluorescent probes. Isolated preantral follicles after *in vitro* culture in medium contain 10 ng/mL of insulin in a bright field (a) and labeled with calcein-AM (a<sub>1</sub>) and follicle noncultured (fresh control) in a bright field (b) and labeled with ethidium homodimer-1 (b<sub>1</sub>) (Scale bars = 50 µm; 400x magnification)

## Discussion

The findings of the present study demonstrated that addition of 10 ng/mL of insulin to the culture media was more efficient in maintaining the percentage of morphologically normal preantral follicles after 7 d of culture. Also, the addition of 10 ng/mL of insulin maintained the ultrastructural organization of the follicles and their viability after 7 d of culture. The beneficial effect of insulin on survival is likely due to its direct action on the maintenance of metabolic balance through the regulation of specific functions related to the synthesis of glycogen, lipids, proteins and nucleic acids (Cheatham and Khan 1995). In addition, insulin can maintain survival indirectly by stimulating the action of other substances such as FSH and insulin-like growth factor I (IGF-I), which are known to promote follicular viability in goats (Matos et al. 2007; Martins et al. 2010). Our results were corroborated by studies that showed an increase in the percentage of follicular atresia, and the consequent reduction in survival, in media without insulin or at high doses of this hormone (Wright et al. 1999).

In the present study, only 10 ng/mL of insulin increased follicular diameter after 7 d of culture compared to other treatments. This concentration also promoted a greater follicular activation. Because the major morphological difference between the primordial and the primary follicles is the transition of flattened granulosa cells to cuboidal granulosa cells, the first stage of follicular growth may significantly depend on the development of the somatic cells (Yu and Roy 1999). Insulin is commonly added to culture medium for the *in vitro* growth and activation of primordial follicles in cultured ovaries, especially in the presence of a moderate dose (0.1 µg/mL) (Adhikari and Liu 2009). With regard to oocyte growth, the treatment with 10 ng/mL of insulin was more efficient in increasing the oocyte diameter compared to 5 ng/mL and 10 µg/mL of insulin. High insulin levels also produce adverse effects on the nuclear maturation of oocytes after follicle culture (Fouladi-Nashta and Campbell 2006). When Sun et al. (2010) cultured fetal mouse ovaries with 5 µg/mL of insulin, it was demonstrated that insulin has a profound detrimental effect on oogenesis and folliculogenesis *in vitro*, with significant retardation of oocyte growth. Paradoxically, in the present study, the concentration of 5 µg/mL insulin did not impair oocyte growth. This result suggests that goats may need larger doses of insulin to cause this side effect, as we observed with 10 µg/mL of insulin.

In conclusion, we clearly demonstrated that the exposure of goat preantral follicles to 10 ng/mL of insulin improved all parameters analyzed. Thus, this study characterizes a new culture basic medium for goat, reducing the concentration of insulin currently used by 10<sup>3</sup> times, improving the follicular development and providing benefits for the subsequent maturation of oocytes.

### **Acknowledgments**

This work was supported by CNPq (RENORBIO). R.N. Chaves is a recipient of a grant from CNPq (Brazil). The authors thank Khesller Patricia Olazia Name for her assistance in processing the samples for the ultrastructural assessment.

### **References**

- Adhikari D, Liu K (2009) Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocrine Reviews* 30:438–464
- Celestino JJ, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MH, Saraiva MV, Chaves RN, Martins FS, Lima LF, Name KP, Campello CC, Silva JR, Bão SN, Figueiredo JR (2009) Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reprod Sci* 16:239-246

Chaves RN, Alves AMCV, Duarte ABG, Araújo VR, Celestino JJH, Matos MHT, Lopes CAP, Campello CC, Name KPO, Bão SN, Figueiredo JR (2010) Nerve Growth Factor Promotes the Survival of Goat Preantral Follicles Cultured *in vitro*. *Cells Tissues Organs* 192:272-282

Cheatham B, Kahn CR (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16:117-142

Faustino LR, Rossetto R, Lima IM, Silva CM, Saraiva MV, Lima LF, Silva AW, Donato MA, Campello CC, Peixoto CA, Figueiredo JR, Rodrigues AP (2011) Expression of Keratinocyte Growth Factor in Goat Ovaries and Its Effects on Preantral Follicles Within Cultured Ovarian Cortex. *Reprod Sci in press*

Fouladi-Nashta AA, Campbell, KHS (2006) Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction* 131:449–460

Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Bruno JB, Almeida AP, Cunha RMS, Silva JRV, Campello CC, Lucci CM, Matos MHT, Figueiredo JR (2010) Expression of protein and mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. *Anim Reprod* 7:349-361

Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JE, Jr 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

Muruvi W, Fortune JE (2009) Kit ligand-KIT interaction is required for follicle activation and mediates insulin-stimulated activation of bovine primordial follicles in-vitro. *Biol Reprod* 81:200

Nottola SA, Camboni A, Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Correr S, Donnez J (2008) Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril* 90:23-32

Phy JL, Conover CA, Abbott DH, Zschunke MA, Walker DL, Session DR, Tummon IS, Thornhill AR, Lesnick TG, Dumesic DA (2004) Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3561–3566

Saraiva MVA, Celestino JJH, Chaves RN, Martins FS, Bruno JB, Lima Verde IB, Matos MHT, Silva GM, Porfirio EP, Bão SN, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR (2008) Influence of different concentrations of LH and FSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. *Small Rumin Res* 78:87–95

- Selvaraju S, Agarwal SK, Karche SD, Majumdar AC (2003) Ovarian response, embryo production and hormone prolife in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology* 59:1459-1468
- Silva CMG, Faustino LR, Saraiva MVA, Rossetto R, Figueiredo JR (2010) Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. *Rev Bras Reprod Anim* 34:233-242
- Silva JRV, Hurk VD, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR (2004) Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci* 81:273–286
- Sun LL, Sun ZY, Zhang P, Zhai XW, Tang J, Pan QJ, Shi QH, Shen W (2010) Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system. *Reprod BioMed Online* 20:11–25
- Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S, Hardy K (1999) Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Hum Reprod* 14:1555-1562
- Young JM, McNeilly AS (2010) Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140:489–504
- Yu N, Roy SK (1999) Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary *in vitro*: effect of insulin. *Biol Reprod* 61:1558–1567

**Os efeitos da insulina e FSH durante o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, e a expressão relativa de RNAm para os receptores de insulina e FSH e do citocromo P450 aromatase em folículos cultivados**

*(The effects of insulin and FSH during in vitro development of isolated goat preantral follicles, and the relative mRNA expression of insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles)*

**Periódico:** *Reproduction (Submetido em 24/10/2011).*

## Resumo

A ação de diferentes concentrações de insulina, sozinha ou em combinação com FSH, foram avaliadas no desenvolvimento *in vitro* e na expressão de RNAm para aromatase P450 (*P-450AROM*) e receptores para insulina (*INSR*) e FSH (*FSHR*). Folículos pré-antrais caprinos foram microdissecados e cultivados em  $\alpha$ -MEM com ou sem insulina (5, 10 ng/mL ou 10  $\mu$ g/mL) ou em combinação com o FSH por 18 dias. Após 18 dias, a adição de uma alta concentração de insulina ao meio de cultivo reduziu significativamente a sobrevivência folicular e a taxa de formação de antro quando comparado com os outros tratamentos. Entretanto, quando o FSH foi adicionado ao meio de cultivo, nenhuma diferença foi observada entre esses dois parâmetros. Folículos pré-antrais e antrais do controle, bem como de todos os folículos cultivados, apresentaram um padrão ultraestrutural normal. O crescimento folicular aumentou a partir do dia 12, e somente nas concentrações de 10 ng/mL e 10  $\mu$ g/mL de insulina sem FSH comparado com o grupo controle. Em meio suplementado com FSH, somente a adição de 10 ng/mL de insulina produziu oócitos com altas taxas de retomada da meiose e em metáfase II quando comparado ao grupo controle. O tratamento com insulina (10 ng/mL) e FSH resultou em níveis significativamente maiores de RNAm para *INSR* e *P-450AROM* e secreção de estradiol quando comparado aos outros grupos de tratamentos. Em conclusão, 10 ng/mL de insulina com FSH foi o tratamento mais eficiente na promoção da retomada da meiose de oócitos, mantendo a sobrevivência oocitária, estimulando o desenvolvimento folicular e aumentando a expressão de RNAm para *INSR* e *P-450AROM*, bem como a secreção de estradiol em folículos caprinos.

**Palavras-chave:** Folículo secundário, cabra, insulina, FSH, *P-450AROM*.

**The effects of insulin and FSH during *in vitro* development of isolated goat preantral follicles, and the relative mRNA expression of insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles**

*Short title: Insulin and FSH in the follicular development*

R.N. Chaves<sup>1\*</sup>, A.B.G. Duarte<sup>1</sup>, G.Q. Rodrigues<sup>1</sup>, J.J.H. Celestino<sup>2</sup>, G.M. Silva<sup>1</sup>, C.A.P. Lopes<sup>1</sup>,  
A.P. Almeida<sup>1</sup>, M.A.M. Donato<sup>3</sup>, C.H. Lobo<sup>4</sup>, Y. Locatelli<sup>5</sup>, P. Mermillod<sup>5</sup>, C.C. Campello<sup>1</sup>,  
J.R. Figueiredo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles, Faculty of Veterinary, State University of Ceara, Fortaleza-CE, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Histology, Coordination of Nursing, University of International Integration of Lusophone African-Brazilian, Redenção-CE, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Ultrastructure, CPqAM/Fiocruz, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Science, Federal University of Ceara, Fortaleza-CE, Brazil.

<sup>5</sup>Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Université Tours, Nouzilly, France

\* Correspondence should be addressed to:

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: 60740-903

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rncvet@gmail.com (Roberta Nogueira Chaves)

## Abstract

The action of different concentrations of insulin, alone or in combination with FSH, were evaluated on the *in vitro* follicular development and the mRNA expression for P450 aromatase (*P-450AROM*), insulin (*INSR*) and FSH (*FSHR*) receptors. Goat preantral follicles were microdissected and cultured in  $\alpha$ -MEM with or without insulin (5, 10 ng/ml or 10  $\mu$ g/ml) or in combination with FSH for 18 d. After 18 d, the addition of the maximum concentration of insulin to the culture medium significantly reduced follicular survival and antrum formation rates when compared with other treatments. However, when FSH was added to the culture media, no difference was observed in these two parameters. Preantral and antral follicles from the control, as well as from all cultured follicles, still had normal ultrastructural patterns. Follicular growth increased starting on day 12, and only at concentrations of 10 ng/ml and 10  $\mu$ g/ml of insulin without FSH when compared with the control group. In the supplemented medium with FSH, only addition of 10 ng/ml insulin produced oocytes with higher rates of meiosis resumption and in metaphase II when compared with the control group. Treatment with insulin (10 ng/ml) and FSH resulted in significantly increased levels for *INSR*, *P-450AROM* mRNA and estradiol secretion when compared with the other treatment groups. In conclusion, 10 ng/ml of insulin with FSH was the most efficient treatment in promoting oocyte meiosis resumption, maintaining oocyte survival, stimulating follicular development, and increasing mRNA expression for *INSR* and *P-450AROM*, as well as estradiol secretion in goat follicles.

**Keywords:** Secondary follicle, goat, insulin, FSH, *P-450AROM*.

## Introduction

The development of ovarian follicles, oocytes and embryos depend upon the spatial and temporal expression of specific genes and a continuous supply of energy, hormones and growth factors (Fouladi-Nashta and Campbell, 2006). One of the hormones involved in this process is insulin, a polypeptide produced by pancreatic  $\beta$  cells, which is primarily involved in the regulation of serum glucose concentrations. Insulin is also involved in the regulation of cell growth and development in a wide variety of tissues including the liver, muscle, cartilage, mammary glands and ovaries (Sasaki, 2002).

In the ovary, insulin acts as an important mediator of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and the subsequent development of the embryo (Yaseen *et*



*al.* 2001). It is routinely added to the culture media of cells and tissues (Fouladi-Nashta and Campbell, 2006). Insulin's actions are mediated through insulin receptors (INSR), which were first identified in the granulosa cells of preantral human follicles (Willis and Franks, 1995). More recently, it was shown that the INSR are widely distributed throughout all ovarian tissues, including the granulosa and theca cells and stromal tissue in bovine species (Shimizu *et al.* 2008).

Previous studies have shown that insulin is important in various reproductive processes, such as regulating the neurotransmitter synthesis of GnRH, and therefore controlling gonadotropin secretion. This is particularly important in the release of LH by the pituitary (Kawauchi *et al.* 2006). In mice, gonadotropins (LH and FSH) and insulin are considered major regulators of cell proliferation, differentiation and survival in cultured ovarian follicles (Sánchez *et al.* 2011).

Insulin acts synergistically with FSH to promote granulosa cell differentiation and proliferation. It also facilitates FSH-dependent steroid production and LH receptor induction in cultured granulosa cells (May *et al.* 1980; Duleba *et al.* 1997). In the presence of FSH, insulin was able to increase the production of estrogen and progesterone by granulosa cells in women (Willis *et al.* 1996). *In vitro* studies with bovine granulosa cells cultured in serum-free medium demonstrated FSH's ability to increase both the production of estradiol and the expression for *P-450AROM* mRNA (Silva and Price 2000). The presence of insulin has been shown to enhance this effect (Silva and Price 2002).

However, in the case of exposure to non-physiological high levels of insulin and FSH, granulosa cells differentiate inappropriately, expressing *LH* mRNA from very early stages. They also later show a divergent cumulus cell pattern of mRNA levels and protein synthesis. This, in turn, correlates with deleterious effects on the developmental capacity of oocytes (Latham *et al.* 1999; Acevedo *et al.* 2007).

Thus, although insulin is able to act on many organs, including the ovary, and is routinely used as an important supplement for the *in vitro* culture of preantral follicles in several species, little is known about its effect with or without FSH during the *in vitro* development of goat preantral follicles. Given the importance of insulin and FSH in *in vitro* follicle culture systems, the aim of the current study was to evaluate the effect of different concentrations of insulin, alone or in combination with FSH, on the *in vitro* follicular development of isolated cultured goat preantral follicles. The effects that insulin and FSH had on the mRNA expression for *P-450AROM* and on the insulin and FSH receptors were also evaluated.

## Materials and Methods

### *Animals and ovary collection*

Ovaries (n = 60) from 30 non-pregnant, adult mixed-breed goats (*Capra hircus*) between 1 to 3 years of age were collected from a local abattoir (Fortaleza, CE). All animals were cyclic and in good body condition. Immediately postmortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol and then twice in Minimum Essential Medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). The ovaries were then transported within one hour to the laboratory in tubes containing a washing medium at 4 °C (Chaves et al. 2008). Unless noted otherwise, supplements, hormones and chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### *Isolation and selection of preantral follicles*

In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in fragmentation medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Goat preantral follicles, approximately 150 to 250 µm in diameter without antral cavities (secondary follicles), were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and mechanically isolated by microdissection from the strips of ovarian cortex using 26-gauge (26 G) needles. These follicles were then transferred to 100 µl droplets containing basic culture medium for evaluation of quality. Isolated follicles from different ovaries were pooled, and only secondary follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: (i) an intact basement membrane, (ii) two to three layers of granulosa cells and (iii) a visible, healthy oocyte (approximately 60 µm in diameter) that was round and centrally located within the follicle, without any dark cytoplasm. Secondary follicles (approximately 400 from 30 total goats) were divided among the treatment groups with approximately 40-60 follicles per group, depending on the experiment.

### *Culture of isolated goat preantral follicles*

After selection, the follicles were individually cultured (one follicle per droplet) in 100  $\mu$ l droplets of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). Incubation was conducted at 39 °C and 5% CO<sub>2</sub> in air for 18 d. The basic control medium, hereafter referred to as  $\alpha$ -MEM+, consisted of  $\alpha$ -MEM (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3.0 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5.5  $\mu$ g/ml transferrin, 5.0 ng/ml selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. This work was divided into two experiments that occurred at different times. In the first experiment (n = 24 ovaries; about 40 follicles per group), the addition of four different concentrations of recombinant human insulin was used in the culture medium. Either 0, 5 or 10 ng/ml or 10  $\mu$ g/ml was used. In the second experiment (n = 36 ovaries; approximately 60 follicles per group), these same concentrations of insulin were tested in the presence of human recombinant FSH (Nanocore, São Paulo, Brazil) in increasing concentrations (Sequential FSH: Day 0 = 100 ng/ml; Day 6 = 500 ng/ml; Day 12 = 1000 ng/ml). On every other day, 60  $\mu$ l of the culture media was replaced with fresh media (prepared and maintained for equilibration in a CO<sub>2</sub> incubator for 4 h prior to use) in each droplet. In all the FSH treatments, a complete exchange of the media (100  $\mu$ l) was performed every 6 d for a change in FSH concentration (Saraiva et al. 2011). The concentrations of FSH and insulin were chosen based on our previous studies (Saraiva et al. 2011 and Chaves et al., unpublished data). The culture was replicated two (experiment 1) or three (experiment 2) times.

### *Morphological evaluation of follicle development*

The morphological aspects of all preantral follicles were assessed every 6 d using a pre-calibrated ocular micrometer in a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) at 100x magnification. Only those follicles showing an intact basement membrane, with bright and homogeneous granulosa cells and an absence of morphological signs of degeneration, were classified as surviving follicles. Follicle degeneration was recognized when the rupture of the basement membrane was observed and a darkening of the oocytes and surrounding cumulus cells, misshapen oocytes or decreased follicle diameter was noted.

Every 6 d of culture (days 0, 6, 12 and 18), the following characteristics were analyzed in the surviving follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the diameter of healthy follicles,

measured from the basement membrane, which included two perpendicular measures of each preantral follicle, and (iii) the growth rate, calculated as the diameter variation during the culture period.

#### *In vitro maturation of goat oocytes from cultured follicles and viability assessment*

At the end of the culture period, all of the healthy follicles were carefully and mechanically opened with 26-G needles under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) for oocyte recovery. Previous studies demonstrated that goat oocytes smaller than 100  $\mu\text{m}$  were unable to resume meiosis (Crozet et al. 2000). Considering this fact, only oocytes larger than 110  $\mu\text{m}$  in diameter (including the zona pellucida and measured as described for the follicles), with homogeneous cytoplasm surrounded by at least one compact layer of cumulus cells, were selected for *in vitro* maturation (IVM) in our study. The recovery percentage of oocytes was calculated as the number of acceptable quality oocytes recovered out of the total number of cultured follicles.

Collected cumulus oocyte complexes (COCs) were washed twice with TCM 199 medium buffered with HEPES (TCM 199-HEPES) and supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 mM pyruvate. COCs were grouped (different treatments) in 50  $\mu\text{l}$  droplets of IVM medium comprised of TCM 199 supplemented with 1 mg/ml BSA, 0.911 mmol/l pyruvate, 5  $\mu\text{g/ml}$  LH, 0.5  $\mu\text{g/ml}$  FSH, 10 ng/ml epidermal growth factor, 50 ng/ml insulin like growth factor-1, 1  $\mu\text{g/ml}$  17 $\beta$ -estradiol and 100  $\mu\text{mol/l}$  cysteamine, all of which were previously equilibrated at 39 °C under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. These droplets were placed on culture dishes (30 x 15 mm) and covered with mineral oil. The COCs were incubated under the same conditions for 32 h. After the maturation period, the COCs were transferred to 50  $\mu\text{l}$  droplets of TCM 199 medium with 10  $\mu\text{l}$  of hyaluronidase, then denuded from cumulus cells by successive pipetting and analyzed under fluorescence microscopy (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) at 100x magnification for the assessment of oocyte viability and chromatin configuration.

During this process, the oocytes were incubated in 100  $\mu\text{l}$  droplets of TCM 199-HEPES, to which 4  $\mu\text{M}$  calcein-AM, 2  $\mu\text{M}$  ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and 10  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342 (Bisbenzimidazole trihydrochloride; Sigma, Deisenhofen, Germany) were added at 39 °C for 15 min. Thereafter, the oocytes were washed three times in TCM 199 and mounted on glass slides to be examined using a fluorescence microscope (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with an image processor (NIS-

Elements, Nikon, Tokyo, Japan). This enabled the measurement of oocyte diameter and an assessment of viability and nuclear chromatin configuration. The emitted fluorescent signals of calcein-AM, ethidium homodimer-1 and Hoechst were collected at 488, 568 and 365 nm, respectively. Oocytes were considered viable if the cytoplasm positively stained with calcein-AM (green) and if the chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red). While the first probe detected intracellular esterase activity of viable cells, the latter labeled nucleic acids of non-viable cells with plasma membrane disruption. Hoechst 33342 staining was used to evaluate the configuration of nuclear chromatin (blue) by observing the intact germinal vesicle (GV), meiotic resumption (including germinal vesicle breakdown [GVBD] and metaphase I [MI]) or nuclear maturation (metaphase II [MII]).

### *Hormone assays*

The spent medium was collected every 6 d during a culture period of 18 d and stored at -20 °C for subsequent estradiol assays by enzymatic immunoassay (EIA). Estradiol concentrations in culture mediums were determined using E2-EASIA Kit (Diasource, Belgium) using reactive provided by the manufacturer. As biotine in culture medium may interfere with assay, steroid extraction in samples was performed. For each culture medium sample, a volume of 300 µl was extracted using 700 µl of ethyl acetate/cyclohexane (1:1, v:v). After vortexing and incubation for 5 min at room temperature, samples were centrifuged for 15 min (3000 x g) and frozen in liquid nitrogen. Organic phase was transferred into new glass tube and evaporated under air. Extracted samples were resuspended in 300 µl Tris-EDTA buffer (Tris 0.1M, EDTA 1Mm; pH 7.4) after vortexing for 5 min and overnight incubation at 4 °C. The overall efficiency of extraction was controlled using tritium labeled-E2 (efficiency range from 70 to 85%). E2 standards (0.39 pg/ml to 1600 pg/ml) were diluted in Tris-EDTA buffer. Standards and samples were added to plates (100 µL) in duplicates. E2 coupled with horseradish peroxydase was added to plate (50 µl). Antibody from EIA Kit was added in 50 µl and plates were incubated overnight at 4 °C under agitation. After incubation and washing 5 times with 0.4 ml of manufacturer washing solution, 200 µl of substrate solution (tetramethylbenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-acetate/citrate buffer) was added to each well. After 30 min incubation, reaction was stopped using addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (1.8 M) and absorbance at 450 and 650 nm was determined. Sensitivity of assay observed was in accordance with manufacturer's observation ( $5 \pm 2$  pg/ml), as well as intra and inter-assay precisions ( $3.61 \pm 1.7$  % and  $4.4 \pm 2.2$  % respectively, means  $\pm$

SEM). As E2 concentrations were over detection range (5-800 pg/ml) for some samples, a second assay was performed with a 1:20 dilution in Tris-EDTA buffer.

*Ultrastructure analysis and expression for FSHR, INSR and cytochrome P-450AROM in goat preantral follicles*

Additional pairs of mixed breed goat ovaries (n = 36; experiment 3) were collected from a slaughterhouse. Secondary follicles were isolated and selected at the laboratory as previously described. Based on the results obtained in experiments 1 and 2, the total number of secondary follicles obtained were cultured for 18 d in the control medium without insulin and FSH (control), with insulin alone at concentrations of 10 ng/ml (Ins), with FSH alone (FSH) or with insulin and FSH (Ins + FSH) were added. After the culture period, the follicles were processed for ultrastructure analysis and qPCR.

To better examine follicular morphology, transmission electron microscopy (TEM) was performed to analyze ultrastructure of follicles from the fresh control, as well as from treatments that provided the best results regarding *in vitro* culture parameters. Groups (treatments) containing 10 isolated follicles were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer; pH 7.2) for 3 h at room temperature (RT, approximately 25 °C) and then embedded in droplets of 4% low melting agarose. After three washes in sodium cacodylate buffer, specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h at RT. The samples were then dehydrated through a gradient of acetone solutions and thereafter embedded in SPIN-PON resin (Sigma Company, St Louis, MO). Afterward, semi-thin sections (3 µm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at a 400× magnification. Ultra-thin sections (60–70 nm) were obtained from preantral follicles classified as morphologically normal from semi-thin sections. Subsequently, ultra-thin sections were contrasted using uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Morgani-FEI transmission electron microscope operating at 80 kV.

For RNA isolation, 2 pools of 10 follicles from the 0 ng/ml insulin group and the 10 ng/ml group alone, or with FSH, were collected and stored in microcentrifuge tubes (1.5 ml), frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extraction. Total RNA was isolated using a TRIzol Plus Purification Kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The RNA preparations were submitted to DNase I and treated with the RNeasy Micro Kit (Invitrogen Life Technologies). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from the RNA (0.15 µg from

each sample) using Superscript™ II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies).

The qPCR reaction was carried out in a final volume of 20 µl containing the following: 1 µl of cDNA each, 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (10 µl), 7.4 µl of ultra-pure water and 0.4 µM of both sense and antisense primer. Gene-specific primers for amplification of different transcripts are shown in Table 1. Two candidate reference genes, *β-actin* (*ACT*) and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (*GAPDH*) were selected as endogenous controls to study the expression stability and for normalization of gene expression in all samples. Primer specificity and amplification efficiency were verified for each gene. The expression stability of these genes was analyzed by the BestKeeper software (Pfaffl et al. 2004). BestKeeper highlighted *GAPDH* as the reference gene with the least overall variation.

Table 1. Oligonucleotide *primers* used for PCR analysis of goat follicles.

Target gene	Primer sequence (5'→ 3')	Sense	Position	GenBank accession n°
<i>GAPDH</i>	ATGCCTCCTGCACCACCA	s	287-309	GI:27525390
	AGTCCCTCCACGATGCCAA	as	440-462	( <i>Capra hircus</i> )
<i>β-Actin</i>	ACCACTGGCATTGTTCATGGACTCT	s	187-209	GI:28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	as	386-410	( <i>Capra hircus</i> )
<i>FSHR</i>	AGGCAAATGTGTTCTCCAACCTGC	s	250-274	GI: 95768228
	TGGAAGGCATCAGGGTCGATGTAT	as	316-340	( <i>Capra hircus</i> )
<i>INSR</i>	ATGCCCTGGTGTCACTTTCCTTCT	a	516-540	GI:26000722
	TTAGGTTCTGGTTGTCCAAGGCGT	as	620-644	( <i>Ovis aries</i> )
<i>P-450AROM</i>	CGGCATGCATGAGAAAGGCATCAT	a	407-431	GI:23506123
	ACACGTCCACATAGCCCAAGTCAT	as	594-618	( <i>Capra hircus</i> )

s,sense; as, antisense

The cycle profile for the first PCR step was an initial denaturation and polymerase activation for 15 minutes at 94 °C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 94 °C, 30 seconds at 60 °C and 45 seconds at 72 °C. The final extension was performed for 10 minutes at 72 °C. The specificity for each primer set was tested with a melt curve, carried out between 60 and 95 °C

for all genes. All amplifications were carried out in Bio-Rad iQ5. The delta-delta-CT method (Livak and Schmittgen, 2001) was used to transform CT values into normalized relative expression levels.

### *Statistical analysis*

Analysis of follicular survival, antrum formation, retrieval of grown oocytes for IVM and meiotic resumption after *in vitro* culture were completed by counting the number of viable follicles in relation to all of the follicles available. For these discrete variables, analyses were carried out as a dispersion of frequency using the chi-squared test, and the results were expressed as percentages. Follicular diameter data (continuous variables) were submitted to the Shapiro-Wilk and Bartlett tests to confirm normal distribution and homogeneity of variances, respectively. With respect to the requirements underlying the Analysis of Variance, ANOVA was executed using PROC GLM of SAS (2002) followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) test for comparison of the means. Because of the heterogeneity of variances, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used for comparisons among values recorded on different days of culture and for hormonal assay. These results were expressed as the means  $\pm$  standard deviation (SD), and differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

For real-time RT-PCR treatment, the control samples were randomly assigned in blocks, and the relative expression values ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) were subjected to the Shapiro-Wilk normality test using the univariate procedure of the SAS 9.0 software package. The relative expression was logarithmically transformed ( $\log_{10}(X + 1)$ ) for normal distribution adjustment. Log-transformed relative expression was evaluated by analyzing the variance using the ANOVA procedure. Statistical significance of the differences between the control, and the treatments were assessed with the T test ( $P < 0.05$ ) of SAS 9.0.

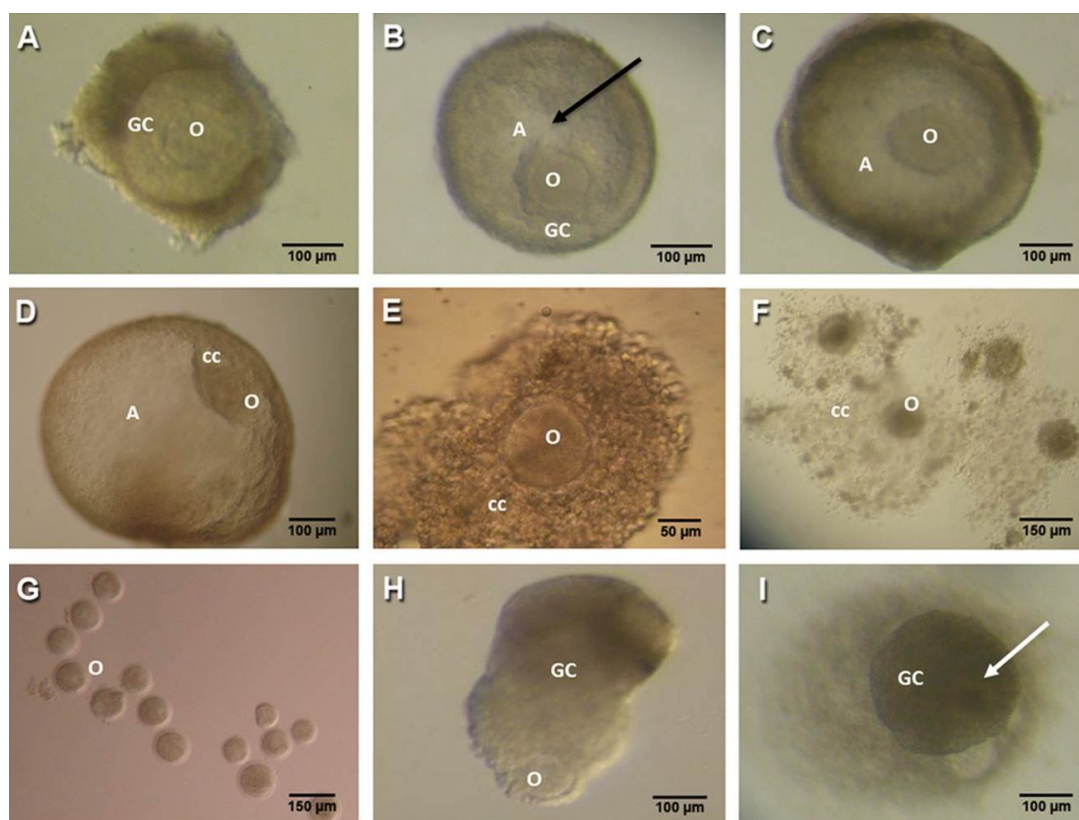
## **Results**

A total of 509 secondary follicles (experiment 1: 156 follicles; experiment 2: 243 follicles; experiment 3: 110 follicles) were isolated from goat ovaries, while 406 were selected for *in vitro* culture.



### *Follicular survival from goat preantral follicles cultured in vitro*

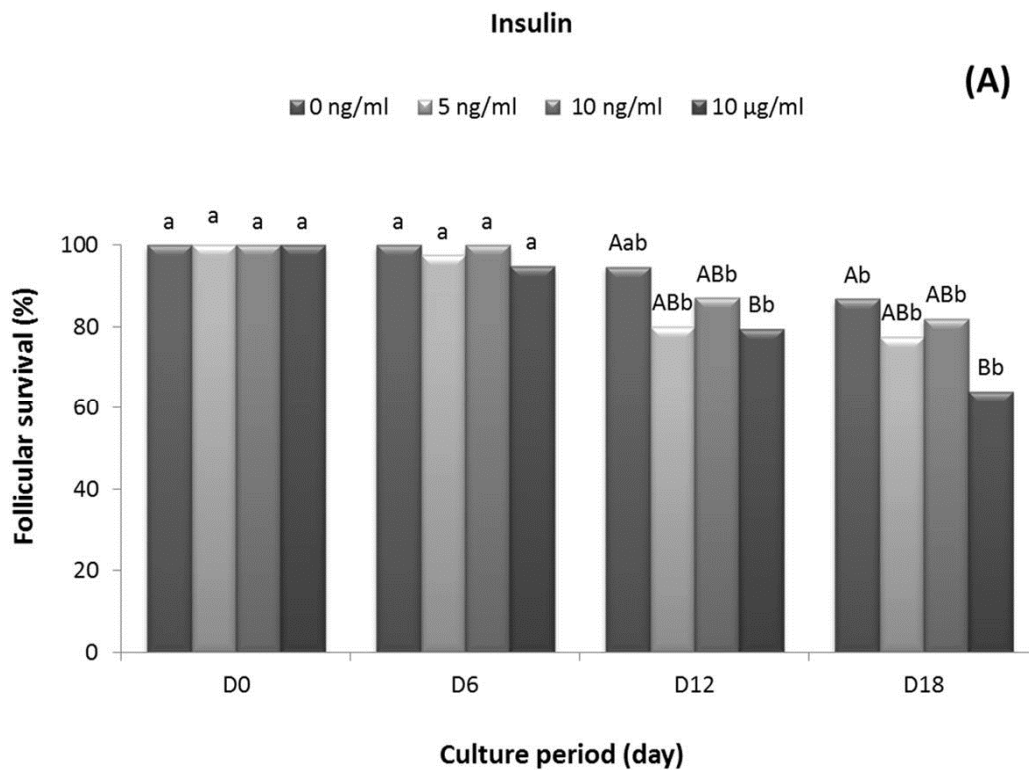
Figure 1 shows a goat ovarian follicle before culture (Fig. 1A) or after 6 (Fig. 1B), 12 (Fig. 1C) and 18 d (Fig. 1D) in culture as well as the cumulus-oocyte before (Fig. 1E) and after *in vitro* maturation (Fig. 1F, G). Follicles with oocytes extruded (Fig. 1H) and those that were degenerated (Fig. 1I) are also displayed. The preantral follicles selected for culture had centrally located oocytes and granulosa cells surrounded by normal intact basement membranes (Fig. 1A). However, some follicles in culture ruptured their basal cell membrane, presenting follicular extrusion rates ranging from 7.9% (0 ng/ml insulin, experiment 1) to 27.1% (10 ng/ml insulin, experiment 2). The extrusion rates among treatments did not vary within each day of observation in their respective experiments ( $P>0.05$ ).

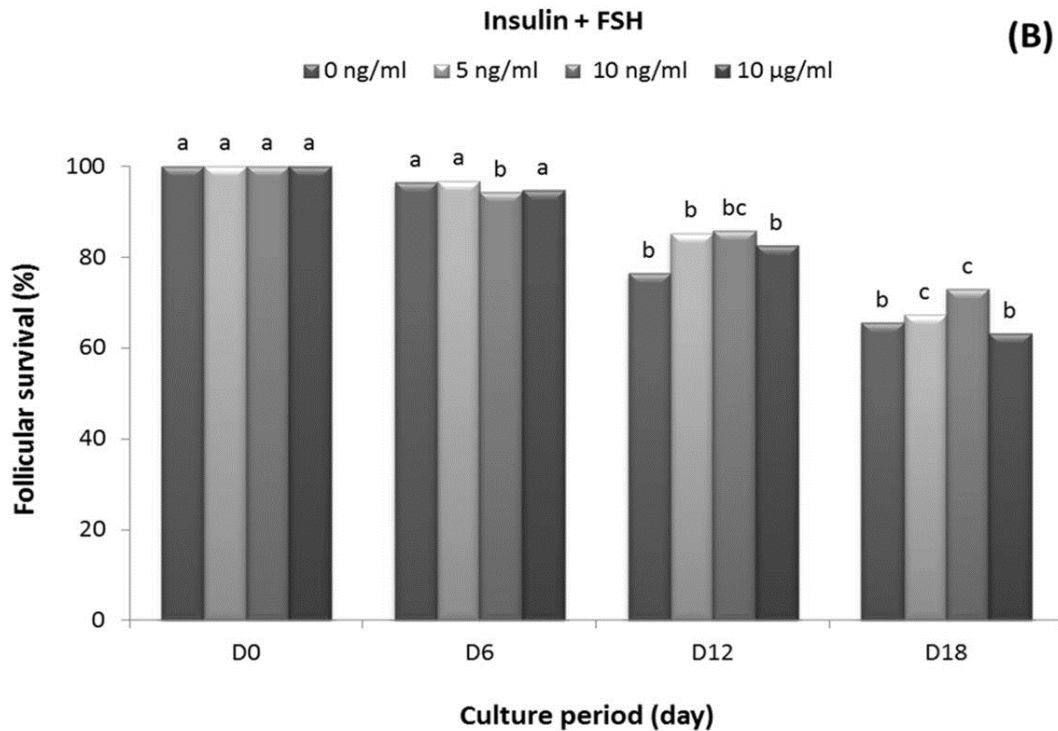


**Figure 1.** Stereomicrography of normal goat ovarian follicles before culture (A) or cultured *in vitro* in the treatment group with insulin, 0 ng/ml plus FSH for 6 d (B), 12 d (C) and 18 d (D). Normal follicles from the insulin-free group (0 ng/ml insulin) with FSH after 6 d of culture showing the formation of the antral cavity (black arrow). (E) Compact cumulus-oocyte complexes obtained from 18 d cultured follicles in the presence of insulin (10 ng/ml) and (F) expansion of their cumulus cells after maturation *in vitro*. (G) Oocytes after enzymatic and

mechanical stripping. (H) A follicle from a group with 5 ng/ml insulin showing an extruded oocyte after 18 d of culture. (I) Degenerated follicles after 18 d of culture in a medium containing 10  $\mu$ g/ml insulin with darkening of the oocytes (white arrow). Scale bars represent 100  $\mu$ m (A-D; F; H-I), 50  $\mu$ m (E) and 150  $\mu$ m (G). O: oocyte, CG: granulosa cells, A: antrum, cc: cumulus cells.

The percentage of follicles that survived is shown in Figure 2. In general, the follicular survival, either in the presence or absence of FSH, decreased significantly from day 6 to 12 in all the treatments, with no further significant alteration thereafter (Fig 2A and 2B). When the treatments were compared with each other within the same culture period, only the FSH (experiment 2), with the insulin added at high concentrations (10  $\mu$ g/ml), significantly reduced the follicular survival from day 12 onward compared with the control group (0 ng/ml of insulin - Fig. 2A).



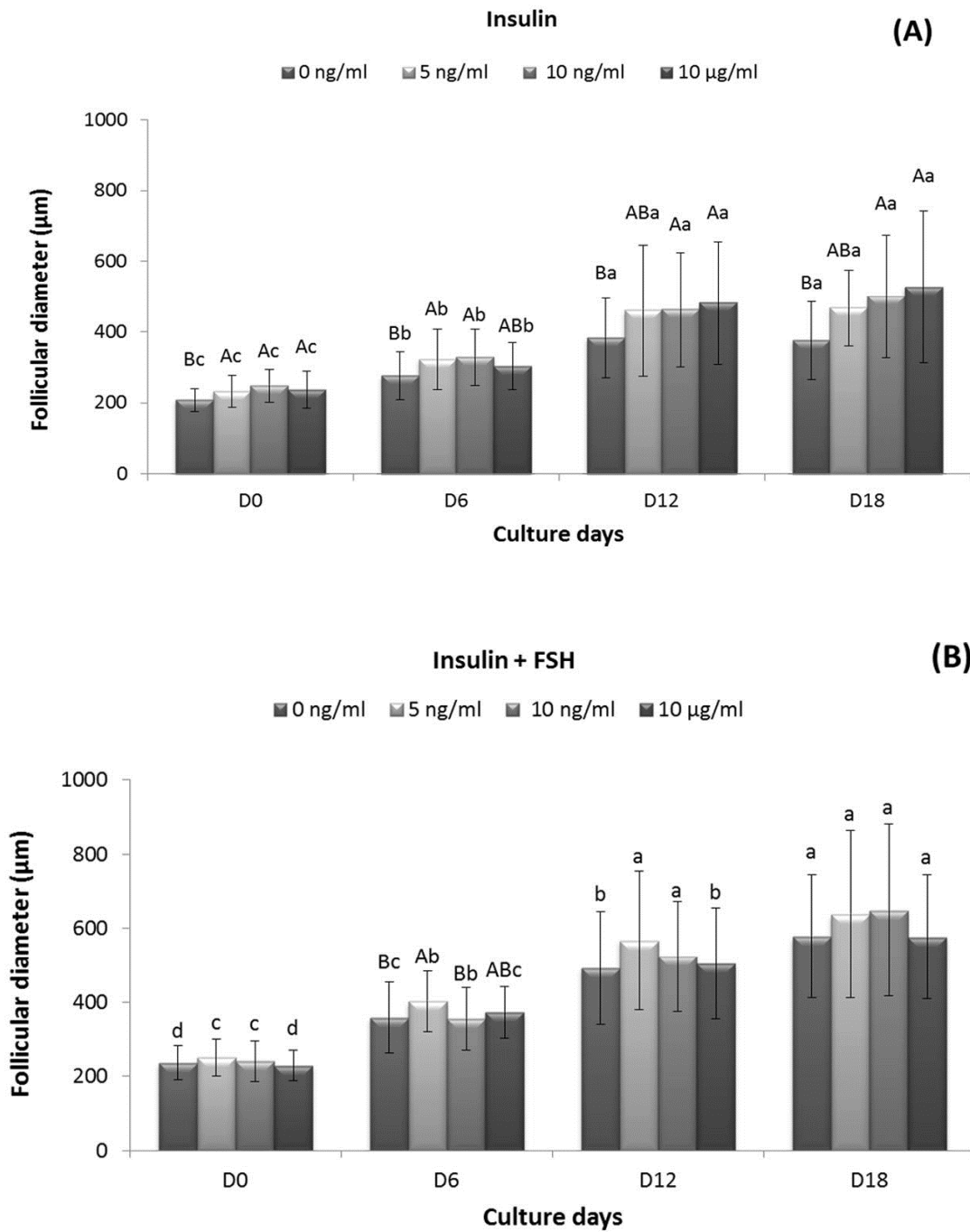


**Figure 2.** Survival of preantral follicles isolated from goats after *in vitro* culture in the medium without FSH (A) and with FSH (B) in the presence of different concentrations of insulin (0, 5 and 10 ng/ml or 10 µg/ml) for 18 d. <sup>A,B</sup> Comparison among treatments within the same day of culture; <sup>a,b,c</sup> Comparison between days of the same treatment ( $P<0.05$ ).

#### *Follicular growth rate*

Average values related to follicular growth during *in vitro* culture of isolated goat preantral follicles are described in Figure 3. An analysis of follicular diameter in both experiments showed a progressive and significant follicular growth in all treatments from day 0 until the day 12 of culture (Fig. 3A e 3B). Moreover, only in the presence of FSH (experiment 2) was there a further increase in diameter observed after 12 d of culture in the control medium without insulin and with the addition of 10 µg/ml insulin.

When the treatments were compared with each other, only in the absence of FSH (experiment 1) was it observed that from day 12 onwards, growing follicles in the medium with 10 ng/ml and 10 µg/ml of insulin increased their follicular diameter when compared with the control without insulin ( $P<0.05$ ).



**Figure 3.** Follicular diameter of preantral follicles isolated from goats with normal morphology after *in vitro* culture in medium without FSH (A) and with FSH (B) in the presence of different concentrations of insulin (0, 5 and 10 ng/ml or 10 µg/ml) for 18 d. <sup>A,B</sup> Comparison among treatments at the same day of culture; <sup>a,b,c,d</sup> Comparison between days in the same treatment ( $P < 0.05$ ).

### Antral cavity formation

Table 2 shows the antrum cavity formation in goat ovarian follicles during *in vitro* culture. In general, the percentage of antrum formation increased significantly from day 0 to day 6 of culture in all the treatments (with or without FSH). There was no subsequent significant increases, except in the control medium (0 ng/ml insulin) with FSH, which continued to show a progressive increase in the antrum formation until day 12 ( $P<0.05$ ).

Only from the day 12 of culture in treatments without FSH did the addition of 10  $\mu\text{g/ml}$  of insulin to the culture medium reveal a percentage of antrum formation significantly lower than of the insulin-free control group (0 ng/ml).

**Table 2.** Antrum formation (%) during *in vitro* culture of goat isolated preantral follicles in medium without FSH (experiment 1) and with FSH (experiment 2) in the presence of insulin at different concentrations (0, 5 and 10 ng/ml or 10  $\mu\text{g/ml}$ ) for the day 18 of treatment.

Treatments Insulin	D0	D6	D12	D18
<b>Experiment 1</b>				
0 ng/mL	0 (0/38) <sup>a</sup>	84.2 (32/38) <sup>ABb</sup>	94.7 (36/38) <sup>Ab</sup>	94.7 (36/38) <sup>Ab</sup>
5 ng/mL	0 (0/40) <sup>a</sup>	67.5 (27/40) <sup>Bb</sup>	80.0 (32/40) <sup>ABb</sup>	80.0 (32/40) <sup>ABb</sup>
10 ng/mL	0 (0/39) <sup>a</sup>	92.3 (36/39) <sup>Ab</sup>	92.3 (36/39) <sup>ABb</sup>	92.3 (36/39) <sup>ABb</sup>
10 $\mu\text{g/mL}$	0 (0/39) <sup>a</sup>	74.3 (29/39) <sup>Bb</sup>	76.9 (30/39) <sup>Bb</sup>	76.9 (30/39) <sup>Bb</sup>
<b>Experiment 2</b>				
0 ng/mL	0 (0/55) <sup>a</sup>	81.8 (45/55) <sup>Bb</sup>	100.0 (55/55) <sup>c</sup>	100.0 (55/55) <sup>c</sup>
5 ng/mL	0 (0/61) <sup>a</sup>	95.1 (58/61) <sup>Ab</sup>	95.1 (58/61) <sup>b</sup>	95.1 (58/61) <sup>b</sup>
10 ng/mL	0 (0/70) <sup>a</sup>	85.7 (60/70) <sup>ABb</sup>	94.3 (66/70) <sup>b</sup>	94.3 (66/70) <sup>b</sup>
10 $\mu\text{g/mL}$	0 (0/57) <sup>a</sup>	91.2 (52/57) <sup>ABb</sup>	94.8 (54/57) <sup>b</sup>	94.8 (54/57) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Different lowercase letters indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ) among days of culture in same experiment. <sup>A,B</sup> Different uppercase letters indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ) between treatments in the same experiment.

### Growth, recovery rate and chromatin configuration of oocytes from goat preantral follicles

Table 3 shows the oocyte recovery rates, oocyte diameter, the percentage of viable oocytes and chromatin configuration observed after *in vitro* culture in the absence (experiment

1) or presence (experiment 2) of FSH. For both experiments, at the end of *in vitro* culture the mean diameters of oocytes from cultured follicles were similar to the insulin concentrations tested, ranging from  $110.91 \pm 16.41$  (treatment with 5 ng/ml insulin without FSH) to  $127.72 \pm 15.38$  (treatment with 5 ng/ml insulin with FSH).

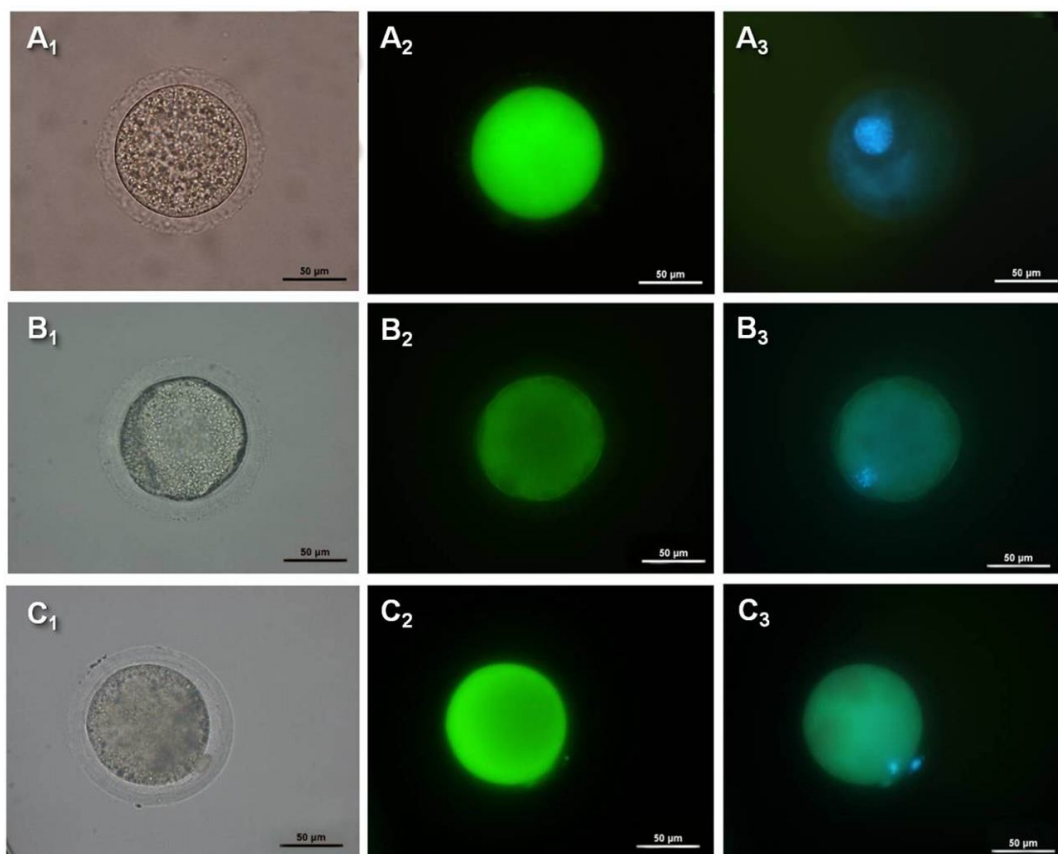
In general, in experiment 1, oocyte recovery rates, the percentage of viable oocytes as well as oocytes resuming meiosis were unaffected by the addition of insulin ( $P > 0.05$ ). In contrast, in the presence of FSH with the addition of 10 ng/ml insulin, the meiosis resumption rate significantly increased when compared with the insulin-free control. This was despite having caused a lower recovery rate in fully grown oocytes ( $P < 0.05$ ). Moreover, the meiosis resumption rates with 10 ng/ml insulin were significantly higher than the other concentrations tested (except for 5 ng/ml insulin), having a greater number of oocytes with germinal vesicle breakdown ( $n = 12$ ) and in metaphase II ( $n = 2$ ).

**Table 3.** Oocyte recovery rates after culture, oocyte diameter (mean  $\pm$  SD, including the zona pellucida), percentage of viable oocytes, percentage of germinal vesicle stage oocytes, resumption of meiosis and configuration of chromatin observed in oocytes from preantral follicles grown *in vitro* in medium without (experiment 1) or with (experiment 2) FSH.

Treatments Insulin	Oocyte recovery rate (%) $\geq 110 \mu\text{m}$	Oocyte diameter (mean $\pm$ SD)	Oocyte viability (%)	Germinal vesicle (%)	Resumption of meiosis (%)			
					Total	GVBD	MI	MII
<b>Experiment 1</b>								
0 ng/ml	57.9 (22/38)	$121.37 \pm 7.68$	100 (22/22)	68.2 (15/22)	31.8 (7/22)	100.0 (7/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
5 ng/ml	55.0 (22/40)	$110.91 \pm 16.41$	100 (22/22)	68.2 (15/22)	31.8 (7/22)	71.4 (5/7)	28.5 (2/7)	0 (0/7)
10 ng/ml	53.8 (21/39)	$113.68 \pm 25.34$	100 (21/21)	52.4 (11/21)	47.6 (10/21)	60.0 (6/10)	40.0 (4/10)	0 (0/10)
10 $\mu\text{g/ml}$	46.1 (18/39)	$121.18 \pm 12.20$	100 (18/18)	83.4 (15/18)	16.6 (3/18)	66.6 (2/3)	33.3 (1/3)	0 (0/3)
<b>Experiment 2</b>								
0 ng/ml	81.8 (45/55) <sup>A</sup>	$120.80 \pm 16.26$	100 (45/45)	88.9 (40/45) <sup>A</sup>	11.1 (5/45) <sup>B</sup>	60.0 (3/5)	20.0 (1/5)	20.0 (1/5)
5 ng/ml	68.8 (42/61) <sup>AB</sup>	$127.72 \pm 15.38$	100 (42/42)	73.8 (31/42) <sup>AB</sup>	26.2 (11/42) <sup>AB</sup>	45.5 (5/11)	45.5 (5/11)	9.0 (1/11)
10 ng/ml	65.7 (46/70) <sup>B</sup>	$127.17 \pm 14.83$	100 (46/46)	58.7 (27/46) <sup>B</sup>	41.3 (19/46) <sup>A</sup>	63.2 (12/19)	26.3 (5/19)	10.5 (2/19)
10 $\mu\text{g/ml}$	66.7 (38/57) <sup>AB</sup>	$120.14 \pm 15.34$	100 (38/38)	79.0 (30/38) <sup>A</sup>	21.0 (8/38) <sup>B</sup>	75.0 (6/8)	12.5 (1/8)	12.5 (1/8)

<sup>A,B</sup> Different uppercase letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments of the same experiment.

It is important to note that mature oocytes were only observed in treatments containing FSH. Figure 4 illustrates viable oocytes labeled with calcein-AM (Fig. 4A<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>) presenting with a nucleus in GV (Fig. 4A<sub>3</sub>), MI (Fig. 4B<sub>3</sub>) and MII (Fig. 4C<sub>3</sub>).

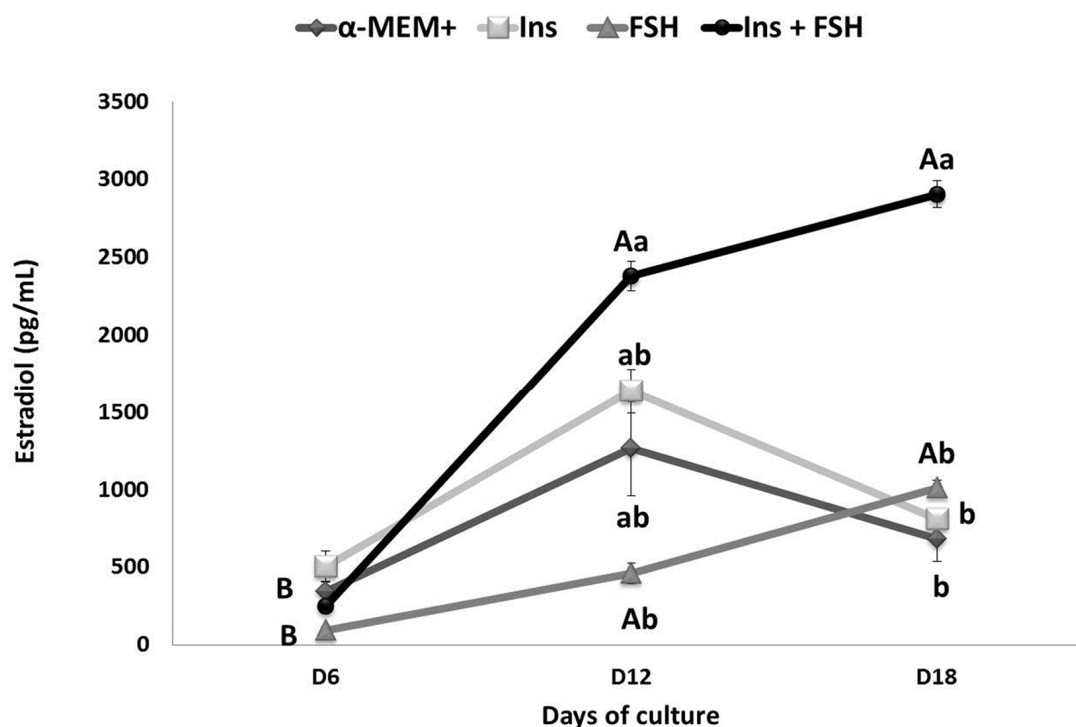


**Figure 4.** Morphology of oocytes destined to IVM, after *in vitro* culture of goat preantral follicles in medium containing 0 ng/ml of insulin (A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>) and 10 ng/ml alone (B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>) or with FSH (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>). Bright-field visualization of oocytes (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>) and characterization of a viable oocyte after staining with calcein-AM (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>) and germinal vesicles (A<sub>3</sub>), germinal vesicle breakdown (B<sub>3</sub>) and metaphase II (C<sub>3</sub>) after Hoechst 33342 staining under fluorescence (Scale bars: 50 µm; 400x magnification).

*Effect of insulin alone or associated with FSH on the estradiol secretion of cultured follicles*

Figure 5 shows the estradiol levels in culture medium from ovarian follicles cultured with or without insulin (10 ng/ml) and/or FSH. According to figure, only FSH alone or in association with insulin, there was a significant increase in estradiol levels from day 6 to day 12, it remaining constant after this period. It is highlighted that the levels of estradiol from

treatment FSH associated with insulin were significantly higher when compared to other treatments.



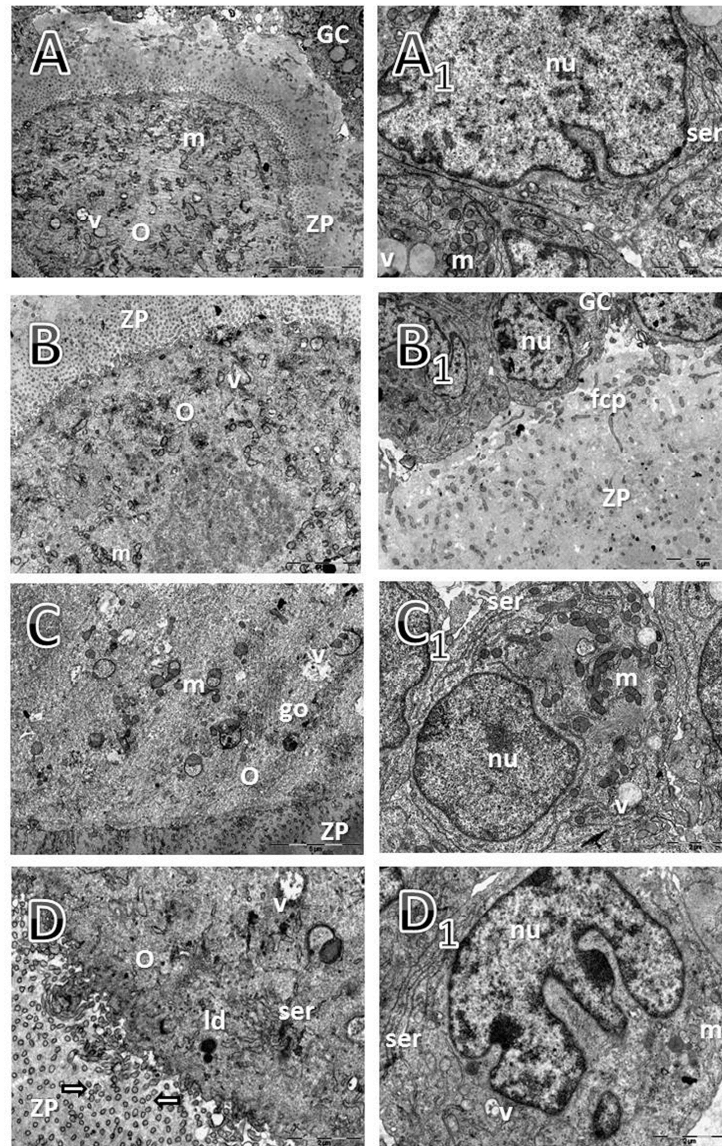
**Figure 5.** Estradiol levels for goat ovarian follicles during culture in control medium without insulin (Control), with insulin alone at concentrations of 10 ng/ml (Ins), with FSH alone (FSH) or with insulin and FSH (Ins + FSH) at day 18. Significant differences over time (uppercase) or between the insulin dosage groups (lowercase) are indicated by different letters ( $P < 0.05$ ).

*Effect of insulin alone or associated with FSH on the ultrastructural features of cultured follicles*

The ultrastructural pattern described below was observed in normal preantral and antral follicles from the fresh control as well as in all cultured follicles (Fig. 6). Transmission electron microscopy of isolated follicles (insulin 10 ng/ml alone or with FSH) at 18 d of culture was performed to assess the ultrastructure in comparison to normal follicles from the fresh control group (day 0). At least five follicles per group were analyzed. Normal follicles contained an oocyte displaying a homogenous cytoplasm, ample round mitochondria with continuous membranes and few peripheral cristae (Fig. 6A-C). Small Golgi apparatus cisternae (Fig. 6C) and some vesicles (Fig. 6A-C) were also observed. Smooth endoplasmic reticulum was present,



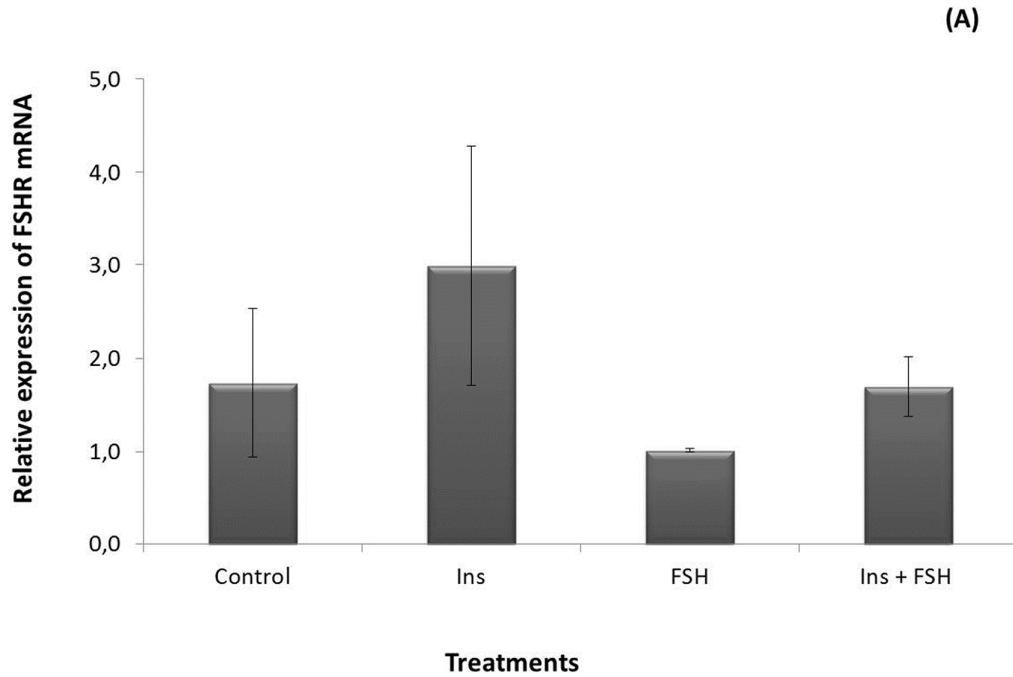
either as isolated aggregations or as a complex association with mitochondria (Fig. 6D). The nuclei of oocytes were observed only in a few of the analyzed ultrathin sections due to the large diameter of studied follicles. Oocytes were usually round and well delineated by an intact nuclear envelope; a nucleolus could also be occasionally identified. Oocytes were surrounded by a well-developed zona pellucida, which was thicker in cultured follicles than in preantral follicles before culture, and contained a vast number of transzonal processes (cytoplasmic projections) arising from both granulosa cells and the oocyte (Fig. 6A-D). Granulosa cells were small and showed a high nucleus-to-cytoplasm ratio (Fig. 6A<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>). Their irregularly shaped nuclei contained loose chromatin in the inner part and small peripheral aggregates of condensed chromatin, which was also often observed centrally in the nuclear matrix (Fig. 6A<sub>1</sub>; C<sub>1</sub>; D<sub>1</sub>). The cytoplasm exhibited a great number of mitochondria with some elongated forms containing parallel cristae (Fig. 6C<sub>1</sub>). A well-developed smooth endoplasmic reticulum and vesicles were also observed (Fig. 6A<sub>1</sub>; D<sub>1</sub>).

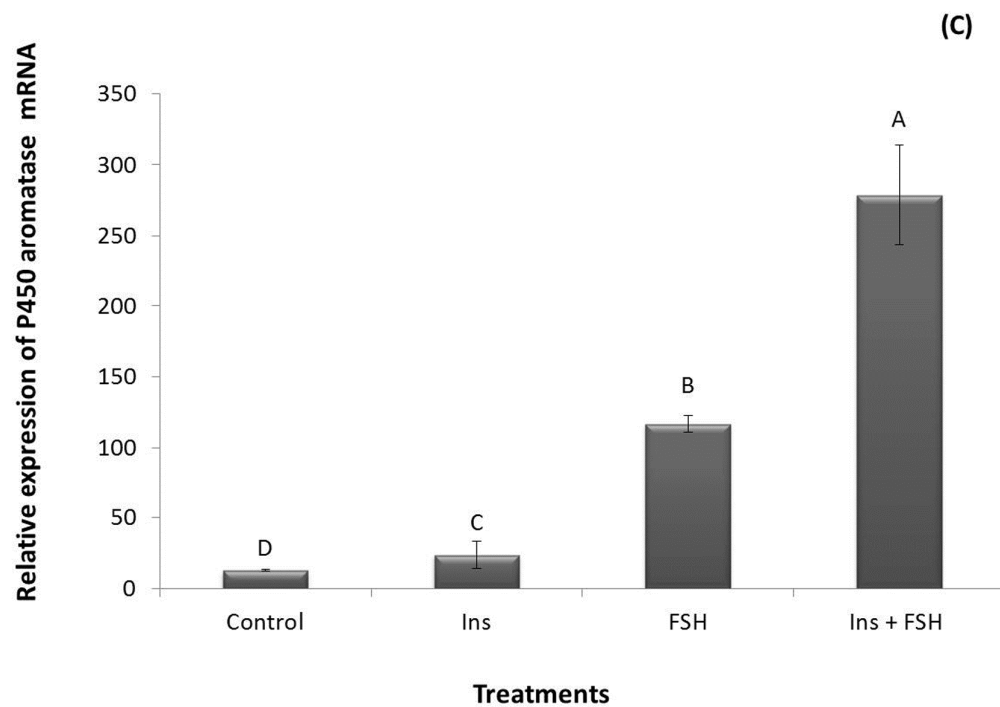
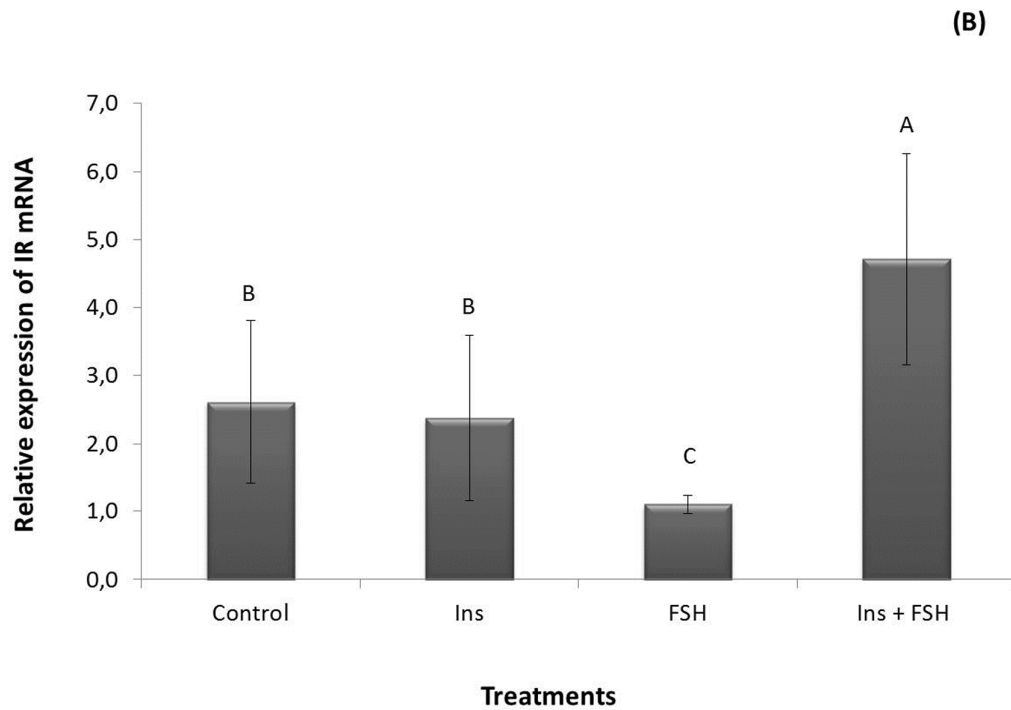


**Figure 6.** Electron micrographs of control and cultured follicles. A: preantral follicle from the fresh control group (scale bar: 10  $\mu$ m), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail (A<sub>1</sub>, scale bar: 2  $\mu$ m); B: antral follicle retrieved from experimental ovaries and immediately fixed (scale bar: 5  $\mu$ m), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail (B<sub>1</sub>, scale bar: 5  $\mu$ m); C: antral follicle from the 10 ng/ml insulin alone group (scale bar: 5  $\mu$ m), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail (C<sub>1</sub>, scale bar: 2  $\mu$ m); D: antral follicle from the 10 ng/ml insulin associated with FSH group (scale bar: 2  $\mu$ m), with a granulosa cell from the same follicle presented in detail (D<sub>1</sub>, scale bar: 2  $\mu$ m). Arrows indicate follicular cell processes transversally sectioned. O: oocyte; GC: granulosa cell; ZP: zona pellucida; m: mitochondria; ser: smooth endoplasmic reticulum; v: vesicle; fcp: follicular cell process; nu: granulosa cell nucleus; go: Golgi apparatus.

*Expression of FSHR, INSR and P-450AROM in goat preantral follicles cultured in vitro*

The effects of insulin alone or associated with FSH were evaluated on the *FSHR*, *INSR* and *P-450AROM* mRNA expression levels by real-time PCR (Fig. 7). The mRNA expression for *FSHR*, *INSR* and *P-450AROM* were detected in all the treatments. After 18 d of culture, regardless of whether FSH was present, the addition of insulin (0 and 10 ng/ml) did not significantly affect the expression of the *FSHR* mRNA (Fig. 7A). Interestingly, we found that the addition of FSH to the culture medium significantly reduced the mRNA expression for *INSR* compared with the control (0 ng/ml insulin) and insulin (10 ng/ml) treatments. Nevertheless, the opposite effect on this parameter was observed when FSH was associated with insulin (Fig. 7B). Finally, the highest levels of mRNA expression for *P-450AROM* were observed when FSH was associated with insulin ( $P < 0.05$ ; Fig. 7C).





**Figure 7.** Relative expression of mRNA (means  $\pm$  SD) of (A) *FSHR*; (B) *INSR* and (C) *P-450AROM* after 18 d of culture in the control medium without insulin (Control), with insulin alone at concentrations of 10 ng/ml (Ins), with FSH alone (FSH) or with insulin and FSH (Ins + FSH). Different letters denote a significant difference ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

Although the role of insulin as a regulator of growth and steroidogenesis in ovarian tissues is well documented, the effect of insulin at lower concentrations on isolated goat preantral follicular cultures has not been previously examined. For the first time, the present study evaluated the effect of different concentrations of insulin alone or in association with FSH on the *in vitro* culture of isolated goat preantral follicles and their effects on the expression for *FSHR*, *INSR* and *P-450AROM* mRNA levels in ovarian follicles after culture.

In this study, only the addition of a high insulin concentration (10 µg/ml), in the absence of FSH, reduced follicular survival starting from day 12 of culture compared with the control. Insulin is commonly used in cultured cells and tissues to increase cell viability due to its ability to remove pro-apoptotic molecules and phosphatidylinositol-3 kinase activation (LeRoith *et al.* 1995; Louhio *et al.* 2000). In addition, insulin regulates important intracellular processes, such as amino acid transport, glucose and lipid metabolism, gene transcription and protein synthesis (Cheatham and Khan, 1995). However, at high concentrations, insulin appears to have a toxic effect on follicle cells. This hypothesis was corroborated by recent studies showing that basic culture medium containing 10 µg/ml insulin (ITS) have not been able to maintain ultrastructural integrity and, therefore, the viability of caprine preantral follicles cultured for 7 d (Chaves *et al.* 2010; Faustino *et al.* 2011). In contrast to our results, the findings of Xu *et al.* (2010) demonstrated that *in vitro* culture of isolated secondary follicles from *Rhesus* monkeys for 40 d with high-dose insulin (5 µg/ml) did not impair survival, and also promoted a greater follicular growth compared with the culture of 50 ng/ml insulin. This discrepancy may be attributed to culture conditions (for instance, insulin concentration and period of culture) and the difference between the species. When FSH was added to the medium, it was found that follicular survival was no longer hampered by the high insulin concentration (10 µg/ml), suggesting that the beneficial effects of FSH on follicular survival overlaps with the negative effects of insulin alone at high concentrations. In goats, the beneficial effects of FSH on follicle survival have been well established (Matos *et al.* 2007; Magalhães *et al.* 2009; Saraiva *et al.* 2011).

In relation to follicular growth, the present study found a higher follicular diameter after using insulin (5, 10 ng/ml and 10 µg/ml) in the absence of FSH. The lack of additional effects of insulin in the presence of FSH may be due to the known effect of FSH on follicular growth. Insulin appears to stimulate proliferation of the granulosa cells in a concentration-dependent manner (Saumande, 1991). It is known that insulin has specific effects on granulosa and theca cell function (Yen *et al.* 2004) and on several growth factors such as insulin-like growth factor I

(IGF-I). Insulin stimulates granulosa and thecal cell proliferation and mitogenesis and synergizes with gonadotropins to stimulate granulosa and thecal cell steroidogenesis (Silva and Price, 2000). Several studies in different species have shown that the association between insulin and FSH favors follicular growth (cattle: Machado *et al.* 2006, murine: Liu *et al.* 2002, primates: Xu *et al.* 2011, buffalo, Gupta *et al.* 2002, goats: Saraiva *et al.* 2011 and canine: Serafim *et al.* 2010).

The current study demonstrated that, despite the presence of FSH and/or insulin, all the treatments promoted a significant increase in antrum formation by day 6. These results are in disagreement with those reported by Itoh *et al.* (2002), which revealed that the addition of insulin alone initiated antrum formation within 7 d of culture, while preantral follicles grown in the control basal medium without insulin throughout the entire culture period failed to form an antral cavity. Although the FSH played an important role in the follicular diameter increase in our study, it had no additional effect in antrum formation, which is confirmed by a previous study reporting that FSH is not required *in vivo* until antrum formation (Wright *et al.* 1999).

The parameters evaluated in the oocyte showed that, in the absence of FSH, insulin did not affect the oocyte recovery rate, the percentage of viable oocytes, or the percentage of oocytes that resumed meiosis. On the other hand, only in the presence of FSH did the addition of 10 ng/ml insulin increase the meiotic resumption rate when compared with the control-free insulin group, enabling the production of mature oocytes (metaphase II). Concurrent use of gonadotropins and insulin was considered optimal for the culture of preantral follicles in the mouse (Eppig *et al.* 2000). Amsterdam *et al.* (1988) agreed that a combined treatment with insulin and FSH markedly increased gap junction and microvilli formation and enhanced the development of the smooth endoplasmic reticulum and the Golgi complex relative to treatment with either hormone alone. However, it has been reported that mammalian oocyte or follicle growth, in the presence of prolonged elevated insulin levels, has a negative impact on oocyte developmental competence (Dumesic *et al.* 2002). This fact confirms our results where the presence of FSH with or without high insulin concentrations (10 µg/ml) was not satisfactory to promote meiotic resumption in oocytes from goat preantral follicles. This suggests that high insulin levels *in vitro* may induce a delay in meiotic resumption. These findings are especially relevant because 10 µg/ml insulin is widely used in goat ovarian follicle culture, such as an ITS component.

Based on the results concerning the survival, growth and meiotic resumption, the goat follicles cultured in 10 ng/ml insulin with or without FSH were submitted to ultrastructural analysis and qPCR. All follicles examined, non-cultured or cultured for 18 d, showed an

ultrastructure pattern that was normal. This fact proves that the culture conditions using insulin at 10 ng/ml, within the physiological range of insulin concentration reported in biological fluids (0.5 - 10 ng/ml) (Diamond *et al.* 1985), was able to maintain cell ultrastructure similar to that found *in vivo* (non-cultured control), even after a prolonged period of *in vitro* culture.

After 18 d of *in vitro* culture, the follicles cultured with insulin alone or combined with FSH did not alter their relative *FSHR* mRNA expression levels. Similar to our study, Sánchez *et al.* (2011) demonstrated that transcript levels in oocytes from antral follicles treated with an elevated FSH dose, but exposed to low insulin levels, are not different from those obtained from oocytes from *in vivo* primed mice. Some studies report that insulin acts directly, increasing the expression for *FSHR* (Van den Hurk and Zhao, 2005, Shimizu *et al.* 2008). However, this was not observed here.

On the other hand, it was found that supplementation of the medium with the combination of insulin (10 ng/ml) and FSH promoted an increase in *INSR* mRNA levels. Insulin acts through its own receptor to modulate the response of granulosa cells to gonadotropins (Willis *et al.* 1996). Interestingly, goat ovarian follicles cultured in the presence of FSH alone had a lower expression for *INSR*. The new results described here show that the expression for *INSR* is closely related to the association between FSH and insulin. Similar to the results found in this study regarding goat follicles, Shimizu *et al.* (2008) suggest that FSH may regulate the expression of the *INSR* gene in bovine GCs. In addition, *in vivo*, FSH can influence granulosa cell responses to insulin via the regulation of receptors for insulin and IGF-I (Vendola *et al.* 1999).

The combination of FSH and insulin (10 ng/ml) also showed the highest levels of mRNA expression for *P-450AROM* which were associated to the highest level of estradiol production. In the ovary, *P-450AROM* is a steroidogenic enzyme that is crucial for catalyzing estrogen from androgens (Kandiel *et al.* 2010). The primary stimulator for *P-450AROM* expression and enzyme activity is FSH, as demonstrated in ruminants (Campbell *et al.* 1996, Gutiérrez *et al.* 1997). However, Silva and Price (2002) also reported that insulin has an essential role for *P-450AROM* expression. Aromatase activity is stimulated by low doses of FSH when insulin is present at 0.5 to 10 ng/ml, whereas this response is lost in the presence of higher (100 ng/ml) concentrations of insulin. Insulin acts through its own receptor to modulate the response of granulosa cells to gonadotrophins (Willis *et al.* 1996). Insulin at physiological concentrations enhances estradiol production in granulosa cells (Willis *et al.* 1996). In monkeys, insulin associate with FSH has been shown to promote theca and granulosa cell steroidogenesis (Xu *et al.* 2010).

In conclusion, low concentrations of insulin (10 ng/ml) with FSH were more efficient in promoting oocyte meiosis resumption in goat preantral follicles. This combination of hormones also stimulated follicular development and maintained follicular survival as well as increased estradiol secretion. In addition, the interaction of the two hormones (FSH and insulin) positively influenced the mRNA expression for *INSR* and *P-450AROM* after culture. The results of this study highlight how prolonged exposure to elevated levels of insulin during follicular growth may compromise oocyte maturation. Thus, we have revealed how a new basic medium, combining FSH and low concentration of insulin, can influence the development of *in vitro* isolated preantral goat follicles. For the first time, this study shows how these hormones influence follicle growth, oocyte maturation, estradiol secretion and mRNA expression for *INSR*, *FSHR* and *P-450AROM* in this species.

### **Acknowledgments**

This research was supported by grants from CNPQ (RENORBIO: grant number 554812/2006-1) and FINEP–Brazil. R. N. Chaves is a recipient of a grant from CNPq (Brazil). The authors thank Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves and Casie Bass for his technical support in previous studies.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there is no potential conflict of interest that can be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **Author contributions**

All authors were involved in all phases of the research and manuscript preparation.

### **References**

**Acevedo N, Ding J & Smith GD** 2007 Insulin Signaling in Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction* **77** 872–879.



**Amsterdam B, May JV & Schomberg DW** 1988 Synergistic Effect of Insulin and Follicle-Stimulating Hormone on Biochemical and Morphological Differentiation of Porcine Granulosa Cells *in vitro*. *Biology of Reproduction* **39** 379-390.

**Ben Saïd S, Lomet D, Chesneau D, Lardic L, Canepa S, Guillaume D, Briant C, Fabre-Nys C & Caraty A.** 2007 Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biology of Reproduction* **76** 673-680.

**Campbell BK, Scaramuzzi RJ & Webb R** 1996 Induction and maintenance of estradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility* **106** 7-16.

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

**Chaves RN, Alves AMCV, Duarte ABG, Araújo VR, Celestino JJH, Matos MHT, Lopes CAP, Campello CC, Name KPO, Bão SN et al.** 2010 Nerve Growth Factor Promotes the Survival of Goat Preantral Follicles Cultured *in vitro*. *Cells Tissues Organs* **192** 272-282.

**Cheatham B & Chan CR** 1995 Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrinology Review* **16** 117-142.

**Crozet N, Dahirel M & Gall L** 2000 Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *Journal of Reproduction & Fertility* **118** 367-373.

**Diamond MP, Webster BW, Carr RK, Wentz AC & Osteen KG** 1985 Human follicular fluid insulin concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **61** 990-992.

**Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL & Behrman HR** 1997 Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biology of Reproduction* **56** 891-897.

**Dumesic D, Schramm R, Peterson E, Paprocki A, Zhou R & Abbott D** 2002 Impaired developmental competence of oocytes in adult prenatally androgenized female rhesus monkeys undergoing gonadotropin stimulation for *in vitro* fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87** 1111-1119.

**Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A & Watanabe S** 2000 Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes *in vitro*: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Molecular and Cellular Endocrinology* **163** 109-116.

**Faustino LR, Rossetto R, Lima IM, Silva CM, Saraiva MV, Lima LF, Silva AW, Donato MA, Campello CC, Peixoto CA et al.** 2011 Expression of Keratinocyte Growth Factor in Goat

Ovaries and Its Effects on Preantral Follicles Within Cultured Ovarian Cortex. *Reproductive Science* 'in press'.

**Fouladi-Nashta AA & Campbell KHS** 2006 Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction* **131** 449-460.

**Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM & Sarma PV** 2002 *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology* **57** 1839-1854.

**Gutiérrez CG, Campbell BK & Webb R** 1997 Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* **56** 608-616.

**Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y & Hoshi H** 2002 Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium. *Biology of Reproduction* **67** 1099-1105.

**Kandiel MM, Watanabe G & Taya K** 2010 Ovarian expression of inhibin-subunits, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, and cytochrome P450 aromatase during the estrous cycle and pregnancy of shiba goats (*Capra hircus*). *Experimental Animal* **59** 605-614.

**Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima Y & Hoshino M** 2006 Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biology* **8** 17-26.

**Latham K, Bautista F, Hirao Y, O'Brien M & Eppig J** 1999 Comparison of protein synthesis patterns in mouse cumulus cells and mural granulosa cells: effects of follicle-stimulating hormone and insulin on granulosa cell differentiation *in vitro*. *Biology of Reproduction* **61** 482-492.

**LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D & Roberts Jr CT** 1995 Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology Review* **16** 143-163.

**Liu HC, He Z & Rosenwaks Z** 2002 *In vitro* culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertility and Sterility* **77** 373-383.

**Livak KJ & Schmittgen TD** 2001 "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method". *Methods* **25** 402-408.

**Louhio H, Hovatta O, Sjoberg J & Tuuri T** 2000 The effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular Human Reproduction* **6** 694-698.

- Machado R, Da Silva JCB, Barbosa RT, Bisinotto RS, Siqueira AFP & Binelli M** 2006 Remoção farmacológica ou mecânica do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* **34** 344-349.
- Magalhães DM, Araújo VR, Lima-Verde IB, Matos MHT, Silva RC, Lucci CM, Bão SN, Campello CC & Figueiredo JR** 2009 Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. *Biocell* **33** 91-97.
- 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 goat preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote* **15** 173-182.
- May JV, McCarty KJr, Reichert LEJr & Schomberg DW** 1980 Follicle stimulating hormone mediated induction of functional luteinising hormone/human chorionic gonadotrophin receptors during monolayer culture of porcine granulosa cells. *Endocrinology* **107** 1041-1049.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C & Neuvians TP** 2004 Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26** 509-515.
- Sánchez F, Romero S & Smitz J** 2011 Oocyte and Cumulus Cell Transcripts from Cultured Mouse Follicles Are Induced to Deviate from Normal *In vivo* Condition by Combinations of Insulin, Follicle-Stimulating Hormone, and Human Chorionic Gonadotropin. *Biology of Reproduction* 'in press'.
- Saraiva MVA, Celestino JJH, Araújo VR, Chaves RN, Almeida AP, Lima-Verde IB, Duarte ABG, Silva GM, Martins FS, Bruno JB et al.** 2011 Expression of follicle-stimulating hormone receptor (*FSHR*) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote* **19** 205-214.
- Sasaki S** 2002 Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Animal Science Journal* **73** 423-433.
- Saumande J** 1991 Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **38** 189-196.
- Serafim MK, Araújo VR, Silva GM, Duarte AB, Almeida AP, Chaves RN, Campello CC, Lopes CA, Figueiredo JR & da Silva LD** 2010 Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology* **74** 749-755.

- Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M & Miyamoto A** 2008 Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Animal Reproduction Science* **106** 143–152.
- Silva JM & Price CA** 2000 Effect of FSH on steroid secretion and messenger ribonucleic acid encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side chain cleavage in bovine granulosa cells *in vitro*. *Biology of Reproduction* **62** 186-191.
- Silva JM & Price CA** 2002 Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. *The Journal Endocrinology* **174** 499-507.
- Van Den Hurk R & Zhao J** 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63** 1717-1751.
- Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa O, Bievre M & Bondy C.** 1999 Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biology of Reproduction* **61** 353-357.
- Willis D & Franks S** 1995 Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **80** 3788-3790.
- Willis D, Mason H, Gilling-Smith C & Franks S** 1996 Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81** 302-309.
- Wright CS, Havotta O, Margara R, Trew G, Winston RML, Franks S & Hardy K** 1999 Effects of Follicle-Stimulating Hormone and serum substitution on the *in vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction* **14** 1555-1562.
- Xu J, Bernuci PB, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB & Stouffer RL** 2010 Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction* **140** 685-697.
- Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau KY, Barrett SL, Zelinski MB & Stouffer RL** 2011 Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Human Reproduction* **26** 1061-1072.
- Yaseen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW & Niemann H** 2001 Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II)

ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. *Reproduction* **122** 601-610.

**Yen HW, Jakimiuk AJ, Munir I & Magoffin DA** 2004 Selective alterations in insulin receptor substrates-1, -2 and -4 in theca but not granulosa cells from polycystic ovaries. *Molecular Human Reproduction* **10** 473-479.

## 15. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram concluir que:

- A adição de 1 ng/mL de NGF ao meio de cultivo promoveu a manutenção da viabilidade e integridade morfológica e ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos após 7 dias de cultivo *in vitro*.
- A utilização de FGF-10 no meio de cultivo, na concentração de 50 ng/mL, manteve a viabilidade e a ultraestrutura, além de promover o crescimento de folículos pré-antrais caprinos após 7 dias de cultivo *in vitro*.
- O emprego da insulina assegurou a manutenção da sobrevivência folicular, e quando adicionada na concentração de 10 ng/mL estimulou a ativação e o crescimento dos folículos pré-antrais caprinos, permitindo ainda a manutenção da viabilidade e integridade ultraestrutural folicular durante 7 dias de cultivo *in vitro*.
- A utilização de 10 ng/ml de insulina, promoveu a manutenção da sobrevivência, formação de antro e crescimento folicular. Porém, somente quando a insulina (10 ng/ml) foi associada ao FSH, houve o favorecimento da retomada da meiose e maior produção de estradiol, além de aumentar a expressão de RNAm para aromatase e receptor de insulina em folículos caprinos cultivados *in vitro* por 18 dias.

## 16. PERSPECTIVAS

O uso de técnicas reprodutivas assistidas em cabras tem crescido consideravelmente no Brasil nos últimos anos, devido à melhoria dos sistemas de produção, com o máximo objetivo de fornecer produtos especializados e regularidade para o mercado consumidor. No entanto, observa-se que, apesar dos avanços da pesquisa científica, é necessária uma aplicabilidade maior de tais técnicas no campo, diretamente nos sistemas de produção, com o objetivo final de disseminar o conhecimento adquirido nos centros de pesquisa.

A biotécnica de MOIFOPA pode ser uma grande aliada, uma vez que é de grande importância para a pesquisa fundamental, por contribuir para a elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese nesta fase, e para a reprodução animal, possibilitando o isolamento de milhares de folículos a partir de um único ovário e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles contidos, até o estágio de maturação e fecundação *in vitro*.

A equipe de pesquisa do LAMOFOPA-UECE foi a primeira no mundo a maturar oócitos e produzir embriões a partir do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Entretanto, apesar de ter representado um avanço na técnica, as taxas de maturação de oócitos a partir de folículos pré-antrais caprinos bem como de outras espécies, são ainda baixas quando comparadas a oócitos crescidos *in vivo* puncionados a partir de folículos antrais. Este fato deve-se, provavelmente, a falhas no desenvolvimento folicular ocorridas durante o cultivo *in vitro*.

Inúmeros fatores de crescimento e/ou hormônios, bem como seus receptores e suas vias de sinalização tem sido identificados trabalhando em conjunto para o desenvolvimento folicular através de mecanismos endócrinos, autócrinos e parácrinos. Os resultados desta tese também evidenciaram a participação do NGF, FGF-10 e insulina no desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ* e em folículos secundários avançados isolados (com insulina). Desta forma, as informações aqui obtidas poderão ser utilizadas para aperfeiçoar a elaboração e o fornecimento de meios de cultivo capazes de propiciar ótimas condições para um completo crescimento folicular, preservando a viabilidade celular e revolucionando a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, estudos complementares poderão ser realizados visando à utilização destas substâncias em associação e em diferentes momentos de adição, caracterizando um meio de cultivo dinâmico, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais *in situ* e/ou isolados.

## 17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; FISCH, B.; JIN, S.; BARNNET, M.; BEN-HAROUSH, A.; FELZ, C.; KESSLER-ICEKSON, G.; FELDBERG, D.; NITKE, S. Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Molecular Human Reproduction*, v.11, n. 4, p. 229–236, 2005.

ABIR, R.; FISCH, B.; RAZ, A. H.; NITKE, S.; BEM-RAFAEL, Z. Preservation of fertility in women undergoing chemotherapy – current approach and future prospects. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.15, n. 8, p. 469–478, 1998.

ABIR, R.; NITKE, S.; BEM-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*, v. 26, n. 8, p. 887-898, 2006.

ABO-ELMAKSOU, A.; SINOWATZ, F. Expression and Localization of Growth Factors and their Receptors in the Mammalian Testis. Part I: Fibroblast Growth Factors and Insulin-Like Growth Factors. *Anatomy Histology and Embryology*, v. 34, n. 5, p. 319–334, 2005.

ABUHARBEID, S.; CZUBAYKO, F.; AIGNER, A. The fibroblast growth factor-binding protein FGFBP. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 38, n. 9, p. 1463–1468, 2006.

ACEVEDO, N.; DING, J.; SMITH, G. D. Insulin Signaling in Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*, v.77, n. 5, p. 872–879, 2007.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, v. 82/83, p.127-140, 2004.

ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; CROFT, C. S.; MAY, J. V.; GOSPODAROWICZ, D. Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 57, n. 1, p. 7-14,1988.

ADHIKARI, B. N.; WALL, D. H.; ADAMS, B. J. Desiccation survival in an Antarctic nematode: Molecular analysis using expressed sequenced tags. *BMC Genomics*, v. 10, n. 5, p. 69, 2009.

ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocrinology Review*, v. 30, n. 5, p. 438-464, 2009.

ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HAMALAINEN, T.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, I.; LAN, Z. J.; LIU, K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, v. 3, n. 5, p. 397-410, 2010.



AGRAWA, L. R.; SLADKEVICIUS, P.; ENGMANN, L., CONWAY, G. S., PAYNE, N. N.; BEKIS, J.; TAN, S. L.; CAMPBELL, S.; JACOBS, H. S. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Human Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 651-655, 1998.

AGUILLAR, J. J.; WOODS, G. L.; MIRAGAYA, M. H. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on *in vitro* maturation of equine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology*, v. 56, n. 5, p. 745-758, 2001.

AHARONI, D.; MEIRI, I.; ATZMON, R.; VLODAVSKY, I.; AMSTERDAM, A. Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Current Biology*, v. 7, n. 1, p. 43-51, 1997.

AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF family: signaling; biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 5, p. 383-394, 2002.

AKAGI, K.; KYUN, P. E.; MOOD, K.; DAAR, I. O. Docking protein SNT1 is a critical mediator of fibroblast growth factor signaling during *Xenopus* embryonic development. *Developmental Dynamics*, v. 223, n. 2, p. 216-228, 2002.

ALARID, E. T.; RUBIN, J. S.; YOUNG, P.; CHEDID, M.; RON, D.; AARONSON, S. A.; CUNHA, G. R. Keratinocyte growth factor functions in epithelial induction during seminal vesicle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 3, p. 1074-1078, 1994.

ALBERT, C.; GARRIDO, N.; MERCADER, A.; RAO, C.V.; REMOHÍ, J.; SIMON, C; PELLICER, A. The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular Human Reproduction*, v. 8, n. 5, p. 409-418, 2002.

ALBERTINI, D. F.; BARRETT, S. L. Oocyte-somatic cell communication. *Reproduction Supplement*, v. 61, p. 49-54, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Sinalização por meio de receptores de superfície celular associados a enzimas*. Biologia molecular da célula; 4.ed. Porto Alegre; Br: Editora Artes Médicas. pp. 871-892; 2004.

ALI, A.; COENEN, K.; BOUSQUET, D.; SIRARD, M. C. Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the development competence of bovine oocyte. *Theriogenology*, v. 62, n. 9, p. 1596-1606, 2004.

ALMEIDA, A. P.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 3, p. 133-148, 2010.

ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES FILHO, J. G.; SILVA, G. M.; GONÇALVES, R. F. B.; BRITO, I. R.; SILVA, A. W. B.; LIMA, A. K. F.; CUNHA, R. M. S.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the *In vitro* Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. *Reproduction Domestic Animal*, 2011a, in press.

ALMEIDA, A. P.; SARAIVA, M. V. A.; ARAÚJO, V. R.; MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; FROTA, I. M. A.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Small Ruminant Research*, 2011b, in press.

ALOE, L. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biology*, v. 14, n. 7, p. 395-399, 2004.

AMALRIC, F.; BOUCHE, G.; BONNET, H.; BRETHENOU, P.; ROMAN, A. M.; TRUCHET, I.; QUARTO, N. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets. *Biochemistry Pharmacology*, v. 47, n. 1, p. 111-115, 1994.

AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 37, n. 3, p. 269-277, 2000.

AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertility and Sterility*, v. 79, Suppl., p. 682-682, 2003.

AMSTERDAM, A.; ROTMENSCH, S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine Reviews*, v. 8, n. 3, p.309-37, 1987.

AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; RIMON, E.; LAND, A.; COHEN, T.; DOR, Y.; HIRSH, L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochemistry Pharmacological*, v. 66, n. 8, p. 1355-1362, 2003.

AMSTERDAM, B.; MAY, J. V.; SCHOMBERG, D. W. Synergistic Effect of Insulin and Follicle-Stimulating Hormone on Biochemical and Morphological Differentiation of Porcine Granulosa Cells *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 39, n. 2, p. 379-390, 1988.

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 Research*, v. 25, n. 1, p. 49-72, 1993.

ANDERSON, R. A.; ROBINSON, L. L. L.; BROOKS, J.; SPEARS, N. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 87, n. 2, p. 890-897, 2002.

ANESETTI, G.; LOMBIDE, P.; D'ALBORA, H.; OJEDA, S. R. Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell and Tissue Research*, v. 306, n. 2, p. 231-237, 2001.

ANGELETTI, R. H.; BRADSHAW, R. A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.68, n. 10, p. 2417-2420, 1971.

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence; embryo development; p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*, v. 67, n. 2, p. 526-536, 2007.

ANTEBY, E. Y.; NATANSON-YARON, S.; HAMANI, Y.; SCIAKI, Y.; GOLDMAN-WOHL, D.; GREENFIELD, C.; ARIEL, I.; YAGEL, S. Fibroblast growth factor-10 and fibroblast growth factor receptors 1-4: expression and peptide localization in human decidua and placenta. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 119, n. 1, p. 27-35, 2005.

ANTOINE, M.; REIMERS, K.; DICKSON, C.; KIEFER, P. Fibroblast growth factor 3, a protein with dual subcellular localization, is targeted to the nucleus and nucleolus by the concerted action of two nuclear localization signals and a nucleolar retention signal. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 47, p. 29475-2981, 1997.

ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, G. M.; FERNANDES, D. D.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of culture medium replacement protocol on the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Small Ruminant Research*, v. 95, p. 139-143, 2011.

ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MAGALHÃES, D. M.; SILVA, G. M.; FERNANDES, D. D.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 4, p. 305-310, 2010.

ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*. v. 2, n. 3, p. 139-146, 1997.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, n. 5, p. 884-94, 2010.

ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B. S.; NAIK, B. R.; NAIDU, K. S.; KUMAR, R. V. S.; RAO, V. H. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 70, p. 93-100, 2007.

ASAKAI, R.; SONG, S. Y.; ITOH, N.; YAMAKUNI, T.; TAMURA, K.; OKAMOTO, R. Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 104, n. 1, p. 75-80, 1994.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction*, v. 3, n. 3, p. 1023-1031, 2003.

BAERWALD, A. R.; DAUK, S.; KANTHAN, R.; SINGH, J. Use of ultrasound bio microscopy to image human ovaries *in vitro*. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 34, n. 2, p. 201-207, 2009.

BAGAVANDOSS, P.; WILKS, J. W. Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from developing corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v. 44, n. 6, p. 1132-1139, 1991.

BAGG, M. A.; VASSENA, R.; PAPASSO-BRAMBILLA, E.; GRUPEN, C. G.; ARMSTRONG, D. T.; GANDOLFI, F. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology*, v. 62, n. 6, p. 1003-1011, 2004.

BAIRD, A.; HSUEH, A. J. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regulatory Peptides*, v. 16, n. 3-4, p. 243-50, 1986.

BAKER, S. J.; SPEARS, N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Human Reproduction Update*, v. 5, n. 2, p. 153-165, 1999.

BALTUS, A. E.; MENKE, D. B.; HU, Y. C.; GOODHEART, M. L.; CARPENTER, A. E.; DE ROOIJ, D. G.; PAGE, D. C. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics*, v. 38, n. 12, p. 1430-1434, 2006.

BANWELL, K. M.; LANE, M.; RUSSELL, D. L.; KIND, K. L.; THOMPSON, J. G. Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Human Reproduction*, v. 22, n. 10, p. 2768-2775, 2007.

BAO, B.; GARVERICK, S.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; BRENT, F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment

and selection of bovine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 5, p. 1158-1158, 1997.

BARBONI, B.; MATTIOLI, M.; GIOGIA, L.; TURRIANI, M.; CAPACCHIETTI, G.; BERARDINELLI, P.; BERNABO, N. Preovulatory rise of NGF in follicular fluid: possible involvement in the control of oocyte maturation. *Microscopy Research and Technique*, v. 59, n. 6, p. 516-521, 2002.

BARKER, P. A. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, v. 42, n. 4, p. 529-533, 2004.

BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, v. 12, n. 5, p. 537-55, 2006.

BARRETT, G. L. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology*, v. 61, n. 6, p. 205-229, 2000.

BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Advances in Cancer in Research*, v. 59, p. 115- 65, 1992.

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

BATHIA, M. Apoptosis versus necrosis. *American Journal Physiology - Renal Physiology*, v. 284, p. 608-627, 2004.

BAUD, V.; KARIN, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 1, p. 33-40, 2009.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; WU, G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, v. 138, n. 2, p. 195-209, 2009.

BECK, A. R.; MILLER, I. J.; ANDERSON, P.; STREULI, M. RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 5, p. 2331-2336. 1998.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology; pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 3, p. 235-253, 2009.

BEER, H. D.; VINDEVOGHE, L.; GAIT, M. J.; REVESTD, J. R. M.; MASON, I.; DICKSON, C.; WERNER, S. Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor 1-IIIb is a naturally occurring functional receptor for fgfs that is preferentially expressed in the skin and the brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 21, p.16091-16097, 2000.

BENDELL, J. J.; DORRINGTON, J. Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor-beta-like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 123, n. 2, p. 941-948, 1988.

BEN-HAROUSH, A.; ABIR, R.; ARO, A.; JIN, S.; KESSLER-ICEKSON, G.; FELDBERG, D.; FISCH, B. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fertility and Sterility*, v. 84, Suppl 2, p. 1257-1268, 2005.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 167, n. 3, p.371-382, 2000.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 4, p. 1106-1114, 2000.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 67, n. 2, p. 162-71, 2004.

BERISHA, B.; STEFFL, M.; AMSELGRUBER, W.; SCHAMS, D. Changes in fibroblast growth factor 2 and its receptors in bovine follicles before and after GnRH application and after ovulation. *Reproduction*, v. 131, n. 2, p. 319-29, 2006a.

BERISHA, B.; WELTER, H.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A.; MEYER, H.; SCHAMS, D. Expression of fibroblast growth factor 1 (FGF1) and FGF7 in mature follicles during the periovulatory period after GnRH in the cow. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n. 2, p. 307-313, 2006b.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER HURK, R. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v. 47, p. 13-22, 1997.

BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; LIMA, A. K. F.; OLIVEIRA, L. C.; CECCHI, R.; LUCCI, C. M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. *Ciência Animal*, v. 8, p. 47-56, 1998.

BHAKAR, A. L.; HOWELL, J. L.; PAUL, C. E.; SALEHI, A. H.; BECKER, E. B.; SAID, F.; BONNI, A.; BARKER, P. A. Apoptosis induced by p75NTR overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, v. 23, n. 36, p. 11373–11381, 2003.

BISHAYEE, S.; MAJUMDAR, S.; SCHER, C. D.; KAHN, S. Characterization of a novel anti-peptide antibody that recognizes a specific conformation of the platelet-derived growth factor receptor. *Molecular and Cellular Biology*, v. 8, n. 9, p.3696-3702, 1998.

BJORLING, D. E.; BECKMAN, M.; CLAYTON, M. K.; WANG, Z. Y. Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience*, v.110, n. 1, p. 155-67, 2002.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signaling. *Nature*, v. 411, n. 6835, p.355-365, 2001.

BOILLY, B.; VERCOUTTER-EDOUART, A. S.; HONDERMARCK, H.; NURCOMBE, V.; LE BOURHIS, X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Reviews*, v.11, n. 4, p. 295-302, 2000.

BOTCHKAREV, V. A.; BOTCHKAREVA, N. V.; ALBERS, K. M.; CHEN, L.; WELKER, P.; PAUS, R. A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis driven hair follicle regression. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 14, n. 13, p. 1931-1942, 2000.

BOTTCHER, R. T.; NIEHRS, C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews*, v. 26, p. 63-77, 2005.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. *Biochemistry*, v. 70, n. 1, p. 231-239, 2005.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 187, n. 1-2, p. 11-18, 2002.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, n. 2, p. 165–171, 1997.

BREVINI-GANDOLFI, T.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v. 66, n. 1, p. 5-13, 2006.

BROEKMANS, F. J.; KNAUFF, E. A.; TEVELDE, E. R.; MACKLON, N. S.; FAUSER, B. C. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 18, n. 2, p. 58-65, 2007.

BRUNET, A.; DATTA, S. R.; GREENBERG, M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 11, n. 3, p. 297-305, 2001.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. *Reproduction Fertility and Development*, v. 21, p. 679-687, 2009b.

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.; BÁO, 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, n. 5, p. 414-421, 2010.

BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; MAIA-JR, J. E.; BÁO, S. N.; NOBRE JUNIOR, H. V.; MAIA, F. D.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Característica histológica, ultraestrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 1329-1337, 2008.

BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CHAVES, R. N.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE I. B.; ARAÚJO, V. R.; FIGUEIREDO J. R. Angiogenic factors and ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 2, p. 371-379, 2009a.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 43, n. 4, p. 543-547, 1990.

BUCHER, P. Regulatory elements and expression profiles. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, n. 3, p. 400-407, 1999.

BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M. R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, N. B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproduction Biology Endocrinology*, v. 4, p. 2-20, 2005.

BURATINI JR, J.; GLAPINSKI, V. F.; GIOMETTI, I. C.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B.; AVELLAR, M. C.; BARROS, C. M.; PRICE, C. A. Expression of fibroblastic growth factor-8



and its cognate receptors, fibroblastic growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. *Molecular Reproductive and Development*, v. 70, n. 3, p. 255-261, 2005a.

BURATINI Jr, J.; PINTO, M. G. L.; GIOMETTI, I. C.; COSTA, I. B., TEIXEIRA, A. B.; BARROS, C. M.; PRICE, C. A. Fibroblast growth factor 10 gene expression in bovine antral follicles. *Biology of Reproduction Special Issue*, p. 269-270, 2004.

BURATINI Jr, J.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B.; GLAPINSKI, V. F.; PINTO, M. G. L.; GIOMETTI, I.; BARROS, C. M.; CAO, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, v. 130, n. 3, p. 343-50, 2005b.

BURATINI Jr., J.; PINTO, M. G. L.; CASTILHO, A. C.; AMORIM, R. L.; GIOMETTI, I. C.; PORTELA, V. M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v. 77, n. 4, p. 743-50, 2007.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.

BUTCHER, L.; ULLMANN, S. L. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, n. 4, p. 535-539, 1996.

BYSKOV, A. G.; FADDY, M. J.; LEMMEN, J. G.; ANDERSEN, C. Y. Eggs forever? *Differentiation*, v. 73, n. 9-10, p. 438-446, 2005.

CALZA, L.; GIARDINO, L.; GIULIANI, A.; ALOE, L.; LEVI-MONTALCINI, R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 7, p. 4160-4165, 2001.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.; VALE FILHO, V. R. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction*, v. 3, p. 19-28, 2006.

CAMPBELL, B. K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*, v. 6, p.159-171, 2009.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 106, n. 1, p. 7-16, 1996.

CAMPBELL, W. J.; MILLER, K. A.; ANDERSON, T. M. Expression of fibroblast growth factor receptors by embryonal carcinoma cells and early mouse embryos. *In vitro Cellular Development Biology*, v. 28, n. 1, p. 61–66, 1992.

CANTARELLA, G.; LEMPEREUR, L.; PRESTA, M.; RIBATTI, D.; LOMBARDO, G.; LAZAROVICI, F.; ZAPPALÀ, G.; PAFUMI, C.; BERNARDINI, R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v.21, n. 10, p. 21–29, 2002.

CANTLEY, L. C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, v. 296, n. 5573, p.1655-1657, 2002.

CAO, M.; NICOLA, E.; PORTELA, V. M.; PRICE, C. A. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells *in vitro*. *Matrix Biological*, v. 25, n. 6, p. 342-354, 2006.

CAPORALI, A.; EMANUELI, C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiology Review*, v. 89, n. 1, p. 279-308, 2009.

CARINI, R.; AUTELLI, R.; BELLOMO, G.; DIANZANI, M.U.; ALBANO, E. Sodium mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochemistry Biophysic Research Commun*, v. 206, n. 1, p. 180-185, 1995.

CARLONE, D. L.; RIDER, V. Embryonic modulation of basic fibroblast growth factor in the rat uterus. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 4, p. 653-65, 1993.

CARNEIRO, G. F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 268-273, 2007.

CARNEIRO, G. F. Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. *Ciência & Tecnologia Veterinária*, v. 2, p. 5-10, 2002.

CARNEIRO, G. F.; NAKAZAWA, M.; CASTRO, S. B. M.; GOMES, Y. M. Efeito do IGF-I na maturação *in vitro* de oócitos caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais...* Beberibe, CE: SBTE, 2003. p. 286.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 899-905, 2001.

CARNEVALE, E. M. Gamete intrafallopian transfer. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n. 1, p. 47-60, 1996.

CASTILHO, A. C. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. 80f. Botucatu; SP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências; Universidade Estadual Paulista; 2008c.

CASTILHO, A. C.; GIOMETTI, I. C.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; PRICE, C. A.; AMORIM, R. L.; PAPA, P. C.; BURATINI, JR., J. Expression of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in the Bovine Corpus Luteum. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, n. 5, p. 940-45, 2008a.

CASTILHO; A. C. Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) mRNA expression around follicular deviation in *Bos indicus* heifers. In: *International Symposium on Animal Biology of Reproduction*; v. 2. (São Paulo; Brasil). p. 218; 2008b.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 60, n. 3, p. 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.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant Epidermal Growth Factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reproductive Sciences*, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009b.

CELESTINO, J. J. H.; CHAVES, R. N.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; MAIA-JÚNIOR, J. E.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 4, p. 495-508, 2009a.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; ALMEIDA, A. P.; CUNHA, R. M.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, 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 and Development*, v. 77, n. 3, p. 231-40, 2010a.

CELESTINO, J. J. H. Efeito do kit ligand (KL), proteína morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e fator de crescimento epidermal (EGF) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos Pré-antrais caprinos. 309f. Fortaleza; CE. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará; 2010b.

CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LOPES C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R.

Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 16, n. 338, p.1-9, 2011.

CHANG, H., MATZUK, M. M. Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mechanisms of Development*, v. 1, n. 2, p. 61-67. 2001.

CHAO; V. M. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nature Review*, v. 4, n. 4, p. 299-309, 2003.

CHAVES, R. N.; ALVES, A. M. C. V.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J. H.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Nerve Growth Factor Promotes the Survival of Goat Preantral Follicles Cultured *in vitro*. *Cells Tissues Organs*, v. 192, n. 4, p. 272-282, 2010a.

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

CHAVES, R. N.; LIMA-VERDE, I. B.; CELESTINO, J. J. H.; DUARTE, A. B. G.; ALVES, A. M. C. V.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; BURATINI, Jr. J.; FIGUEIREDO, J.R. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 39, n. 4, p. 249-258, 2010b.

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.; BÁO, 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, n. 5, p. 640-647, 2008.

CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrinology Review*, v. 16, n. 2, p. 117-142, 1995.

CHEN, C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Fibroblast growth factor-10: a stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 3, p. 959-66, 2000.

CHIAN, R. C.; LIM, J. H.; TAN, S. L. State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*, v. 16, n. 3, p. 211-219, 2004.

CHIARETTI, A.; PIASTRA, M.; CARESTA, E.; NANNI, L.; ALOE, L. Improving ischaemic skin revascularisation by nerve growth factor in a child with crush syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, v. 87, n. 5, p. 446-448, 2002.

CHO, J.; ITOH, T.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, n. 12, p.1736-1743, 2008.

CHOI, Y.; BALLOW, D. J.; XIN, Y.; RAJKOVIC, A. Lim homeobox gene, Lhx8, is essential for mouse oocyte differentiation and survival. *Biology of Reproduction*, v. 79, n. 3, p. 442-449, 2008.

CHUNG, J.; GRAMMER, T.; LEMON, K.; KAZLAUSKAS, A.; BLENIS, J. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, v. 370, n. 6484, p. 71-75, 1994.

COLVIN, J. S., GREEN, R. P., SCHMAHL, J., CAPEL, B.; ORNITZ, D. M. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, v. 104, n. 6, p. 875-889, 2001.

COMBELLES, C. M.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D. F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Human Reproduction*, v. 17, n. 4, p. 1006-1016, 2002.

CONLEY, A. J.; BIRD, I. M. The role of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the D5 and D4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 4, p. 789-99, 1997.

CORBIT, K. C.; FOSTER, D. A.; ROSNER, M. R. Protein kinase C delta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, n. 6, p. 4209-4218, 1999.

CORDON-CARDO, C.; TAPLEY, P.; JING, S.; NANDURI, V.; O'ROURKE, E.; LAMBALLE, F.; KOVARY, K.; JONES, K.; REICHARDT, L. F., BARBACID, M. The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell*, v. 66, n. 1, p. 173-183, 1991.

CORDON-CARDO, C.; VLODAVSKY, I.; HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; HICKLIN, D.; FUKS, Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Laboratory Investigation*, v. 63, n. 6, p. 832-840, 1990.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction Domestic Animal*, v. 36, n. 1, 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, n. 12, p. 2656-2666, 1996.

COTTON, L. M.; O'BRYAN, M. K.; HINTON, B. T. Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocrinology Review*, v. 29, n. 2, p. 193-216, 2008.

COVACEUSZACH, S.; CASSETTA, A.; CATTANEO, A.; LAMBA, D. Purification; crystallization; X-ray diffraction analysis and phasing of a Fab fragment of monoclonal neuroantibody alphaD11 against nerve growth factor. *Acta Crystallographica Section D. Biological. Crystallography*, v. 60, n. 7, p. 1323-1327, 2004.

CREWS, C.; ALESSANDRINI, A.; ERIKSON, E. The primary structure of MEK; a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, v. 258, p. 478-480, 1992.

CROSS, M. J.; CLAESSION-WELSH, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacological Science*, v. 22, n. 4, p. 201-207, 2001.

CROSSLEY, P. H.; MARTIN, G. R. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, v. 121, n. 2, p. 439-451, 1995.

CROZET, N.; AHMED, A.; DUBOS, M. P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 105, n. 5081, p. 293-298, 1995.

CROZET, N.; DAHIREL, M.; GALL, L. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, n. 2, p. 367-373, 2000.

CURCIO, B. R. *Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I*. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2005.

CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: A model for studies on the activation of primordial follicles. *Human Reproduction*, v. 174, n. 1, p. 48-54, 2002.

DAPHNA-IKEN, D.; SHANKAR, D. B.; LAWSHÉ, A.; ORNITZ, D. M.; SHACKLEFORD, G. M.; MACARTHUR, C. A. MMTV-Fgf8 transgenic mice develop mammary and salivary gland neoplasia and ovarian stromal hyperplasia. *Oncogene*, v. 17, n. 21, p. 2711-2717, 1998.

DATSI, G. A.; BERDIKI, A.; NIKITOVIC, D.; MYTILINEOU, M.; KATONIS, P.; KARAMANOS, N. K.; TZANAKAKIS, G. N. Parathyroid hormone affects the fibroblast growth factor-proteoglycan signaling axis to regulate osteosarcoma cell migration. *FEBS Journal*, v. 278, n. 19, p. 3782-3792, 2011.

DE CLERCK, L. S.; BRIDTS, C. H.; MERTENS, A. M.; MOENS, M. M.; STEVENS, W. J. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *Journal of Immunological Methods*, v. 172, n. 1, p. 115-124, 1994.

DEANGELIS, M. H.; KIRCHNER, C. Fibroblast growth factor induced primitive streak formation in rabbit preimplantation embryos *in vitro*. *Anatomy Embryology*, v. 187, n. 3, p. 269-273, 1993.

DEES, W. L., HINEY, J. K.; SCHULTEA, T. D.; MEYERHOFER, A.; DANILCHIK, M.; DISSEN, G. A.; OJEDA, S. R. The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*, v. 136, n. 12, p. 5760-5768, 1995.

DELL'ERA, P., BELLERI, M., STABILE, H., MASSARDI, M. L., RIBATTI, D. AND PRESTA, M. Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells. *Oncogene*, v. 20, n. 21, p. 2655-2663, 2001.

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, n. 2, p. 147-156, 2005.

DEMEESTERE, I.; DELBAERE, A.; GERVY, C.; VAN DEN BERGH, M.; DEVREKE, F.; ENGLERT, Y. Effect of preantral follicle isolation technique on in-vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Human Reproduction*, v. 17, n. 8, p. 2152-2159, 2002.

DEO, D. D.; AXELRAD, T. W.; ROBERT, E. G.; MARCHESELLI, V.; BAZAN, N. G.; HUNT, J. D. Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 24, p. 21237-21245, 2002.

DEROANNE, C. F.; HAJITOU, A.; CALBERG-BACQ, C. M.; NUSGENS, B. V.; LAPIÈRE, C. M. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Research*, v. 57, n. 24, p. 5590-5597, 1997.

DERRAR, N.; PRICE, C. A.; SIRARD, M. A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. *Theriogenology*, v. 54, n. 4, p. 587-98, 2000.

DETILLIEUX, K. A.; SHEIKH, F.; KARDAMI, E.; CATTINI, P. A. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovascular Research*, v. 57, n. 1, p. 8-19, 2003.

DIAMOND, M. P.; WEBSTER, B. W.; CARR, R. K.; WENTZ, A. C.; OSTEEN, K. G. Human follicular fluid insulin concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 61, n. 5, p. 990–992, 1985.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 5-20, 2002.

DISSEN, G. A.; HILL, D.F.; COSTA, M. E.; DEES, W. L.; LARA, H. E.; OJEDA, S. R. A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*, v. 137, n. 1, p. 198–209, 1996a.

DISSEN, G. A.; GARCIA-RUDAZ, C.; OJEDA, S. R. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Seminars in reproductive medicine*, v. 27, n. 1, p. 24–31, 2009a.

DISSEN, G. A.; GARCIA-RUDAZ, C.; PAREDES, A.; MAYER, C.; MAYERHOFER, A.; OJEDA, S. R. Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*, v. 150, n. 6, p. 2906–2914, 2009b.

DISSEN, G. A.; HILL, D. F.; COSTA, M. E.; MA, Y. J.; OJEDA, S. R. Nerve growth factor in the peripubertal rat ovary. *Molecular Endocrinology*, v. 5, n. 11, p. 1642–1650, 1991.

DISSEN, G. A.; HIRSHFIELD, A. N.; MALAMD, S.; OJEDA, S. R. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*, v. 136, n. 10, p. 4681–4692, 1995.

DISSEN, G. A.; LARA, H. E.; LEYTON, V.; PAREDES, A.; HILL, D. F.; COSTA, M. E.; MARTINEZ-SERRANO, A.; OJEDA, S. R. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology*, v. 141, n. 3, p. 1073–1082, 2000a.

DISSEN, G. A.; MAYERHOFER, A.; OJEDA, S. R. Participation of nerve growth factor in the regulation of ovarian function. *Zygote*, v. 4, n. 4, p. 309–312, 1996b.

DISSEN, G. A.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K.; HILL, D. F.; COSTA, M. E.; OJEDA, S. R. Direct effects of nerve growth factor on theca cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*, v. 141, n. 12, p. 4736–4750, 2000b.

DISSEN, G. A.; ROMERO, C.; HIRSHFIELD, A. N.; OJEDA, S. R. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*, v. 142, n. 5, p. 2078–2086, 2001.



DISSEN, G. A.; ROMERO, C.; PAREDES, A.; OJEDA, S. R. Neurotrophic control of ovarian development. *Microscopy Research and Technique*, v. 59, n. 6, p. 509–515, 2002.

DODSON, W. C.; SCHOMBERG, D. W. The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 120, n. 2, p. 512–516, 1987.

DOLE, G.; NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell–cell interactions during folliculogenesis. *Reproduction*, v. 135, n. 5, p. 671-682, 2008.

DOWNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, v. 39, p. 65-79, 1993.

DOWNS, S. M.; HUMPHERSON, P. G.; ELEESE, H. J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocyte: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 4, p. 1084-1094, 1998.

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

DRIANCOURT, M. A.; REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Roles of Kit and Kit Ligand in ovarian function. *Reviews of Reproduction*, v. 5, n. 3, p. 143-152, 2000.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 4, p. 1-11, 2006.

DRUMMOND, A. E.; TELLBACH, M.; DYSON, M.; FINDLAY, J. K. Fibroblast growth factor-9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology*, v. 148, n. 8, p. 3711-3721, 2007.

DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, G. M.; LOPES, C. A. P.; TAVARES, L. M. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Follicular interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Zygote*, v. 19, n. 3, p. 215-227, 2010.

DULEBA, A. J.; SPACZYNSKI, R. Z.; OLIVE, D. L.; BEHRMAN, H. R. Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 4, p. 891–897, 1997.

DUMESIC, D.; SCHRAMM, R.; PETERSON, E.; PAPROCKI, A.; ZHOU, R.; ABBOTT, D. Impaired developmental competence of oocytes in adult prenatally androgenized female rhesus monkeys undergoing gonadotropin stimulation for *in vitro* fertilization. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolic*, v. 87, n. 3, p. 1111–1119, 2002.

DURLINGER, A. L. L.; VISSER, J. A.; THEMME, A. P. N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, v. 124, n. 5, p. 601-609, 2002.

DURLINGER, A. L.; GRUIJTERS, M. J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; KUMAR, T. R.; MATZUK, M. M.; ROSE, U. M.; DE JONG, F. H.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMME, A. P. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 142, n. 11, p. 4891-4899, 2001.

DURLINGER, A. L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F. H.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMME, A. P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, v. 12, n. 12, p. 5789-5796, 1999.

EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive Biomed Online*, v. 12, n. 4, p. 507-512, 2006.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, v. 30, n. 6, p. 624-712, 2009.

EILEEN, A.; MCLAUGHLIN.; MCIVER S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle Development. *Reproduction*, v. 137, n. 1, p. 1-11, 2009.

ELLMAN, M. B.; HOWARD, S.; PRASUNA MUDDASANI, A. N.; HEE-JEONG, I. M. Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene*, v. 420, n. 1, p. 82-89, 2008.

EMANUELI, C.; SALIS, M. B.; PINNA, A.; GRAIANI, G.; MANNI, L.; MADEDDU, P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hind limbs. *Circulation*, v. 106, n. 17, p. 2257-2262, 2002.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of PI3K as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 8, p. 606-619, 2006.

EPIFANO, O.; DEAN, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 13, n. 4, p. 169-173, 2002.

EPPIG, J. J. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes *in vitro*. *Human Reproduction*, v. 9, n. 6, p. 974-976, 1994.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

EPPIG, J. J.; HOSOE, M.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. M.; REQUENA, A.; WATANABE, S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes *in vitro*: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, n. 1-2, p. 109–116, 2000.

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, n. 2, p. 268-276, 1989.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceeding of the National Academy Science of the United States of the America*, v. 99, n. 5, p. 2890-2894, 2002.

ERIC, R.; BISHOP, J. D.; WADDLE, J. A.; SCHUMACHER, J. M.; RUEYLING, LIN. The aurora kinase AIR-2 functions in the release of chromosome cohesion in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *The Journal of Cell Biology*, v. 157, n. 2, p. 219-229. 2002.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, v. 4, p. 233-254, 1986.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Review*, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.

ETO, H.; SUGA, H.; AOI, N.; KATO, H.; DOI, K.; KUNO, S.; TABATA, Y.; YOSHIMURA, K. Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars: upregulation of MMP-1 and HGF expression. *Laboratory Investigation*, 2011, in press.

FAHNESTOCK, M.; YU, G.; COUGHLIN, M. D. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Progress in Brain Research*, v. 146, p. 101-110, 2004.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FASCIANA, C.; VAN DER MADE, A. C.; FABER, P. W.; TRAPMAN, J. Androgen regulation of the rat keratinocyte growth factor (KGF/FGF7) promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 220, n. 3, p. 858-863, 1996.

FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LIMA, I. M.; SILVA, C. M.; SARAIVA, M. V.; LIMA, L. F.; SILVA, A. W.; DONATO, M. A.; CAMPELLO, C. C.; PEIXOTO, C. A.;

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Expression of Keratinocyte Growth Factor in Goat Ovaries and Its Effects on Preantral Follicles Within Cultured Ovarian Cortex. *Reproductive Science*, 2011, *in press*.

FELMEDEN, D. C.; BLANN, A. D.; LIP, G. Y. H. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal*, v. 24, n. 7, p. 586–603, 2003.

FERNANDES, C. B. *Maturação in vitro de ovócitos eqüinos: comparação entre meios TCM 199, SOFaa e HTF: BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio do crescimento eqüino por meio da transferência de ovócito*. 2004. 129f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.

FERNIG, D. G.; GALLAGHER, J. T. Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Progress in Growth Factor Research*, v. 5, n. 4, p. 353-377, 1994.

FEUERSTEIN, P.; CADORETA, V.; DALBIES-TRANA, R.; GUÉRIFA, F.; ROYÈREA, D. Le dialogue ovocyte–cumulus. *Gynecology Obstetrique & Fertilité*, v. 34, n. 9, p. 793-800, 2006.

FIELDS, S. D.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor requirements for *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 75, n. 8, p. 1466-1475, 2011.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, A. P. R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 192–195, 2011a.

FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D.; RODRIGUES, A. P. R.; de BEM, A. R. *In vitro* development of isolated bovine preantral follicles. *Arquivo Faculdade UFRGS*, v. 25, p. 93-107, 1997.

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, n. 4, 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 – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F (Eds.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca; 2008; cap.16; p. 303-327.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R. Cryopreservation and *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 1, p. 40–47, 2011b.

FINCH, P. W.; RUBIN, J. S. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Advanced Cancer Research*, v. 91, p. 69–136, 2004.

FISSORE, R. A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J.; ZHANG, M.; SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, v. 124, n. 6, p. 745-754, 2002.

FLORKIEWICZ, R. Z.; ANCHIN, J.; BAIRD, A. The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 1, p. 544-551, 1998.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

FORMAN-KAY, J. D.; PAWSON, T. Diversity in protein recognition by PTB domains. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, n. 6, p. 690-695, 1999.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. *Molecular Cellular and Endocrinology*, v. 163, n. 1-2, p. 53-60, 2000.

FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S. A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology*, v. 49, n. 2, p. 441-449, 1998.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

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

FOULADI-NASHTA, A. A.; CAMPBELL, K. H. S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction*, v. 131, n. 3, p. 449–460, 2006.

GABLER, C.; PLATH-GABLER, A.; EINSPANIER, A.; EINSPANIER, R. Insulin-like and fibroblast growth factors and their receptors are differentially expressed in the oviduct of the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) during the ovulatory cycle. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 6, p. 1451–1457, 1998.

GABLER, C.; PLATH-GABLER, A.; KILLIAN, G. J.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. Expression Pattern of Fibroblast Growth Factor (FGF) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) System Members in Bovine Corpus Luteum Endothelial Cells During Treatment with FGF-2, VEGF or Oestradiol. *Reproduction Domestic Animal*, v. 39, n. 5, p. 321–327, 2004.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction*, v. 15, n. 2, p. 395-401, 2000.

GARCIA, R. A.; SANCHEZ, M. A.; LETELIER, C.; GARCIA, P. P.; SANCHEZ, B.; VILAR, M. P.; GONZALEZ-BULNES, A.; FLORES, J. M. Changes in fibroblast growth factor-2 in ovine follicle development. *Reproduction Domestic Animal*, v. 41, n. 2, p. 105, 2006.

GARCIA-RUDAZ, C.; DORFMAN, M.; NAGALLA, S.; SVECHNIKOV, K.; SÖDER, O.; OJEDA, S. R.; DISSEN, G. A. Excessive ovarian production of nerve growth factor elicits granulosa cell apoptosis by setting in motion a tumor necrosis factor  $\alpha$ /stathmin-mediated death signaling pathway. *Reproduction*, v.142, n. 2, p. 319-331, 2011.

GARCIA-SUAREZ, O.; GERMANA, A.; HANNESTAD, J.; CIRIACO, E.; LAURA, R.; NAVES, J.; ESTEBAN, I.; SILOS-SANTIAGO, I.; VEJA, JA. TrkA is necessary for the normal development of the murine thymus. *Journal of Neuroimmunology*, v. 108, n. 1-2, p. 11-21, 2000.

GAROR, R.; RONIT, A.; ERMAN, A.; FELZ, C.; NITKE, S.; FISCH, B. Effects of basic fibroblast growth factor on *in vitro* development of human ovarian primordial follicles. *Fertility and Sterility*, v. 91, n. 5, p. 1967-1975, 2009.

GAUTIER, J.; MALLER, J. L. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism pre-MPF activation. *The EMBO Journal*, v. 10, n. 1, p. 177-182, 1991.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GIRI, D.; ROPIQUET, F.; ITTMANN, M. FGF9 is an autocrine and paracrine prostatic growth factor expressed by prostatic stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 180, n. 1, p. 53-60, 1999.

GITAY-GOREN, H.; KIM, I. C.; MIGGANS, S. T.; SCHOMBERG, D. W. Transforming growth factor beta modulates gonadotropin receptor expression in porcine and rat granulosa cells differently. *Biology of Reproduction*, v. 48, n. 6, p. 1284-1289, 1993.

GLAMOCLIIJA, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, v. 83, n. 2, p. 426-431, 2005.

GLEBOVA, N. O.; GINTY, D. D. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annual Review of Neuroscience*, v. 28, p. 191-222, 2005.

GLISTER, C., RICHARDS, S. L.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology*, v. 146, n. 4, p. 1883-1892, 2005.

GOETZ, R.; BEENKEN, A.; IBRAHIMI, O. A.; KALININA, J.; OLSEN, S. K.; ELISEENKOVA, A. V.; XU, C.; NEUBERT, T. A.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; YU, X.; WHITE, K. E.; INAGAKI, T.; KLIEWER, S. A.; YAMAMOTO, M.; KUROSU, H.; OGAWA, Y.; KUROO, M.; LANSKE, B.; RAZZAQUE, M. S.; MOHAMMADI, M. Molecular insights into the klotho-dependent; endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology*, v. 27, n. 9, p. 3417-3428, 2007.

GOLDFARB, M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 7, n. 4, p. 311-25, 1996.

GOLDFARB, M.; SCHOORLEMMER, J.; WILLIAMS, A.; DIWAKAR, S.; WANG, Q.; HUANG, X.; GIZA, J.; TCHETCHIK, D.; KELLEY, K.; VEGA, A.; MATTHEWS, G.; ROSSI, P.; ORNITZ, D.M.; D'ANGELO, E. Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, v. 55, n. 3, p. 449-463, 2007.

GOMES, J. E.; CORREIA, S. C.; GOUVEIA-OLIVEIRA, A.; CIDADAO, A. J.; PLANCHA, C. E. Three-dimensional environments preserve extracellular matrix compartments of ovarian follicles and increase FSH-dependent growth. *Molecular Reproduction and Development*, v. 54, n. 2, p. 163-172, 1999.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISITIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F (Eds.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, 395p. São Paulo: Editora Roca, 2008, p. 261-291.

GORDON, J. D.; SHIFREN, J. L.; FOULK, R. A.; TAYLOR, R. N.; JAFFE, R. B. Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 50, n. 9, p. 688-697, 1995.

GOSDEN, R. G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, n. 7, p. 125-129, 2000.

GOSPODAROWICZ, D.; PLOUET, J.; FUJII, D. K. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. *Endocrinology*, v. 125, n. 3, p. 1266-1276, 1989.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BEZARD, J.; GERARD, N. Maturation-promoting factor (MPF) and MAPK expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, n. 6, p. 563-570, 1998.

GOUGEON, A. Dynamics for human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In: Leung PCK, Adashi EY, eds. *The ovary*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press; p. 25-43, 2004.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Annales d'Endocrinologie*, v. 71, n. 3, p. 132-143, 2010.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, v. 17, n. 2, p. 121-155, 1996.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, n. 1-2, p. 33-41, 2000.

GOUGEON, A.; DELANGLE, A.; AROUCHE, N.; STRIDSBERG, M.; GOTTELAND, J. P.; LOUMAYE, E. Kit ligand and the somatostatin receptor antagonist, BIM-23627, stimulate *in vitro* resting follicle growth in the neonatal mouse ovary. *Endocrinology*, v. 151, n. 3, p. 1299-309, 2010.

GOUGEON, A.; DELANGLE, A.; AROUCHE, N.; STRIDSBERG, M.; GOTTELAND, J. P.; LOUMAYE, E. Kit ligand and the somatostatin receptor antagonist, BIM-23627, stimulate *in vitro* resting follicle growth in the neonatal mouse ovary. *Endocrinology*, v. 151, n. 3, p. 1299-309, 2010.

GRANDPRÉ, T.; LI, S. STRITTMATTER, S. M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, v. 417, n. 6888, p. 547-51, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D.; KRAFT, K. C.; REYNOLDS, L. P. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 130, n. 6, p. 3625-3632, 1992.



GRECO, A.; VILLA, R.; PIEROTTI, M. A. Genomic organization of the human NTRK1 gene. *Oncogene*, v. 13, n. 11, p. 2463-2466, 1996.

GREISEN, S.; LEDET, T.; OVESEN, P. Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Human Reproduction*, v. 16, n. 10, p. 2061-5, 2001.

GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRÜCK, I.; VIUFF, D.; BEZARD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. *In vitro* production of equine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 299-307, 1995.

GRÜNDKER, C.; KIRCHNER, C. Uterine fibroblast growth factor-2 and embryonic fibroblast growth factor receptor-1 at the beginning of gastrulation in the rabbit. *Anatomy and Embryology*, v. 194, n. 2, p. 169-175, 1996.

GUERPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biology of Reproduction*, v. 75, n. 6, p. 836-43, 2006.

GUERRA, D. M.; GIOMETTI, I. C.; PRICE, C. A.; ANDRADE, P. B.; CASTILHO, A. C.; MACHADO, M. F.; RIPAMONTE, P.; PAPA, P. C.; BURATINI JR, J. Expression of fibroblast growth factor receptors during development and regression of the bovine corpus luteum. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, n. 6, p.659-664, 2008.

GUIXUE, Z.; LUCIANO, A. M.; COENEN, K. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, n. 8, p. 1733-1743, 2001.

GUPTA, A.; BAZER, F. W.; JAEGER, L. A. Immunolocalization of acidic and basic fibroblast growth factors in porcine uterine and conceptus tissues. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 6, p. 1527-1536, 1997.

GUPTA, P. S. P.; NANDI, S.; RAVINDRANATHA, B. M.; SARMA, P. V. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology*, v. 57, n. 7, p. 1839-1854, 2002.

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, n. 1, p. 57-63, 2008.

GUTIERREZ, C. C.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antral formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 5, p.1322-1328, 2000.

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 3, p. 608–616, 1997.

HAASE, G.; PETTMANN, B.; RAOUL, C.; HENDERSON, C. E. Signaling by death receptors in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 18, n. 3, p. 284-291, 2008.

HADARI, Y. R.; GOTOH, N.; KOUHARA, H.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Critical role for the docking-protein FRS2 in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 15, p. 8578-8583, 2001.

HADARI, Y. R.; KOUHARA, H.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, n. 7, p. 3966-3973, 1998.

HALBÖÖK, F.; LUNDIN, L. G.; KULLANDER, K. Lampetra fluviatilis neurotrophin homolog; descendant of a neurotrophin ancestor; discloses the early molecular evolution of neurotrophins in the vertebrate subphylum. *The Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 21, p. 8700-8711, 1998.

HALPIN, D. M.; JONES, A.; FINK, G.; CHARLTON, H. M. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 77, n. 1, p. 287-296, 1986.

HANNEKEN, A.; YING, W.; LING, N.; BAIRD, A. Identification of soluble forms of the fibroblast growth factor receptor in blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 13, n. 19, p. 9170-9174, 1994.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 4, p. 900-909, 2004.

HANSEN, K. R.; KNOWLTON, N. S.; THYER, A. C.; CHARLESTON, J. S.; SOULES, M. R.; KLEIN, N. A. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Human Reproduction*, v. 23, n. 3, p. 699–708, 2008.

HARADA, H.; TOYONO, T.; TOYOSHIMA, K.; YAMASAKI, M.; ITOH, N.; KATO, S.; SEKINE, K.; OHUCHI, H. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, v. 129, n. 6, p. 1533-41, 2002.

HARADA, M.; MURAKAMI, H.; OKAWA, A.; OKIMOTO, N.; HIRAOKA, S.; NAKAHARA, T.; AKASAKA, R.; SHIRAISHI, Y.; FUTATSUGI, N.; MIZUTANI-KOSEKI, Y.; KUROIWA, A.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S.; TAJI, M.; ISEKI, S.; ORNITZ, D.M.; KOSEKI, H. FGF9 monomer/ dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nature Genetics*, v. 41, n. 3, p. 289-298, 2009.

HARDY, K.; WRIGHT, C. S.; FRANKS, S.; WINSTON, R. M. L. *In vitro* maturation of oocytes. *British Medical Bulletin*, v. 56, n. 3, p. 588-602, 2000.

HARSUM, S.; CLARKE, J. D.; MARTIN, P. A reciprocal relationship between cutaneous nerves and repairing skin wounds in the developing chick embryo. *Developments in Biologicals*, v. 238, n. 1, p. 27-29, 2001.

HARTSHORNE, G. M. *In vitro* culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction*, v. 2, n. 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. 863, n. 4, p. 1182-1192, 2006.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development*, v. 56, n. 4, p. 520-526, 2000.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, v. 140, n. 3, p. 1236-44, 1999.

HE, X. E.; GARCIA, K. C. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science*, v. 304, n. 5672, p. 870-875, 2004.

HEMAMALINI, N. C.; RAO, B. S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI R; NAIDU, K. S.; REDDY, K. K.; RAO, V. H. Influence of transforming growth factor- $\alpha$ , insulin like growth factorii, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Ruminant Research*, v. 50, n. 1, p. 11-22, 2003.

HENNIG, T.; MOGENSEN, C.; KIRSCH, J.; POHL, U.; GLOE, T. Shear Stress Induces the Release of an Endothelial Elastase: Role in Integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ -Mediated FGF-2 Release. *Journal Vascular Research*, v. 48, n. 6, p. 453-64, 2011.

HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; SHIMADA, M.; WAYNE, C. M.; OCHSNER, S. A.; WHITE, L.; RICHARDS, J. S. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 6, p. 1300–1321, 2006.

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, n. 2, p. 333–339, 1994.

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

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M. S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A. T.; DE BRUIJN, E. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Review*, v. 56, n. 4, p. 549–580, 2004.

HOLGADO-MADRUGA, M.; MOSCATELLO, D. K.; EMLET, D. R.; DIETERICH, R.; WONG, A. J. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 23, p. 12419-12424, 1997.

HOTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v. 129, n. 2, p. 235-244, 2005.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; ANIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R. M. L. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction*, v. 12, n. 5, p. 1032–1036, 1997.

HOYLE, G. W.; GRAHAM, R. M.; FINKELSTEIN, J. B.; NGUYEN, K. P. T.; GOZAL, D.; FRIEDMAN, M. Hyper innervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 18, n. 2, p. 149-157, 1998.

HUANG, Y., QI, S. H., SHU, B., CHEN, L., XIE, J. L., XU, Y. B. AND LIU, X. S. Fibroblast growth factor-binding protein facilitates the growth and migration of skin-derived precursors. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 15, n. 4, p. 201-209, 2011.

HUNTER, M. G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, v. 5, n. 2, p. 122-130, 2000.

HUNTER, R. H. F.; POLGE, C. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 12, n. 3, p. 525-531, 1966.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, v. 11, n. 2, p. 162-178, 2005.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, v. 296, n. 4, p. 514-521, 2006.

HUTT, K. J.; ALBERTINI, D. F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 14, n. 6, p. 758-764, 2007.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CARESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

IBAÑEZ, C. F. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci*, v. 21, n. 10, p. 438-444, 1998.

IBGE, 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil.

IBRAHIMI, O. A.; ZHANG, F.; ELISEENKOVA, A. V.; ITOH, N.; LINHARDT, R. J.; MOHAMMADI, M. Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Human Molecular Genetic*, v. 13, n. 19, p. 2313-2324, 2004.

IGARASHI, M.; FINCH, P. W.; AARONSON, S. A. Characterization of recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF)-10 Reveals Functional Similarities with Keratinocyte Growth Factor (FGF-7). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 21, p. 13230-13235, 1998.

ISHII, K.; IMAMURA, T.; IGUCHI, K.; ARASE, S.; YOSHIO, Y.; ARIMA, K.; HIRANO, K.; SUGIMURA, Y. Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth *in vivo*. *Endocrinology Related Cancer*, v. 16, n. 2, p. 415-428, 2009.

ITOH, N. Hormone-like (endocrine) Fgfs: Their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Research*, v. 342, n. 1, p. 1-11, 2010.

ITOH, N. The Fgf families in humans; mice; and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development; metabolism; and disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 10, p. 1819-1825, 2007.

ITOH, N.; ORNITZ, D. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*, v. 20, n. 11, p. 563-569, 2004.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development; metabolism and disease. *The Journal of Biochemistry*, v. 149, n. 2, p. 121-130, 2011.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Functional Evolutionary History of the Mouse *Fgf* Gene Family. *Developmental Dynamics*, v. 237, n. 1, p.18-27, 2008.

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, n. 4, p. 1099–1105, 2002.

IWAMOTO, M.; GOLDEN, E. B. G.; ADAMS, S. L.; NOJI, S.; PACIFICI, M. Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. *Experimental Cell Research*, v. 205, n. 2, p. 213-224, 1993.

IZUMI, S.; SLAYDEN, O. D.; RUBIN, J. S.; BRENNER, R. M. Keratinocyte growth factor and its receptor in the rhesus macaque placenta during the course of gestation. *Placenta*, v. 17, n. 2-3, p. 123–135, 1996.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v. 45, n. 4, p. 889-895, 1996.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. 3, p. 183-193, 1996.

JIN, S. Y.; LEI, L.; SHIKANOV, A.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. A novel two-step strategy for *in vitro* culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertility and Sterility*, v. 93, n. 8, p. 2633-2639, 2010.

JOHN, G. B.; SHIDLER, M. J.; BESMER, P.; CASTRILLON, D. H. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental Biology*, v. 331, n. 2, p. 292-299, 2009.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, n. 3-4, p. 185-201, 2003.

JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction*, v. 124, n. 1, p. 19-27, 2002.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v. 428, n. 6979, p. 145–150, 2004.

JORIO, A., MARIANA, J. C., LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D`man and Timahdite sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 26, n. 3-4, p. 239-250, 1991.

JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genetic*, v. 18, n. 3, p. 142-149, 2002.

JUENEJA, S. C.; BARR, K. J.; ENDERS, G. C.; KIDDER, G. M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biology of Reproduction*, v. 60, n. 5, p. 1263, 1999.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, N. P.; MCNATTY, O., K. P. Growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 6, p. 1134-1150, 2002b.

JUENGEL, J. L.; WHALE, L. J.; WYLDE, K. A., GREENWOOD, P.; MCNATTY, K. P.; ECKERY, D. C. Expression of anti-Müllerian hormone mRNA during gonadal and follicular development in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction Fertility and Development*, v. 5-6, n. 14, p. 345-53, 2002a.

JULIO-PIEPER, M.; LOZADA, P.; TAPIA, V.; VEGA, M.; MIRANDA, C.; VANTMAN, D.; OJEDA, S. R.; ROMERO, C. Nerve growth factor induces vascular endothelial growth factor expression in granulosa cells via a trkA receptor/mitogen-activated protein kinase-extracellularly regulated kinase 2-dependent pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 94, n. 8, p. 3065-3071, 2009.

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

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. A *Histologia e seus Métodos de Estudo*. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (Ed.), *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, 2004, p. 1-18.

KA, H.; AL-RAMADAN, S.; ERIKSON, D. W.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; SPENCER, T. E.; JAEGER, L. A.; BAZER, F. W. Regulation of expression of fibroblast growth factor 7 in the pig uterus by progesterone and estradiol. *Biology of Reproduction*, v. 77, n. 1, p. 172-180, 2007.

KA, H.; JAEGER, L. A.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Keratinocyte growth factor is up-regulated by estrogen in the porcine uterine endometrium and functions in trophoblast cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, v. 142, n. 6, p. 2303–2310, 2001.

KALININA, J.; BYRON, S. A.; MAKARENKOVA, H. P.; OLSEN, S. K.; ELISEENKOVA, A. V.; LAROCHELLE, W. J.; DHANABAL, M.; BLAIS, S.; ORNITZ, D. M.; DAY, L. A.; NEUBERT, T. A.; POLLOCK, P. M.; MOHAMMADI, M. Homodimerization controls the fibroblast growth factor 9 subfamily's receptor binding and heparan sulfate-dependent diffusion in the extracellular matrix. *Molecular and Cellular Biology*, v. 29, n. 17, p. 4663-4678, 2009.

KANDIEL, M. M.; WATANABE, G.; TAYA, K. Ovarian expression of inhibin-subunits, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, and cytochrome P450 aromatase during the estrous cycle and pregnancy of shiba goats (*Capra hircus*). *Experimental Animal*, v. 59, n. 5, p. 605-14, 2010.

KAPLAN, D. R.; HEMPSTEAD, B. L.; MARTIN-ZANCA, D.; CHAO, M. V.; PARADA, L. F. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*, v. 252, n. 5005, p. 554-558, 1991.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 10, n. 3, p. 381-391, 2000.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 431-436, 2006.

KATOH, Y.; KATOH, K. Comparative genomics on FGF-7, FGF-10, FGF-22 orthologs, and identification of FGF-25. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 16, n. 4, p. 767-770, 2005.

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

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S. Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J. D.; BATHGATE, R. A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 19, p. 7323-7328, 2004.

KAWAUCHI, T.; CHIHAMA, K.; NABESHIMA, Y.; HOSHINO, M. Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biology*, v. 8, n. 1, p. 17–26, 2006.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELI, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN, K. J.; SCHOLER, H. R. Oct4 is required for



primordial germ cell survival. *European Molecular Biology Organization Reports*, v. 5, n. 11, p. 1078-1083, 2004.

KEZELE, P. R.; NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 192, n. 1-2, p. 37-43, 2002.

KEZELE, P.; NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biology of Reproduction*, v. 73, n. 5, p. 967-973, 2005.

KHARITONENKOV, A. FGFs and metabolism. *Current Opinion Pharmacology*, v. 9, n. 6, p. 805-810, 2009.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, v. 123, n. 5, p. 613-620, 2002.

KIKUCHI, N.; ANDOH, K.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 1, p. 66-71, 2001.

KIM, B. K.; ANOWER JABED, M.; KANG, S. R.; KIM, D.; CHANG-HEE, H. A. N.; HUH, M. K.; KAMAL, T. Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 104, n. 1, p. 83-92, 2008.

KIM, I.; MOON, S.; YU, K.; KIM, U.; KOH, G. Y. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1518, n. 1-2, p.152-156, 2001.

KIM, S. J.; PARK, K.; RUDKIN, B. B.; DEY, B. R.; SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 5, p. 3739-3744, 1994.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 2, n. 2, p. 191-206, 2006.

KOBAYASHI, J.; MIZUNUMA, H.; KIKUCHI, N.; LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; YOKOTA, H.; YAMADA, K.; IBUKI, Y.; HAGIWARA, H. Morphological assessment of the effect of growth hormone on preantral follicles from 11-day-old mice in an *in vitro* culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 268, n. 1, p. 36-41, 2000.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. *Journal of Endocrinology*, v. 170, n. 2, p. 369-380, 2001.

KOHN, J.; ALOYZ, R. S.; TOMA, J. G.; HAAK-FRENDSCHO, M.; MILLER, F. D. Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 13, p. 5393-5408, 1999.

KOJI, T.; CHEDID, M.; RUBIN, J. S.; SLAYDEN, O. D.; CSAKY, K. G.; AARONSON, S. A.; BRENNER, R. M. Progesterone-dependent expression of keratinocyte growth factor mRNA in stromal cells of the primate endometrium: keratinocyte growth factor as a progestomedin. *The Journal of Cellular Biology*, v. 125, n. 2, p. 393-401, 1994.

KOMI-KURAMOCHI, A.; KAWANO, M.; ODA, Y.; ASADA, M.; SUZUKI, M.; OKI, J.; IMAMURA, T. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *Journal of Endocrinology*, v. 186, n. 2, p. 273-89, 2005.

KOSMAN, J.; CARMEAN, N.; LEAF, E. M.; DYAMENAHALLI, K.; BASSUK, J. A. Translocation of fibroblast growth factor-10 and its receptor into nuclei of human urothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 102, n. 3, p. 769-785, 2007.

KREUZER, H.; MASSEY, A. Engenharia genética e biotecnologia. Porto Alegre: ARTMED, p. 434, 2002.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, v. 82, E-Suppl, p. 45-51, 2004.

KRIZSAN-AGBAS, D.; PEDCHENKO, T.; HASAN, W.; SMITH, P. G. Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *European Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 10, p. 2760-2768, 2003.

KUSAKABE, M.; MASUYAMA, N.; HANAFUSA, H.; NISHIDA, E. *Xenopus* FRS2 is involved in early embryogenesis in cooperation with the Src family kinase Laloo. *EMBO Reports*, v. 2, n. 8, p. 727-735, 2001.

KWABI-ADDO, B.; OZEN, M.; ITTMANN, M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine- Related Cancer*, v. 11, n. 4, p. 709-24, 2004.

KWAN, C.; VENKATARAMAN, G.; SHRIVER, Z.; RAMAN, R.; LIU, D.; QI, Y.; VARTICOVSKI, L.; SASISEKHARAN, R. Probing fibroblast growth factor dimerization and

role of heparin-like glycosaminoglycans in modulating dimerization and signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 23421–23429, 2001.

LAEZZA, F.; LAMPERT, A.; KOZEL, M. A.; GERBER, B. R.; RUSH, A. M.; NERBONNE, J. M.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D.; ORNITZ, D. M. FGF14 N-terminals splice variants differentially modulate Nav1.2 and Nav1.6-encoded sodium channels. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 42, n. 2, p. 90-101, 2009.

LANGE, U. C.; SAITOU, M.; WESTERN, P. S.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Developmental Biology*, v. 3, n. 1, p. 1, 2003.

LAPOLT, P. S.; DAY, J. R.; LU, J. K. Effects of estradiol and progesterone on early embryonic development in aging rats. *Biology of Reproduction*, v. 43, n. 5, p. 843-850, 1990.

LARA, H. E.; DEES, W. L.; HINEY, J. K.; DISSEN, G. A.; RIVIER, C.; OJEDA, S. R. Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervations. *Endocrinology*, v. 129, n. 4, p. 1849–1860, 1991.

LARA, H. E.; HILL, D. F.; KATZ, K. H.; OJEDA, S. R. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology*, v. 126, n. 1, p. 357–363, 1990a.

LARA, H. E.; MCDONALD, J. K.; OJEDA, S. R. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*, v. 126, n. 1, p. 364–375, 1990b.

LATHAM, K.; BAUTISTA, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M.; EPPIG J. Comparison of protein synthesis patterns in mouse cumulus cells and mural granulosa cells: effects of follicle-stimulating hormone and insulin on granulosa cell differentiation *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 2, p. 482–492, 1999.

LAVRANOS, T. C.; RODGERS, H. F.; BERTONCELLO, I.; RODGERS, R. J. Ancho-rage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Experimental Cell Research*, v. 211, n. 2, p. 245–251, 1994.

LEANNE, M.; COTTON, M.; O'BRYAN, K.; HINTON, B. T. Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocrinology Review*, v. 29, n. 2, p.193-216, 2008.

LEBOVA, N. O.; GINTY, D. D. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 3, p. 743-751, 2005.

LEE JR, J. T.; MCCUBREY, J. A. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, v. 16, n. 4, p. 486-507, 2002.

LEE, J.; CHOO, J.; CHOI, Y.; LEE, K.; MIN, D.; PI, S.; SEOL, Y.; LEE, S.; JO, I.; CHUNG, C.; PARK, Y. Characterization of the surface immobilized synthetic heparin binding domain derived from human fibroblast growth factor-2 and its effect on osteoblast differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 83, n. 4, p. 970-979, 2008.

LEE, R.; KERMANI, P.; TENG, K. K.; HEMPSTEAD, B. L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1945-1948, 2001.

LEE, S. T.; CHOI, M. H.; GONG, S. P.; HAN, J. Y.; LIM, J. M. Establishment of a basic method for manipulating preantral follicles: effects of retrieval method on *in vitro* growth of preantral follicles and intrafollicular oocytes. *Zygote*, v. 15, n. 2, p. 109-116, 2007.

LEE, W. S.; YOON, S. J.; YOON, T. K.; CHA, K. Y.; LEE, S. H.; SHIMASAKI, S.; LEE, S.; LEE, K. A. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development*, v. 69, n. 2, p. 159-163, 2004.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.

LENZ, G. *Mecanismos de Transdução de Sinal Ativados por Purinas; Pirimidinas e Fatores de Crescimento em Culturas de Astrócitos*. [in Portuguese]. Porto Alegre; Brazil: Federal University of Rio Grande do Sul. Thesis, 2000.

LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS JR, C. T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, v.16, n. 2, p. 143-63. 1995.

LEVANTI, M. B.; GERMANA, A.; ABBATE, F.; MONTALBANO, G.; VEGA, J. A. GERMANA, G. TrkA and p75NTR in the ovary of adult cow and pig. *Journal of Anatomy*, v. 207, n. 1, p. 93-96, 2005.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, v. 237, n. 4819, p. 1154-1162, 1987.

LI, Z.; JOHNSON, A. L. Expression and regulation of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstenedione production in hen granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v. 49, n. 6, p. 1293-302, 1993.

LI; X. I.; DAI; Y.; ALLEN; W. R. Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes *in vitro* and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1391-1396, 2004.

LI; Z.; JIANG; Q.; SABET; M. R.; ZHANG; Y.; RITCHIE; T.; ENGELHARDT; J. F. Conditions for *in vitro* maturation and artificial activation of ferret oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 5, p. 1380-1386, 2002.

LIH-YUH, C.; CHUANG, W. P.; WU, M.; CHEN H.; TSAI S. Expression and Mitogenic Effect of Fibroblast Growth Factor-9 in Human Endometriotic Implant Is Regulated by Aberrant Production of Estrogen. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolic*, v. 88, n. 11, p. 5547-5554, 2003.

LIMA, I. M. T.; CELESTINO, J.J.H.; FAUSTINO, L. R.; MAGALHÃES, D. M.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; DONATO, M. A. M.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Dynamic Medium Containing Kit Ligand and Follicle-Stimulating Hormone Promotes Follicular Survival, Activation, and Growth during Long-Term *in vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. *Cell Tissue Organs*, 2011, *in press*.

LIMA, I.M.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Papel da Proteína Morfogênica Óssea 15 (BMP-15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 1, p. 3-20, 2011.

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; MARTINS, F. S.; SANTOS, R. R.; BÃO, S. N.; LUQUE, M. C. A.; VIEIRA, G. A. B.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 1, p. 57-65, 2009.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; MORORÓ, M. B. S.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Androstenedione and follicle stimulating hormone involvement in the viability and development of goat preantral follicles *in vitro*. *Animal Reproduction*, v. 7, n. 2, p. 80-89, 2010b.

LIMA-VERDE, I. B.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; TENÓRIO, S. B.; MARTINS, F. S.; CUNHA, L. D.; NAME, K. P. O.; BÃO, S. N., CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, v. 191, n. 3, p. 240-247, 2010a.

LIN, A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioassays*, v. 25, n. 1, p. 17-24, 2002.

LIU, H. C.; HE, Z.; ROSENWAKS, Z. *In vitro* culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertility and Sterility*, v. 77, n. 2, p. 373-383, 2002.

LIU, L.; RAJAREDDY, S.; REDDY, P.; DU, C.; JAGARLAMUDI, K.; SHEN, Y.; GUNNARSSON, D.; SELSTAM, G.; BOMAN, K.; LIU, K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development*, v. 134, n. 1, p. 199-209, 2007.

LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*, v. 140, n. 6, p. 2480-2485, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J. R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*, v. 115, n. 1-4, p. 201-214, 2009.

LOPEZ-ILASACA, M.; CRESPO, P.; PELLICI, P. G.; GUTKIND, J. S.; WETZKER, R. Linkage of G Protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase. *Science*, v. 275, n. 5298, p. 394-397, 1997.

LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJOBERG, J.; TUURI, T. The effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular Human Reproduction*, v. 6, n. 4, p. 694-698, 2000.

LU, W., LUO, Y., KAN, M. AND MCKEEHAN, W. L. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 18, p. 12827-12834, 1999.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R.; 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, n. 1, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C. M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association*, v. 41, n. 1, p. 61-69, 2001.

LUDWIG, M.; JELKMANN, W.; BAUER, O.; DIEDRICH, K. Prediction of severe ovarian hyperstimulation syndrome by free serum vascular endothelial growth factor concentration on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Human Reproduction*, v. 14, n. 10, p. 2437-2441, 1999.

LUMELSKY, N.; BLONDEL, O.; LAENG, P.; VELASCO, I.; RAVIN, R.; MCKAY, R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, v. 292, n. 5520, p. 1389-1394, 2001.

MACARTHUR, C. A.; LAWSHÉ, A.; XU, J.; SANTOS-OCAMPO, S.; HEIKINHEIMO, M.; CHELLAIAH, A. T.; ORNITZ, D. M. FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development*, v. 121, n. 11, p. 3603-3613, 1995.

MACHADO, M. F.; PORTELA, M. F.; PRICE, C. A.; COSTA, I. B.; RIPAMONTE, P.; AMORIM, R. L.; BURATINI JR., J. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 202, n. 3, p. 347-53, 2009.

MACHADO, R.; DA SILVA, J. C. B.; BARBOSA, R. T.; BISINOTTO, R. S.; SIQUEIRA, A. F. P.; BINELLI, M. Remoção farmacológica ou mecânica do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, supl. 1, p. 344, 2006.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 46, n. 5, p. 378-386, 2009a.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R., Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. *Biocell*, v. 33, n. 2, p. 91-97, 2009b.

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*, v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011.

MAHESHWARI, A.; FOWLER, P. A. Primordial follicular assembly in human revisited. *Zygote*, v. 4, n. 4, p. 285-296, 2008.

MARGUERIE, A.; BAJOLLE, F.; ZAFFRAN, S.; BROWN, N. A.; DICKSON, C.; BUCKINGHAM, M. E.; KELLY, R. G. Congenital heart defects in FGFR2-IIIb and FGF10 mutant mice. *Cardiovascular Research*, v. 71, n. 1, p. 50-60, 2006.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C.; SHAO, R., SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v. 123, n. 1, p. 23-30, 2002.

MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; OLIVEIRA, V. P.; NASCIMENTO, A. B.; CAETANO, H. V. A.; MENDES, C. M.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A.; VISINTIN, J. A. *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Animal Reproduction Science*, v. 97, n. 3-4, p. 375-381, 2007.

MARTE, B. M.; DOWNWARD, J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochemistry Science*, v. 22, n. 9, p. 355-358, 1997.

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M. M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFRERE, S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertility and Sterility*, v. 82, n. 5, p. 1390-1394, 2004.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C. M. G.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010b.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; MATOS, M. H.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. *Reproduction Fertility and Development*, p. 20, n. 8, p. 916-24, 2008.

MARTINS, F. S.; VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, v. 2, n. 3-4, p. 106-13, 2005.

MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; BRUNO, J.B.; ALMEIDA, A.P.; CUNHA, R.M.S.; SILVA, J.R.V.; CAMPELLO, C.C.; LUCCI, C.M.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of protein and mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. *Animal Reproduction*, v. 7, n. 349-361, 2010a.

MASUDA, H., OTSUKA, F., MATSUMOTO, Y., TAKANO, M., MIYOSHI, T., INAGAKI, K., SHIEN, T., TAIRA, N., MAKINO, H. AND DOIHARA, H. Functional interaction of fibroblast growth factor-8, bone morphogenetic protein and estrogen receptor in breast cancer cell proliferation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 343, n. 1-2, p. 7-17, 2011.



MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA, R. M.; LIMA-VERDE, I. B.; SANTOS, K. D.; SARAIVA, M. V.; SILVA, J. R. V.; MARTINS, F. S.; CHAVES, R.N.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Research in Veterinary Science*, v. 90, n. 3, p. 404-411, 2010.

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, A. M.; FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 15, n. 2, p. 173-182, 2007a.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 4, p. 433-442, 2007b.

MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; MARTINS, F. S.; SANTOS, R. R.; LUQUE, M. C. A.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural features of caprine preantral follicles after *in vitro* culture in the presence or absence of indole-3-acetic acid. *Animal Reproduction*, v. 3, n. 4, p. 415-422, 2006.

MATOS, M. H.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D.; ROCHA, R. M.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development*, v. 19, n. 5, p. 677-684, 2007c.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; GIOIA, L.; LUCIDI, P. Nerve growth factor production in sheep antral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 17, n. 4, p. 361-371, 1999.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, 2002.

MAY, J. V.; MCCARTY J. R., K; REICHERT. JR, L. E.; SCHOMBERG, D. W. Follicle stimulating hormone mediated induction of functional luteinising hormone/human chorionic gonadotrophin receptors during monolayer culture of porcine granulosa cells. *Endocrinology*, v. 107, n. 4, p. 1041-1049, 1980.

MAYERHOFER, A.; DISSEN, G. A.; COSTA, M. E.; OJEDA, S. R. A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, v. 138, n. 8, p. 3320-3329, 1997.

McCULLY, J. D.; WAKIYAMA, H.; HSIEH, Y. J.; JONES, M.; LEVITSKY, S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart Circulation Physiology*, v. 286, n. 5, p. 1923-1935, 2004.

McDONALD, N. Q.; LAPATTO, R.; MURRAY-RUST, J.; GUNNING, J.; WLODAWER, A.; BLUNDELL, T. L. "New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor". *Nature*, v. 354, n. 6352, p. 411-414, 1991.

McGEE, E. A.; CHUN, S. Y.; LAI, S.; HE, Y.; HSUEH, A. J. W. Keratinocyte growth factor promotes the survival; growth and differentiation of preantral follicles. *Fertility and Sterility*, v. 71, n. 4, p. 732-738, 1999.

McGEE, A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Review*, v. 21, n. 2, p. 200-214, 2000.

McKEEHAN, W. L.; WANG, F.; KAN, M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*, v. 59, n. 8, p. 135-176, 1998.

McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. *Molecular Human Reproduction*, v. 16, n. 9, p. 644-653, 2010.

McNATTY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, n. 1-2, p. 11-20, 2000.

McNATTY, K. P.; READER, K.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin dependent phase: a 2006 perspective. *Society for Reproduction and Fertility*, v. 64, n. 14, p. 55-68, 2007.

MERMILLOD, P.; LE LANNOU, D. Maturation ovocytaire *in vivo* et *in vitro* chez les mammifères. In: HAMAMAH, S.; MENEZO, Y. (Eds.), *Ovocyte et embryon de la physiologie à la pathologie*. Paris: Ellipses Edition, 1999, p. 95-122, cap.6.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MIGNATTI, P.; MORIMOTO, T.; RIFKIN, D. B. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Journal of Cellular Physiology*, v. 151, n. 1, p. 81-93, 1992.

MILLER, J. B.; RUSSELL, P. The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, v. 68, n. 3, p. 407-410, 1992.

MILLIER, S. G.; WHITELOW, P. F.; SMYTH, C. D. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 100, n. 1-2, p. 51-54, 1994.

MINGOTI, G. V. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.

MIYAKE, A.; KONISHI, M.; MARTIN, F. H.; HERNDAY, N. A.; OZAKI, K.; YAMAMOTO, S.; MIKAMI, T. Structure and expression of a novel member, FGF-16, of the fibroblast growth factor family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 243, n. 1, p. 148-152, 1998.

MIYARA, F.; AUBRIOT, F.; GLISSANT, A.; NATHAN, C.; DOUARD, S.; STANOVICI, A.; HERVE, F.; DUMONT-HASSAN, M.; LEMEURE, A.; COHEN-BACRIE, P.; DEBEY, P. Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Human Reproduction*, v. 18, n. 7, p. 1494-1503, 2003.

MIYOSHI, T.; OTSUKA, F.; YAMASHITA, M.; INAGAKI, K.; NAKAMURA, E.; TSUKAMOTO, N.; TAKEDA, M.; SUZUKI, J.; MAKINO, H. Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 325, n. 1-2, p. 84-92, 2010.

MOHAMMADI, M.; DIKIC, I.; SOROKIN, A.; BURGESS, W. H.; JAYE, M.; SCHLESSINGER, J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 3, p. 977-989, 1996b.

MOHAMMADI, M.; SCHLESSINGER, J.; HUBBARD, S. R. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*, v. 86, n. 4, p. 577-787, 1996a.

MOHAN, S. K.; RANI, S. G.; YU, C. The hetero-hexameric complex structure, a component in the non-classical pathway for fibroblast growth factor 1 (FGF1) secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 20, p. 15464-15475, 2010.

MOLLOY, N. H.; READ, D. E.; GORMAN, A. M. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers*, v. 3, n. 3, p. 510-530, 2011.

MOOR, R. M.; KRUIP, T. A. M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*, v. 21, n. 1, p. 103-106, 1984.

MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 234, n. 1-2, p. 67-73, 2005.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. *Developmental Biology*, v. 213, n. 1, p. 1-17, 1999.

MOURI, A.; NOMOTO, H.; FURUKAWA, S. Processing of nerve growth factor: The role of basic amino acid clusters in the pro-region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 353, n. 4, p. 1056-1062, 2007.

MRAZEK, M.; FULKA, J. J. Failure of oocyte maturation: Possible mechanisms for oocyte maturation arrest. *Human Reproduction*, v. 18, n. 11, p. 2249-2252, 2003.

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, n. 1, p. 89-96, 2001.

MURUVI, W.; FORTUNE, J. E. Kit ligand-KIT interaction is required for follicle activation and mediates insulin-stimulated activation of bovine primordial follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.81, n. 1, p. 200, 2009.

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, n. 6, p. 1357-1370, 2005.

NAGANO, M.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S. *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 61, n. 5, p. 531-535, 1999.

NEUFIELD, G.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; MITCHELL, R.; GOSPODAROWICZ, D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*, v. 121, n. 2, p. 597-603, 1987.

NEUVIANS, T. P.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Molecular Reproduction and Development*, v. 67, n. 4, p. 389-395, 2004.

NICKEL, W. Pathways of unconventional protein secretion. *Currents Opinions Biotechnology*, v. 21, n. 5, p. 621-626, 2010.

NILSSON, E. E.; DETZEL, C.; SKINNER, M. K. Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, v. 131, n. 6, p. 1007-1015, 2006.

NILSSON, E. E.; KEZELE, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 188, n. 1-2, p. 65–73, 2002.

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

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 12, n. 214, p. 19–25, 2004.

NILSSON, E.; DOLE, G.; SKINNER, M. K. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, v. 138, n. 4, p. 697-707, 2009.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 175, n. 1-2, p. 123-130, 2001.

NILSSON, E.; ROGERS, N.; SKINNER, M. K. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, v. 134, n. 2, p. 209–221, 2007.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v. 8, n. 1, p. 17-20, 2001.

NIMNUAL, A. S.; YATSULA, B. A.; BAR-SAGI, D. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*, v. 279, n. 5350, p. 560-563, 1998.

NÓBREGA JR., J. E.; GONÇALVES, P. B. D.; CHAVES, R. N.; MAGALHÃES, D. M.; ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; PEREIRA, G. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, J. F. C. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 18, n. 1-6, p. 1-6, 2011.

NOGUEIRA, D.; CORTVRINDT, R.; DE MATOS, D. G.; VANHOUTTE, L.; SMITZ, J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 69, n. 16, p. 2045-2052, 2003.

NOGUEIRA, D.; RON-EL, R.; FRIEDLER, S.; SCHACHTER, M.; RAZIEL, A.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Meiotic arrest *in vitro* by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biology of Reproduction*, v. 74, n. 1, p. 177-184, 2006.

NOMOTO, H.; TAKAIWA, M.; MOURI, A.; FURUKAWA, S. Pro-region of neurotrophins determines the processing efficiency. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 356, n. 1, p. 919-924, 2007.

NOTTOLA, S. A.; CAMBONI, A.; LANGENDONCKT, A.; DEMYLLE, D.; MACCHIARELLI, G.; DOLMANS, M. M.; MARTINEZ-MADRID, B.; CORRER, S.; DONNEZ, J. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertility and Sterility*, v. 90, n. 1, p. 23-32, 2008.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 33, n. 2, p. 115-120, 2000.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, v. 39, n. 4, p. 811-821, 1993.

NYKJAER, A.; LEE, R.; TENG, K. K.; JANSEN, P.; MADSEN, P.; NIELSEN, M. S.; JACOBSEN, C.; KLIEMANNEL, M.; SCHWARZ, E.; WILLNOW, T. E.; HEMPSTEAD, B. L.; PETERSEN, C. M. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, v. 427, n. 6977, p. 843-848, 2004.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, v. 8, n. 5, p. 1682-1686, 2003.

OHINATA, Y.; OHTA, H.; SHIGETA, M.; YAMANAKA, K.; WAKAYAMA, T.; SAITOU M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, v.137, n. 3, p. 571-584, 2009.

OHINATA, Y.; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; ANCELI, K.; ONO, Y.; SANO, M.; BARTON, S. C.; OBUKHANYCH, T.; NUSSENZWEIG, M.; TARAKHOVSKY, A. et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, v. 436, n. 7048, p. 207-213. 2005.

OHUCHI, H.; OHCHI, H.; HORI, Y.; YAMASAKI, M.; HARADA, H.; SEKINE, K.; KATO, S.; ITOH, N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 277, n. 3, p. 643-9, 2000.

OJEDA, S. R.; DISSEN, G. A. Developmental regulation of the ovary via growth factor tyrosine kinase receptors. *Trends Endocrinology and Metabolic*, v. 5, n. 8, p. 317-323, 1994.

OJEDA, S. R.; DISSEN, G. A.; ROMERO, C. Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. *Frontiers in Endocrinology*, v. 21, n. 1, p. 171-178, 1999.

OJEDA, S. R.; ROMERO, C.; TAPIA, V.; DISSEN, G. A. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, n. 1-2, p. 67–71, 2000.

OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. G. Ontogeny of follicle receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 82, n. 11, p. 3748–3751, 1997.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G.; AKMAN, O.; OJAKIAN, G. K.; OKTAY, M. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, v. 63, n. 2, p. 457–61, 2000.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*, n. 5, p. 1133–1138, 1998.

OKTAY, K.; SCHENKEN, R. S.; NELSON, J. F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction*, v. 53, n. 2, p. 295-301, 1995.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *The New York Academy of Sciences*, v. 1127, n. 1, p. 1-9, 2008.

ONG, S. H.; GUY, G. R.; HADARI, Y. R.; LAKS, S.; GOTOH, N.; SCHLESSINGER, J.; LAX, I. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Molecular Cell Biology*, v. 20, n. 3, p. 979-989, 2000.

ORNITZ, D. A.; ITOH, N. Protein Family review – fibroblast growth factors. *Genome Biology*, v. 2, n. 3, p. 1–12, 2001.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, v. 2, n. 3, p. 1-12, 2001.

ORNITZ, D. M.; XU, J.; COLVIN, J. S.; MCEWEN, D. G.; MACARTHUR, G. A.; COULIR, F.; GAO, G.; GOLDFARB, M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 25, p. 15292-15297, 1996.

OTALA, M., ERKKILÄ, K., TUURI, T., SJÖBERG, J., SOUMALAINEN, L., SUIKKARI, A-M., PENTIKÄINEN, V., DUNKEL, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproductive*, v. 8, n. 3, p. 228-236, 2002.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

OURY, F.; DARBON, J. M. Fibroblast growth factor regulates the expression of luteinizing hormone receptors in cultured rat granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 156, n. 2, p. 634-643, 1988.

OUSSAID, B.; LONERGAN, P.; KHATIR, H.; GULER, A.; MONNIAUX, D.; TOUZE, J. L.; BECKERS, J. F.; COGNIE, Y.; MERMILLOD, P. Effect of GnRH antagonist induced prolonged follicular phase on follicular atresia oocyte developmental competence *in vitro* in superovulated heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, n. 1, p. 137- 144, 2000.

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal Physiology - Renal Physiology*, v. 284, n. 4, p. 608-627, 2003.

PAIVA, P.; HANNAN, N. J.; HINCKS, C.; MEEHAN, K. L.; PRUYERS, E.; DIMITRIADIS, E.; SALAMONSEN, L. A. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity. *Human Reproduction*, v. 26, p. 1153-1162, 2011.

PANGAS, S. A.; RAJKOVIC, A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update*, v. 12, n. 1, p. 65-76, 2006.

PANGAS, S. A.; SAUDYE, H.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. *Tissue Engineering*, v. 9, n. 5, p. 1013-1021, 2003.

PAREDES, A.; ROMERO, C.; DISSEN, G. A.; DECHIARA, T. M.; REICHARDT, L.; CORNEA, A.; OJEDA, S. R.; XU, B. TrkB receptors are required for growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Developments in Biologicals*, v. 267, n. 2, p. 430-449, 2004.

PARFENOV, V. N.; POCHUKALINA, G. N.; DAVIS, D. S.; REINBOLD, R.; SCHOLER, H. R.; MURTI, K. G. Nuclear distribution of Oct-4 transcription factor in transcriptionally active and inactivemouse oocytes and its relation to RNAPolymerase II and splicing factors. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 89, n. 4, p. 720-732, 2003.

PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v. 140, n. 9, p. 4262-4271, 1999.

PARROTT, J. A.; KIM, G.; MOSHER, R.; SKINNER, M. K. Expression and action of keratinocyte growth factor (KGF) in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 167, n. 1-2, p. 77-87, 2000.



PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology*, v. 139, n. 1, p. 228-235, 1998b.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Thecal Cell-Granulosa Cell Interactions Involve a Positive Feedback Loop among Keratinocyte Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor, and Kit Ligand during Ovarian Follicular Development. *Endocrinology*, v.139, n. 5, p. 2240-2245, 1998.

PARROTT, J. A.; VIGNE, J. L.; CHU, B. Z.; SKINNER, M. K. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology*, v. 135, n. 2, p. 569-75, 1994.

PARSHAD, R. K.; KAUR, R.; NATT, J. K. Structural heterogeneity of yolk spheres in hierarchical follicles from hen ovary: a histochemical study. *British Poultry Science*, v. 49, n. 3, p. 265-72, 2008.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1992.

PAYTON, R. R.; ROMAR, R.; COY, P.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1303-1308, 2004.

PEDCHENKO, V. K.; IMAGAWA, W. Estrogen treatment *in vivo* increases keratinocyte growth factor expression in the mammary gland. *Journal of Endocrinology*, v. 165, n. 1, p. 39-49, 2000.

PELUSO, J. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an antiapoptotic mechanism of action. *Biochemistry Pharmacology*, v. 66, n. 5, p. 1363-1369, 2003.

PELUSO, J. J.; PAPPALARDO, A. Progesterone maintains large rat granulosa cell viability indirectly by stimulating small granulosa cells to synthesize basic fibroblast growth factor. *Biology of Reproduction*, v. 60, n. 2, p. 290-296, 1999.

PELUSO, J. J.; PAPPALARDO, A.; FERNANDEZ, G. Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC delta-dependent pathway. *Endocrinology*, v. 142, n. 10, p. 4203-4211, 2001.

PELUSO, S., RÜCKLE, T., LEHMANN, C., MUTTER, M., PEGGION, C. AND CRISMA, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *Chembiochemistry*, v. 2, n. 6, p. 432-437, 2001.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, v. 234, n. 2, p. 339-351, 2001.

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, n. 1, p. 3-9, 2007.

PETER, K. G.; CHEN, W. G.; WILLIAMS L. T. Two FGF receptors are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis. *Development*, v. 114, n. 1, p. 233-243, 1992.

PETERS, K. G.; MARIE, J.; WILSON, E.; IVES, H. E.; ESCOBEDO, J.; DEL ROSARIO, M.; MIRDA, D.; WILLIAMS, L. T. Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and Ca<sup>2+</sup> flux but not mitogenesis. *Nature*, v. 358, n. 6388, p. 678-681, 1992.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

PHY, J. L.; CONOVER, C. A.; ABBOTT, D. H.; ZSCHUNKE, M. A.; WALKER, D. L.; SESSION, D. R.; TUMMON, I. S.; THORNHILL, A. R.; LESNICK, T. G.; DUMESIC, D. A. Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolic*, v. 89, n. 7, p. 3561–3566, 2004.

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

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, n. 6, p. 703-715, 2008.

PINTO, M. G. L.; CASTILHO, A. C. S.; AMORIM, R. L.; PRICE, C. A.; BURATINI, JR, J. Expressão dos fatores de crescimento fibroblástico 7 e 10 (FGF-7 e FGF-10) em folículos pré-antrais bovinos. *Acta Scientiae Veterinarie*, v. 34, p. 362, 2006.

POPOVICI, C.; CONCHONAUD, F.; BIRNBAUM, D.; ROUBIN, R.. Functional Phylogeny Relates LET-756 to Fibroblast Growth Factor 9. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 38, p. 40146-40152, 2004.

PORTELA, V. M.; GONÇALVES, P. B. D.; VEIGA, A. M.; NICOLA, E.; BURATINI JR, J.; PRICE, C. A. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. *Endocrinology*, v. 149, n. 10, p.5004-5011, 2008.

PORTELA, V. M.; MACHADO, M.; BURATINI JR, J.; ZAMBERLAM, G.; AMORIM, R. L.; GONCALVES, P.; PRICE, C. A. Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 18 in the Ovarian Follicle in Cattle. *Biology of Reproduction*, v. 83, n. 3, p. 339–346, 2010.

POWERS, C. J.; MCLESKEY, S. W.; WELLSTEIN, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine- Related Cancer*, v. 7, n. 3, p. 165-97, 2000.

PRICE, W. A. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression by growth factors and cytokines alters IGF-mediated proliferation of postnatal lung fibroblasts. *Experimental Lung Research*, v. 30, n. 4, p. 261-283, 2004.

PUSCHECK, E. E.; PATEL, Y.; RAPPOLEE, D. A. Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-4, but not FGFR-3 is expressed in the pregnant ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 132, n. 1-2, p. 169-176, 1997.

QUARTO, N.; AMALRIC, F. Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF-2 signalling. *Journal of Animal Science*, v. 107, n. 11, p. 3201-3212, 1994.

RABIN, S.; CLEGHORN, V.; KAPLAN, D. SNT; a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells. *Molecular Cellular Biology*, v. 13, n. 4, p. 2203-2213, 1993.

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.

RAJKOVIC, A.; PANGAS, S. A.; BALLOW, D.; SUZUMORI, N.; MATZUK, M. M. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, v. 305, n. 5687, p. 1157-1159, 2004.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HAMALAINEN, T.; PENG, S. L.; LAN, Z.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, S.; LIU, K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, v. 319, n. 5863, p. 611–613, 2008.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 21, n. 2, 2010.

REDMER, D. A.; DORAISWAMY, V.; BORTNEM, B. J.; FISHER, K.; JABLONKA-SHARIFF, A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 879-889, 2001.

REN, L. Q.; MEDAN, M. S.; WENG, Q.; JIN, W.; LI, C. M.; WATANABE, G.; TAYA, K. Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 51, n. 3, p. 399-404, 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, n. 4, p. 483-494, 2000.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *Journal of Animal Science*, v. 76, n. 6, p. 1671-81, 1998.

RIBATTI, D.; CONCONI, M. T.; NUSSDORFER, G. G. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacological Review*, v. 59, n. 2, p. 185-205, 2007.

RICHARDS, J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, v. 15, n. 6, p. 725-751, 1994.

RICHARDS, J. S., PANGAS, S. A. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 4, p. 963-972, 2010.

RICHARDS, J. S.; RUSSEL, D. L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K. H.; FALENDER, A. E.; LO, Y. K.; SHARMA, S. C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and lutenization. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 57, p. 195-220, 2002.

RIEDEL, F.; GÖTTE, K.; BERGLER, W.; ROJAS, W.; HÖRMANN, K. Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer. *Head Neck*, v. 22, n. 2, p. 183-189, 2000.

ROBINSON, K. N.; MANTO, K.; BUCHSBAUM, R. J.; MACDONALD, J. I.; MEAKIN, S. O. Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 1, p. 225-235, 2005.

ROBINSON, L. L.; SZNAJDER, N. A.; RILEY, S. C.; ANDERSON R. A. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Molecular Human Reproduction*. v. 7, n. 7, p. 641-648, 2001.

RODRIGUES, G. Q., SILVA, C. M. G., FAUSTINO, L. R., BRUNO, J. B., PINTO, L. C., LOPES, C. A. P., CAMPELLO, C. C., FIGUEIREDO, J. R. Efeito de diferentes concentrações de hormônio Folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 4, n. 3, p. 144-152, 2010b.

RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G., FAUSTINO, L. R., BRUNO, J. B., MAGALHÃES, D. M.; CAMPELLO, C. C., FIGUEIREDO, J. R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Animal Reproduction*, v. 7, n. 4, p. 382-388, 2010a.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reproduction Nutrition Development*, v. 43, n. 2, p. 179-187, 2003.

RODRIGUEZ-VICIANA, P.; WARNE, P.H.; DHAND, R.; VANHAESEBROECK, B.; GOUT, I.; FRY, M. J.; WATERFIELD, M. D.; DOWNWARD, J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, v. 370, n. 6490, p. 527-532, 1994.

ROGHANI, M.; MOSCATELLI, D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 31, p. 22156-22162, 1992.

ROMERO, C. A.; PAREDES, A.; DISSEN, G. A.; OJEDA, S. R. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, v. 143, n. 4, p. 1485-1494, 2002.

ROMERO, S.; SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; SMITZ, J. Mouse cumulus-oocyte complexes from *in vitro*-cultured preantral follicles suggest an anti-luteinizing role for the EGF cascade in the cumulus cells. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 6, p. 1164-70, 2011.

ROSSETO, R., LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T. ; SARAIVA, M. V. A. ; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. S.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; NAME, K. P.; BÃO, S. N.; 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, n. 2, p. 112-123, 2009.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v. 129, n. 2, p. 235-244, 2005.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 6, p. 1898-1906, 2004.

ROUX, P. P.; BARKER, P. A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology*, v. 67, p. 203-233, 2002.

ROY, S. K.; GREENWALD, G. S. *In vitro* effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor, and follicle-stimulating hormone on hamster follicular

deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, v. 44, n. 5, p. 889-896, 1991.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of preantral human follicles. *Fertility and Sterility*, v. 53, n. 4, p. 783-90, 1993.

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

RUSSEL, D. F.; BAGIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 10, p. 1255-1270, 2006.

SAITOU, M.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, v. 418, n. 6895, p. 293-300, 2002.

SALAS, C.; JULIO-PIEPER, M.; VALLADARES, M.; POMMER, R.; VEGA, M.; MASTRONARDI, C.; KERR, B.; OJEDA, S. R.; LARA, H. E.; ROMERO, C. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 91, n. 6, p. 2396-2403, 2006.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 78, n. 3, p. 644-645, 2002.

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

SALLI, U., BARTOL, F. F., WILEY, A. A., TARLETON, B. J.; BRADEN, T. D. *Biology of Reproduction*, v. 59, n. 1, p. 77-83, 1998.

SAMATHANAM, C. A.; ADESANYA, O. O.; ZHOU, J.; WANG, J.; BONDY, C. A. Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biology of Reproduction*, v. 59, n. 3, p. 491-496, 1998.

SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation *in vitro*. *Molecular Human Reproduction*, v. 15, n. 9, p. 539-550, 2009.

SÁNCHEZ, F.; ROMERO, S.; SMITZ, J. Oocyte and Cumulus Cell Transcripts from Cultured Mouse Follicles Are Induced to Deviate from Normal *In vivo* Condition by Combinations of Insulin, Follicle-Stimulating Hormone, and Human Chorionic Gonadotropin. *Biology of Reproduction*, 2011 *in press*.

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*, v. 19, n. 3, p. 205-14, 2011.

SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, G. M.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.. Influence of different concentrations of LH and FSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. *Small Ruminant Research*, v. 78, p. 87-95, 2008.

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 impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, v. 19, n. 3, p. 205-214, 2011.

SASAKI, S. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Animal Science Journal*, v. 73, p. 423-433, 2002.

SAUMANDE, J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the re-sponse to FSH. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 2, p. 189–196, 1991.

SAWYER, H. T.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 4, p. 1134-1150, 2002.

SCHAMS, D.; STEINBERG, V.; STEFFL, M.; MEYER, H. H. D.; BERISHA, B. Expression and possible role of fibroblast growth factor family members in porcine antral follicles during final maturation. *Reproduction*, v. 138, n. 1, p. 141-149, 2009.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, v. 270, n. 5235, p. 467-470, 1995.

SCHLESSINGER, J.; PLOTNIKOV, A. N.; IBRAHIMI, O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEH, B. K.; YAYON, A.; LINHARDT, R. J.; MOHAMMADI, M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell*, v. 6, n. 3, p. 743-750, 2000.

SCHMIDT, D.; OVITT, C. E.; ANLAG, K.; FEHSENFELD, S.; GREDSTED, L.; TREIER, A. C.; TREIER, M. The murine winged-helix transcription factor FOXL2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, v. 131, n. 4, p. 933–42, 2004.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W. J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 48, n. 3, p. 471–483, 1997.

SCHTEINGART, H. F.; MERONI, S. B.; CÁNEPA, D. F.; PELLIZZARI, E. H.; CIGORRAGA, S. B. Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology*, v. 145, n. 5, p. 539-545, 1999.

SCHULTZ, R. M.; WASSARMAN, P. M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Journal of Cell Science*, v. 24, p. 167-194, 1977.

SCOTT, J. E.; CARLISSON, I. B.; BAVISTER, B. D.; HOVATTA, O. Human ovarian tissue cultures: Extra cellular matrix composition coating density and tissue dimensions. *Reproductive Biomedicine On Line*, v. 9, n. 3, p. 287-293, 2004.

SEKINE, K.; OHUCHI, H.; FUJIWARA, M.; YAMASAKI, M.; YOSHIZAWA, T.; SATO, T.; YAGISHITA, N.; MATSUI, D.; KOGA, Y.; ITOH, N.; KATO, S. FGF10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genetics*, v. 21, n. 1, p. 138-141, 1999.

SELI, E.; ZEYNELOGLU, H.B.; SENTURK LM, BAHTIYAR OM, OLIVE DL, ARICI A. Basic fibroblast growth factor: peritoneal and follicular fluid levels and its effect on early embryonic development. *Fertility and Sterility*, v. 69, n. 6, p. 1145-1148, 1998.

SELVARAJU, S.; AGARWAL, S. K.; KARCHE, S. D.; MAJUMDAR, A. C. Ovarian response; embryo production and hormone prolife in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*, v. 59, n. 5-6, p. 1459-1468, 2003.

SEO, K.; CHOI, J.; PARK, M.; RHEE, C. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *Journal of Veterinary Science*, v. 2, n. 2, p. 125-130, 2001.

SERAFIM, M. K.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ALMEIDA, A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DA SILVA, L. D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, v. 74, n. 5, p.749-755, 2010.

SHARMA, G. T.; MAJUMDAR, A. C.; BONDE, S. W. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. *Small Ruminant Research*, v. 22, p. 25-30, 1996.



SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 53, n. 1, p. 59-72, 2000.

SHI, Z.; JIM, W.; WATANABE, G.; SUZUKI, A. K.; TAKAHASHI, S.; TAYA, K. Expression of nerve growth factor (NGF); and its receptors trkA and p75 in ovaries of the cyclic golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the regulation of their production by luteinizing hormone. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 50, n. 6, p. 605-611, 2004.

SHIKONE, T.; YAMOTO, M.; NAKANO, R. Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 131, n. 3, p. 1063-1068, 1992.

SHIMADA, M.; KAWANO, N.; TEREDA, T. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. *Reproduction*, v. 124, n. 4, p. 557-563, 2002.

SHIMADA, M.; ZENG, W. X.; TERADA, T. Inhibition of PI 3-kinase or MEK leads to suppression of p34cdc2 kinase activity and meiotic progression beyond the MI stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cell. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 2, p. 442-448, 2001.

SHIMIZU, T.; JIANG, J. Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biology of Reproduction*, v. 67, n. 6, p. 1846-1852, 2002.

SHIMIZU, T.; MURAYAMA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA, C.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Animal Reproduction Science*, v. 106, n. 1-2, p. 143-152, 2008.

SHIN, M. R.; KIM, N. H. Maternal gamma ( $\gamma$ )-tubulin is involved in microtubule reorganization during bovine fertilization and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, v. 64, n. 4, p. 438-445, 2003.

SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 56, n. 4, p. 428-436, 2010.

SHULDINER, A. R.; BARBETTI, F.; RABEN, N.; SCAVO, L.; SERRANO, J. INSULIN. In: Leroith, D. Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects. CRC Press, Boca Raton, 1998, p. 181-219.

SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, v. 32, p. 453-462, 2009.

SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, G. Q.; BRITO, I. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; SILVA, T. F. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Moment of Addition of LH to the Culture Medium Improves *In vitro* Survival and Development of Secondary Goat Preantral Follicles. *Reproduction Domestic Animal*, v. 46, n. 4, p. 579-584, 2011.

SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 233-242, 2010.

SILVA, G. M., ARAÚJO, V. R., DUARTE, A. B. G., CHAVES, R. N., SILVA, C. M. G., LOBO, C. H., ALMEIDA, A. P., MATOS, M. H. T., TAVARES, L. M. T., CAMPELLO, C. C., FIGUEIREDO, J. R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction*, v. 8, n. 1-2, p. 14-24, 2011.

SILVA, J. M.; PRICE, C. A. Effect of FSH on steroid secretion and messenger ribonucleic acid encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side chain cleavage in bovine granulosa cells *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 1, p. 186-191, 2000.

SILVA, J. M.; PRICE, C. A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side chain cleavage gene expression in estrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. *The Journal of Endocrinology*, v. 174, n. 3, p. 499-507, 2002.

SILVA, J. R. V.; BRASIL, A. F.; SANTOS, R. R.; COSTA, S. H. F.; RODRIGUES, A. P. R.; FERREIRA, M. A. L.; MACHADO, V. P.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciência Rural*, v. 33; p. 913-919; 2003.

SILVA, J. R. V.; THARASANT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. The activin follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *Journal of Endocrinology*, v. 189, n. 1, p. 113-25, 2006.

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, n. 3-4, 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, n. 9, p. 1691-1704, 2004b.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T.; ROELEN, B. A.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Molecular Reproduction and Development*, v. 70, n. 1, p. 11-19, 2005.

SILVA, J. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N. FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association*, v. 43, p. 203–209, 2002.

SIMI, A., IBANEZ, C. F. Assembly and activation of neurotrophic factor receptor complexes. *Developmental Neurobiology*, v. 70, n. 5, p. 323-331, 2010.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1241-1254, 2001.

SIRARD, M. A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology*, v. 40, n. 5, p. 933-942, 1993.

SIRARD, M. A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 37, p. 39-57, 1992.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v. 49, n. 2, p. 483-497, 1998.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, v. 11, n. 5, p. 461, 2005.

SKINNER, M. K.; LOBB, D.; DORRINGTON, J. H. Ovarian thecal/interstitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology*, v. 121, n. 5, p. 1892-1899, 1987.

SLEEMAN, M.; FRASER, J.; MCDONALD, M.; YUAN, S.; WHITE, D.; GRANDISON, P.; KUMBLE, K.; WATSON, J. D.; MURISON J. G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor; FGFR-5. *Gene*, v. 271, n. 2, p. 171-82, 2001.

SMETANINA, I. G.; TATARINOVA, L. V.; KRIVOKHARDCHENKO, A. S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Ontogenez*, v. 31, n. 2, p. 139-143, 2000.

SMITZ, J. E. J.; CORTVRINDT, R. G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, v. 123, n. 2, p. 185-202, 2002.

SMITZ, J. E. J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE MATOS, D. G.; CORTVRINDT, R. N. Oocyte: *in vitro* maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2004.

SMITZ, J.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human Reproduction Update*, v. 16, n. 4, p. 395-414, 2010.

SNIDER, W. D. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, v. 77, n. 5, p. 627-638, 1994.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve Growth Factor signaling; neuroprotection; and neural repair. *Annual Review of Neuroscience*, v. 24, p. 1217-1281, 2001.

SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; MEDVEDEV, S.; ONISHI, A.; IWAMOTO, M.; FUCHIMOTO, D.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; OHNUMA, K.; SATO, E.; NAGAI, T. Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v. 90, n-3-4, p. 307-328, 2005.

SONG, J.; SLACK, J. M. XFGF-9: a new fibroblast growth factor from *Xenopus* embryos. *Developmental Dynamics*, v. 206, n. 4, p. 427-436, 1996.

SONG, Y.; MCFARLAND, D.C.; VELLEMAN, S.G. Fibroblast growth factor 2 and protein kinase C alpha are involved in syndecan-4 cytoplasmic domain modulation of turkey myogenic satellite cell proliferation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2011, *in press*.

SORDOILLET, C.; SAVONA, C.; CHAUVIN, M. A.; DE PERETTI, E.; FEIGE, J. J.; MORERA, A. M.; BENAHMED, M. Basic fibroblast growth factor enhances testosterone secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 89, n. 1-2, p.163-71, 1992.

SORTINO, M. A.; CONDORELLI, F.; VANCHERI, C.; CHIARENZA, A.; BERNARDINI, R.; CONSOLI, U.; CANONICO, P. L. Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high- and low-affinity NGF receptors. *Molecular Endocrinology*, v. 14, n. 1, p. 124-136, 2000.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, v. 127, n. 21, p. 4645-4654, 2000.

SPEARS, N.; MOLINEK, M. D.; ROBINSON, L. L. L.; FULTON, N.; CAMERON, H.; SHIMODA, K.; TELFER, E. E.; ANDERSON, R. A.; PRICE, D. J. The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development*, v. 130, n. 22, p. 5481-5491, 2003.

SPEIRS, V.; JENKINS, S.; WHITE, M. C. Growth factor regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in a human ovarian cell line: modulation by 17 beta-estradiol. *Anticancer Research*, v. 13, n. 5, p. 1399-1403, 1993.

SPENCER, T. E.; STAGG, A. G.; JOYCE, M. M.; JENSTER, G.; WOOD, C. G.; BAZER, F. W.; WILEY, A. A.; BARTOL, F. F. Discovery and characterization of endometrial epithelial messenger ribonucleic acids using the ovine uterine gland knockout model. *Endocrinology*, v. 140, n. 9, p. 4070-80, 1999.

SPENCER-DENE, B.; SALA, F. G.; BELLUSCI, S.; GSCHMEISSNER, S.; STAMP, G.; DICKSON, C. Stomach development is dependent on fibroblast growth factor 10/fibroblast growth factor receptor 2b mediated signaling. *Gastroenterology*, v. 130, n. 4, p. 1233-44, 2006.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interaction among basic fibroblast growth factor; epidermal growth factor; insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biology of Reproduction*, v. 54, n. 1, p. 255-263, 1996.

SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n. 1, p. 31-45, 1996.

SRIVASTAVA, S.; OSTEN, P.; VILIM, F. S.; KHATRI, L.; INMAN, G.; STATES, B.; DALY, C.; DESOUZA, S.; ABAGYAN, R.; VALTSCHANOFF, J. G.; WEINBERG, R. J.; ZIFF, E. B. Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. *Neuron*, v. 21, n. 3, p. 581-591, 1998.

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

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, 3. ed, New York, NY: Mc- Graw-Hill, 1997, 666p.

STEGER, K.; TETENS, F.; SEITZ, J.; GROTHE, C.; BERGMANN, M. Localization of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) protein and the receptors FGFR 1-4 in normal human seminiferous epithelium. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 110, n. 1, p. 57-62, 1998.

STEVENSON, K. R.; WATHES, D. C. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the ovine oviduct during the oestrous cycle. *The Journal of Reproduction and Fertility*, v. 108, n. 1, p. 31-40, 1996.

STIRLING, D.; WATERMAN, M. R.; SIMPSON, E. R. Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *The Journal of Reproduction and Fertility*, v. 91, n. 1, p. 1-8, 1991.

SUGIMURA, Y.; FOSTER, B. A.; HOM, Y. K.; LIPSCHUTZ, J. H.; RUBIN, J. S.; FINCH, P. W.; AARONSON, S. A.; HAYASHI, N.; KAWAMURA, J.; CUNHA, G. R. Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. *International Journal of Developmental Biology*, v. 40, n. 5, p. 941-951, 1996.

SUGIURA, K.; SU, Y. Q.; DIAZ, F. J.; PANGAS, S. A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; MATZUK, M. M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J. J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, v. 134, n. 14, p. 2593-2603, 2007.

SUGIURA, K.; YOU-QIANG, S.; QINGLEI, L.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Fibroblast Growth Factors and Epidermal Growth Factor Cooperate with Oocyte-Derived Members of the TGFbeta Superfamily to Regulate Spry2 mRNA Levels in Mouse Cumulus Cells. *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 5, p. 833-841, 2009.

SUH, C. S., SONNTAG, B., ERICKSON, G. F. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2002.

SUN, F.; BETZENDAHL, I.; SHEN, Y.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; EICHENLAUB-RITTER, U. Preantral follicle culture as a novel *in vitro* assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. *Mutagenesis*, v. 19, n. 1, p. 13-25, 2004.

SUN, L. L.; SUN, Z. Y.; ZHANG, P.; ZHAI, X. W.; TANG, J.; PAN, Q. J.; SHI, Q. H.; SHEN, W. Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system. *Reproductive BioMed Online*, v. 20, n. 1, p. 11-25, 2010.

SWANSON, P. E.; CARROLL, S. B.; ZHANG, X. F.; MACKEY, M. A. Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. *American Journal of Pathology*, v. 146, n. 4, p. 969-971, 1995.

TAMURA, K.; MATSUSHITA, M.; ENDO, A.; KUTSUKAKE, M.; KOGO, H. Effect of insulin-like growth factor-binding protein 7 on steroidogenesis in granulosa cells derived from equine chorionic gonadotropin-primed immature rat ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 77, n. 3, p. 485-491, 2007.

TANIGUCHI, F.; HARADA, T.; IWABE, T.; OHAMA, Y.; TAKENAKA, Y.; TERAOKAWA, N. Aberrant expression of keratinocyte growth factor receptor in ovarian surface epithelial cells of endometrioma. *Fertility and Sterility*, v. 89, n. 2, p. 478-80, 2008.

TANIGUCHI, F.; HARADA, T.; SAKAMOTO, Y.; YAMAUCHI, N.; YOSHIDA, S.; IWABE, T.; TERAOKA, N. Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by keratinocyte growth factor or fibroblast growth factor-10 promotes cell proliferation in human endometrial carcinoma cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 88, n. 2, p. 773-80, 2003.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, A. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1150-1157, 2004.

TATEMOTO, H.; OOTAKI, K.; SHIGETA, K.; MUTO, N. Enhancement of developmental competence after *in vitro* fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 6, p. 1800-1806, 2001.

TAYLOR, M. J.; CLARK, C. L. Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology*, v. 130, n. 4, p. 1951-1956, 1992.

TELFER, E. E. *In vitro* models for oocyte development. *Theriogenology*, v. 49, n. 2, p. 451-460, 1998.

TELFER, E. E.; McLAUGHLIN, M. *In vitro* Development of Ovarian Follicles. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 29, n. 1, p. 15-23, 2011.

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, n. 5, p. 1151-1158, 2008.

TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of Anatomy*, v. 194, n. 1, p. 1-14, 1999.

TESSAROLLO, L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Review*, v. 9, n. 2, p. 125-137, 1998.

THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D.; GERARD, M. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Development*, v. 27, n. 5, p. 865-896, 1987.

TILLY, J. L.; BILLIG, H.; KOWALSKI, K. I.; HSUEH, A. J. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine-kinase-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology*, v. 6, n. 11, p. 1942-1950, 1992.

TREMBLAY, K. D.; DUNN, N. R.; ROBERTSON, E. J. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development*, v. 128, n. 18, p. 3609-3621, 2001.

TROLICE, M. P.; PAPPALARDO, A.; PELUSO, J. J. Basic fibroblast growth factor and N-cadherin maintain rat granulosa cell and ovarian surface epithelial cell viability by stimulating the tyrosine phosphorylation of the fibroblast growth factor receptors. *Endocrinology*, v. 138, n. 1, p. 107-113, 1997.

TROUNSON, A. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 13, n. 7-8, p. 523-532, 2001.

TROUNSON, A.; GUNN, I.; LACHAM-KAPLAN, O.; LEWIS, I.; MACKINNON, A. Manipulation of development: opportunities for animal breeding. Gametes: development and function. *Serono Symposio*, v. 31, n. 3, p. 485-499, 1998.

TRUEB, B.; TAESCHLER, S. Expression of FGFR1; a novel fibroblast growth factor receptor; during embryonic development. *Molecular Endocrinology*, v. 17, n. 4, p. 617-620, 2006

TSAFRIRI, A.; ADASHI, E. Y. (1994). Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York, pp 817-860.

TSAI, S. J.; WU, M. H.; CHEN, H. M.; CHUANG, P. C.; WING, L. Y. Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology*, v. 143, n. 7, p. 2715-2721, 2002.

TSUDA, M.; SASAOKA, Y.; KISO, M.; ABE, K.; HARAGUCHI, S.; KOBAYASHI, S.; SAGA, Y. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, v. 301, n. 5637, p. 1239-1241, 2003.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, n. 2, p. 116-129, 2010.

UPADHYAY, D.; BUNDESMANN, M.; PANDURI, V.; CORREA-MEYER, E.; KAMP, D. W. Fibroblast growth factor-10 attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced alveolar epithelial cell DNA damage. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 31, n. 1, p. 107-113, 2004.

VALENT, A.; BERNHEIM, A. Mapping of the tyrosine kinase receptors TRKA (NTRK1); TRKB (NTRK2) and TRKC (NTRK3) to human chromosomes 1q22; 9q22 and 15q25 by fluorescence *in situ* hybridization. *European Journal of Human Genetics*, v. 5, n. 2, p. 102-104, 1997.



VALVE, E.; MARTIKAINEN, P.; SEPPANEN, J.; OKSJOKI, S.; HINKKA, S.; ANTTILA, L.; GRENMAN, S.; KLEMI, P.; HARKONEN, P. Expression of fibroblast growth factor (FGF)-8 isoforms and FGF receptors in human ovarian tumors. *International Journal of Cancer*, v. 88, n. 5, p. 718-725, 2000.

VALVE, E.; PENTTILÄ, T. L.; PARANKO, J.; HÄRKÖNEN, P. FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 232, n. 1, p. 173-177, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Preantral and antral follicles as possible source for fertilizable oocytes in human and bovine. *Human Reproduction Update*, v. 2, n. 4, p. 457-474, 2000b.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction*, v. 6, n. 5, p. 457-474, 2000a.

VAN DEN HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T., RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reproduction*, v. 4, n. 6, p. 833-841, 1998.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Regulation of mammalian oocyte growth and maturation. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, n. 1, p. 188-205, 2003.

VAN DER HURK; R.; ZHAO; J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VAN WEELER, I.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biology of Reproduction*, v. 55, n. 5, p. 1003-1011, 1996.

VAN WEZEL, I. L., UMAPATHYSIVAM, K., TILLEY, W. D. AND RODGERS, R. J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, n. 2, v. 115, p. 133-140, 1995.

VANDERHYDEN, B. C.; TELFER, E. E.; EPPIG, J. J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 46, n. 6, p. 1196-204, 1992.

VANDERHYDEN, B. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, p. 2006-2022, 2002.

VANHOUTTE, L.; SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J.; DHONT, M.; VAN DER ELST, J. Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Human Reproduction*, v. 22, n. 5, p. 1239-1246, 2007.

VELTMAAT, J. M.; RELAIX, F.; LE, L. T.; KRATOCHWIL, K.; SALA, F. G.; VAN VEELLEN, W.; RICE, R.; SPENCER-DENE, B.; MAILLEUX, A. A.; RICE, D. P.; THIERY, J. P.; BELLUSCI, S. Gli3-mediated somitic Fgf10 expression gradients are required for the induction and patterning of mammary epithelium along the embryonic axes. *Development*, v. 133, n. 12, p. 2325-35, 2006.

VENDOLA, K. A.; ZHOU, J.; ADESANYA, O. O.; WEIL, S. J.; BONDY, C. A. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *Journal Clinical Investigation*, v. 101, n. 12, p. 2622-2629, 1998.

VENDOLA, K.; ZHOU, J.; WANG, J.; FAMUYIWA, O.; BIEVRE, M.; BONDY, C. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 2, p. 353–357, 1999.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science*, v. 72, n. 10, p. 2696-26702, 1994.

VESTERLUND, L.; TÖHÖNEN, V.; HOVATTA, O.; KERE, J. Co-localization of neural cell adhesion molecule and fibroblast growth factor receptor 2 in early embryo development. *International Journal of Developmental Biology*, v. 55, n. 3, p. 313-319, 2011.

VIDAIR, C. A.; DOXSEY, S. J.; DEWEY, W. C. Heat shock alters centrosome organization leading to mitotic dysfunction and cell death. *Journal of Cellular Physiology*, v. 154, n. 3, p. 443-445, 1993.

VILAR, M.; CHARALAMPOPOULOS, I.; KENCHAPPA, R. S.; SIMI, A.; KARACA, E.; REVERSI, A.; CHOI, S.; BOTHWELL, M.; MINGARRO, I.; FRIEDMAN, W. J.; SCHIAVO, G.; BASTIAENS, P. I.; VERVEER, P. J.; CARTER, B. D.; IBANEZ, C. F. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*, v. 62, n. 1, p. 72-83, 2009.

VISSER, J. A.; THEMME, A. P. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 234, n. 1–2, p. 81–86, 2005.

VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, v. 141, n. 10, p. 3814-3820, 2000.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 45, n. 4, p. 817-832, 1996.

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, n. 9, 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, n. 5, p. 942-948, 1996.

WANG, H.; ANDOH, K.; HAGIWARA, H.; XIAOWEI, L.; KIKUCHI, N.; ABE, Y.; YAMADA, K.; FATIMA, R.; MIZUNUMA, H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology*, v. 142, n. 11, p. 4930-4936, 2001.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation and repair. *American Journal of Physiology*, v. 282, n. 5, p. 924-940, 2002.

WATSON, J. B.; GETZLER, S. B.; MOSHER, D. F. Platelet factor-4 modulates the mitogenic activity of basic fibroblast growth factor. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 94, n. 1, p. 261-268, 1994.

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

WEIL, S.; VENDOLA, K.; ZHOU, J.; BONDY, C. A. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *Journal of Clinical, Endocrinology and Metabolism*, v. 84, n. 8, p. 2951-2956, 1999.

WENG, Q.; SHI, Z.Q.; TUKADA, J.; WATANABE, G.; TAYA, K. Immunodetection of NGF; TrkA; p75 and Inhibin  $\alpha$ -Subunit in Interstitial Cells of Golden Hamsters Treated with Hcg. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 55, n. 6, p. 622-628, 2009.

WERNER, S.; PETERS, K. G.; LONGAKER, M. T.; FULLER-PACE, F.; BANDA, M. J.; WILLIAMS, L. T. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 15, p. 6896-6900, 1992.

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, n. 30, p. 4439–4448, 2007.

WHITAKER, B. D.; KNIGHT, J. W. Exogenous  $\gamma$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 62, n. 1-2, p. 311-322, 2004.

WILLIS, D.; FRANKS, S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 80, n. 12, p. 3788–3790, 1995.

WILLIS, D.; MASON, H.; GILLING-SMITH, C.; FRANKS, S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 81, n. 1, p. 302–309, 1996.

WILLIS, P.; CAUDLE, A. B.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Equine oocyte *in vitro* maturation: influence of sera, time and hormones. *Molecular Reproduction and Development*, v. 30, n. 4, p. 360-368, 1991.

WOAD, K. J.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E.; LAIRD, M.; HAMMOND, A. J.; ROBINSON, R. S. Fibroblast growth factor (FGF) 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction*, 2011, *in press*.

WOOD, K. W.; SARNECKI, C.; ROBERTS, T. M.; BLENIS, J. Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase; Raf-1; and RSK. *Cell*, v. 68, n. 6, p. 1041-1050, 1992.

WOOD, P. A.; BOVE, K.; YOU, S.; CHAMBERS, A.; HRUSHESKY, W. J. Cancer growth and spread are saltatory and phase-locked to the reproductive cycle through mediators of angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 4, n. 7, p. 1065-1075, 2005.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction*, v. 14, n. 6, p. 1555-1562, 1999.

WRIGHT, T. J.; MANSOUR, S. L. Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development*, v. 130, n. 15, p. 3379-3390, 2003.

WU, J.; BENJAMIN, R. E.; CARRELL, D. T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 1, p. 375-381, 2001.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*, v. 15, n. 3, p. 233-240, 2007.

WULFF, C.; WIEGAND, S. J.; SAUNDERS, P. T.; SCOBIE, G. A.; FRASER, H. M. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap[A40]). *Endocrinology*, v. 142, n. 7, p. 3244–3254, 2001.

WURTH, Y. A.; KRIUP, T. H. A. M. Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 1992, The Hague. Anais...The Hague: ICAR, 1992, p. 387-389

WYMAN, M. P.; ZVELEBIL, M.; LAFFARGUE, M. PI3K signaling – which way to target? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 7, p. 366-376, 2003.

XING, J.; KORNHAUSER, J. M.; XIA, Z.; THIELE, E. A.; GREENBERG, M. E. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, v. 18, n. 4, p. 1946-1955, 1998.

XU, J.; BERNUCI, P. B.; LAWSON, M. S.; YEOMAN, R. R.; FISHER, T. E.; ZELINSKI, M. B.; STOUFFER, R. L. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction*, v. 140, n. 5, p. 685–697, 2010.

XU, J.; LAWSON, M. S.; YEOMAN, R. R.; PAU, K. Y.; BARRETT, S. L.; ZELINSKI, M. B.; STOUFFER, R. L. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Human Reproduction*, v. 26, n. 5, p. 1061–1072, 2011.

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, n. 6, p. 916–923, 2006.

XU, M.; WEST-FARRELL, E. R.; STOUFFER, R. L.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 3, p. 587–594, 2009.

XU, R. H.; PECK, R. M.; LI, D. S.; FENG, X.; LUDWIG, T.; THOMSON, J. A. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods*, v. 2, n. 3, p. 185-190, 2005.

YAMADA, M.; OHNISHI, H.; SANO, S.; NAKATANI, A.; IKEUCHI, T.; HATANAKA, H. Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with

phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 48, p. 30334-30339, 1997.

YAMAJI, M.; SEKI, Y.; KURIMOTO, K.; YABUTA, Y.; YUASA, M.; SHIGETA, M.; YAMANAKA, K.; OHINATA, Y.; SAITOU, M. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nature Genetic*, v. 40, n. 8, p. 1016-1022, 2008.

YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; TSURUTA, Y.; NANBU, K.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; HAMID, A.; YURA, Y.; MORI, I. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecological Endocrinology*, v. 11, n. 6, p. 371-381, 1997.

YAMASAKI, M.; MIYAKE, A.; TAGASHIRA, S.; ITOH N. Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 27, p. 15918-15921, 1996.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Molecular, Reproduction and Development*, v. 74, n. 9, p. 1095-1104, 2007.

YASEEN, M. A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. *Reproduction*, v. 122, n. 4, p. 601-610, 2001.

YEN, H. W.; JAKIMIUK, A. J.; MUNIR, I.; MAGOFFIN, D. A. Selective alterations in insulin receptor substrates-1, -2 and -4 in theca but not granulosa cells from polycystic ovaries. *Molecular Human Reproduction*, v. 10, n. 7, p. 473-479, 2004.

YEOH J. S. G.; HAAN G. Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mechanical. Advanced Development*, v. 128, n. 1, p. 17-24, 2007.

YING, Y.; Qi, X.; ZHAO, G. Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 14, n. 14, p. 7858-7862, 2001.

YING, Y.; ZHAO, G. Q. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Developmental Biology*, v. 2, n. 2, p. 484-492, 2001.

YOKOHAMA-TAMAKI, T.; OHSHIMA, H.; FUJIWARA, N.; TAKADA, Y.; ICHIMORI, Y.; WAKISAKA, S.; OHUCHI, H.; HARADA, H. Cessation of FGF10 signaling, resulting in a

defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development*, v. 133, n. 7, p. 1359-66, 2006.

YOKOTA, H.; YAMADA, K.; LIU, X.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice. *Endocrinology*, v. 138, n. 11, p. 4572–4576, 1997.

YORK, R. D.; MOLLIVER, D. C.; GREWAL, S. S.; STENBERG, P. E.; McCLESKEY, E. W.; STORK, P. J. S. Role of Phosphoinositide 3-Kinase and Endocytosis in Nerve Growth Factor-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation via Ras and Rap1. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 21, p. 8069-8083, 2000.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. I. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, v. 184, n. 1, p. 122–37, 1997.

YOSHIDA, M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, v. 35, n. 1, p. 76-81, 1993.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, v. 140, n. 4, p. 489–504, 2010.

YU, N.; ROY, S. K. Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary *in vitro*: effect of insulin. *Biology of Reproduction*, v. 61, n. 6, p. 1558–1567, 1999.

YUAN, C.; HU, H.; XU, G. Single amino-acid substitution in the N-terminal arm altered the tetramer stability of rat muscle lactate dehydrogenase A. *Science in China Series C: Life Sciences*, v. 44, n. 6, p. 576-84, 2001.

YUAN, J.; LIPINSKI, M.; DEGTEREV, A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, v. 40, n. 2, p. 401-413, 2003.

ZAMORANO, P. L.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies: a minireview. *Neuroendocrinology*, v. 63, n. 5, p. 397-407, 1996.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. *Reproduction*, v. 140, n. 6, p. 815-826, 2010a.

ZHANG, P., CHAO, H., SUN, X., LI, L., SHI, Q., SHEN, W. Murine folliculogenesis *in vitro* is stage-specifically regulated by insulin via the Akt signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 134, n. 1, p. 75–82, 2010b.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O. A.; OLSEN, S. K.; UMEMOR, I. H.; MOHAMMADI, M.; ORNITZ, D. M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 15694-15700, 2006.

ZHAO, J. Development of rat preantral follicles *in vitro*. PhD Thesis, Utrecht University, The Netherlands, 2000.

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; VAN DE WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat preantral follicles. *Zygote*, v. 10, n. 1, p. 85-94, 2002.

ZHENG, J.; WEN, Y.; SONG, Y.; WANG, K.; CHEN, D. B.; MAGNESS, R. R. Activation of multiple signaling pathways is critical for fibroblast growth factor 2- and vascular endothelial growth factor-stimulated ovine fetoplacental endothelial cell proliferation. *Biology of Reproduction*, v. 78, n. 1, p. 143-150, 2008.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 28, n. 3, p. 235-242, 2005.

ZHOU, Z.; ZHANG, Y. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v. 54, n. 4, p. 641-650, 2000.