

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

FABRICIO SOUSA MARTINS

PAPEL DO GDF-9, IGF-I E GH SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*  
DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

FORTALEZA  
2009

FABRICIO SOUSA MARTINS

PAPEL DO GDF-9, IGF-I E GH 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 Animal  
Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

FORTALEZA  
2009

FABRICIO SOUSA MARTINS

PAPEL DO GDF-9, IGF-I E GH 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: 30/07/2009

Conceito obtido: Satisfatório (aprovado com  
Louvor)

Nota: 10

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (UECE)  
Orientador

---

Dra. Evelyn Rabelo Andrade (UEL)  
Examinadora

---

Prof. Dr. Claudio Cabral Campello (UECE)  
Examinador

---

Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes (UECE)  
Examinador

---

Prof. Dr. José Ferreira Nunes (UECE)  
Examinador

*Aos meus pais, Maria  
Elizabeth de Souza  
Martins e Milton  
Martins Júnior*

## **Agradecimentos**

A Deus, pela vida.

Aos meus amados e queridos pais, Maria Elizabeth de Souza Martins e Milton Martins Júnior, pela educação, pelo incentivo e apoio que têm me dado durante todo esse tempo, pelos valores morais ensinados e por representarem o espelho por onde tive por base os princípios dignos de um bom cidadão.

Às minhas irmãs, Fabrine Souza Martins e Fabiane Souza Martins, e respectivos esposos Francisco Alexandre Colares e Henrique Pinheiro pelos bons momentos de convivência, pela amizade e pelo estímulo positivo que sempre me deram.

À Karla Rejane Oliveira Cavalcanti e Letícia Maria Cavalcanti Nunes pelo amor, incentivo e constante apoio concedido durante o doutorado. É difícil expressar em palavras o meu amor e a minha gratidão por vocês!

Ao meu orientador, Professor Doutor José Ricardo de Figueiredo, gostaria de expressar minha efusiva admiração pela dedicação, ética e pelo profissionalismo e de agradecer pelos conhecimentos transmitidos e por me dar a oportunidade de crescimento profissional e pessoal durante aproximadamente 8 anos de trabalho.

Gostaria de manifestar a minha gratidão aos meus queridos amigos responsáveis, também, pelo desenvolvimento desta tese: Cláudio Afonso Pinho Lopes, Márcia Viviane Alves Saraiva, Juliana Jales de Hollanda Celestino, Jamily Bezerra Bruno e Isabel Bezerra Lima-Verde que desde o primeiro dia do doutorado me acompanharam com entusiasmo, contribuíram, ensinaram, incentivaram de diferentes maneiras e apoiaram em muitos momentos de dificuldade. A todos vocês os meus sinceros e profundos agradecimentos!

Ao apoio e a amizade de Roberta Nogueira Chaves, Deborah Melo Magalhães, Anderson Pinto Correia, Rafael Rosseto e Cleidson Manoel Gomes da Silva que em muitas fases do projeto (cultivo, processamento histológico, análises de microscopia de fluorescência e biologia molecular) contribuíram de diferentes maneiras.

Aos professores doutores: Maria Helena Tavares Matos, José Roberto Viana Silva, Ana Paula Ribeiro Rodrigues, pela amizade, disponibilidade e prestatividade na conclusão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Cláudio Cabral Campelo pelo apoio concedido e pela sua benevolência nas análises estatística e sugestões.

Ao Professor Doutor Rodrigo Maranguape e sua equipe de trabalho que colaborou nas técnicas de biologia molecular.

Aos colegas do LAMOFOPA, em especial Gerlane Modesto, Sarah Bezerra Honório, Rebeca Pedrosa Magalhães, José Erisvaldo Maia Júnior, Laritza Lima, Anelise Costa, Luciana Faustino e Giovanna Rodrigues pelos bons momentos de convivência, orientação e apoio técnico-científico durante várias etapas do projeto.

À técnica do laboratório, Patrícia Magalhães, que com seu entusiasmo, sua capacidade e colaboração, auxiliou durante o processamento histológico.

Aos membros da banca examinadora pela análise pormenorizada desta tese e pelas sugestões proferidas.

À Universidade Estadual do Ceará, em nome do seu Magnífico Reitor Professor Francisco de Assis Moura Araripe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

Gostaria de agradecer também, aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) com os quais tive a oportunidade de ampliar os meus conhecimentos.

A dedicação e a competência das secretárias do PPGCV, Cristina e Adriana Albuquerque.

Ao Análio Rodrigues pela amizade, profissionalismo e apoio no processo administrativo dos projetos do LAMOFOPA e CPTBI.

Aos proprietários dos matadouros que disponibilizaram os ovários utilizados na execução dos projetos.

Enfim, agradeço cada pessoa que, de forma direta ou indireta, me ajudou a atingir mais uma etapa na trajetória da minha vida.

**MUITO OBRIGADO!**

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar a expressão das proteínas para o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I (IGF-I) e receptor do Hormônio do Crescimento (GH-R) bem como dos seus respectivos RNA mensageiros em ovários caprinos e avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9), IGF-I e Hormônio do Crescimento (GH) isoladamente ou em associação sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de folículos primordiais caprinos após o cultivo de córtex ovariano. Para investigar a presença do IGF-I e do GH-R no ovário caprino, foram empregadas as técnicas de imunohistoquímica e RT-PCR para verificar a expressão das proteínas e RNA mensageiros, respectivamente. Para avaliar a eficiência do GDF-9, IGF-I e GH sobre a sobrevivência e o desenvolvimento folicular, os fragmentos de córtex ovariano foram cultivados *in vitro* por 1 e 7 dias em MEM adicionado de diferentes concentrações (0, 1, 10, 50, 100 e 200 ng/ml) das referidas substâncias. Após a definição das melhores concentrações de cada substância, um novo estudo foi realizado para investigar os efeitos do GDF-9, IGF-I e GH isoladamente ou em associação sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de folículos cultivados por 1 e 7 dias. Antes e após cada período de cultivo, os fragmentos de córtex ovariano foram fixados para análise histológica e os folículos foram classificados em primordiais, intermediários, primários e secundários, bem como em normais ou atresicos. Além disso, os diâmetros oocitário e folicular foi avaliado antes e após o cultivo. Os resultados mostraram que a utilização de 200 ng/ml de GDF-9 promoveu a sobrevivência, o crescimento folicular e aumentou as taxas de folículos secundários, mantendo ainda a integridade ultra-estrutural folicular durante sete dias de cultivo. A proteína e o RNA mensageiro para o IGF-I foram encontrados nos compartimentos de folículos pré-antrais e antrais. Os resultados do cultivo mostraram que a utilização de IGF-I na concentração de 50 ng/ml promoveu a manutenção da sobrevivência folicular, o crescimento e a transição de folículos intermediários para primários após 7 dias de cultivo. Tanto as proteínas como o RNA mensageiro para o receptor do GH foram expressos nos compartimentos de folículos antrais caprinos. Após 7 dias de cultivo *in vitro*, foi verificado que a adição de 10 ng/ml de GH ao meio manteve a viabilidade e promoveu a ativação, o crescimento *in vitro* de folículos primordiais e o aumento do percentual de folículos primários. Com relação à interação entre as substâncias, foi observado que todos os tratamentos testados foram eficientes em promover a ativação e o crescimento de folículos primordiais. Entretanto, a utilização de IGF-I/GH e IGF-I sozinho foram mais eficazes em promover o aumento do percentual de folículos



intermediários e primários, respectivamente. Concluindo, os resultados do presente estudo mostraram que a expressão da proteína e do RNAm para IGF-I foi demonstrada em todas as categorias foliculares na espécie caprina. Tanto o RNA mensageiro como as proteínas para o receptor do GH foram expressos em folículos antrais caprinos. A utilização de GDF-9 (200 ng/ml), IGF-I (50 ng/ml) e GH (10 ng/ml) promoveu a manutenção da sobrevivência folicular, a ativação e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais caprinos. Após associação dos fatores de crescimento, o IGF-I/GH e IGF-I foram mais eficientes em promover a transição de folículos primordiais para folículos intermediários e de folículos intermediários para folículos primários, respectivamente.

## Abstract

The aims of this study were to investigate protein and mRNA expression for IGF-I and GH-R in goat ovarian follicles and to evaluate the effectiveness of GDF-9, IGF-I and GH alone or combined added to the culture medium on activation, growth and viability of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortex pieces. To investigate the involvement of the IGF-I and GH-R in the control of follicular development, protein and mRNA expression for IGF-I and GH-R were evaluated in goat follicles using immunohistochemistry and RT-PCR. To investigate the effectiveness of GDF-9, IGF-I and GH on follicular viability and development, the pieces of ovarian cortex were cultured in MEM added of the substances cited in different concentrations (0, 1, 10, 50, 100 e 200 ng/ml). After definition of the best concentration, the effects of GDF-9, IGF-I and GH alone or in different combinations were evaluated on the activation, growth and viability of ovarian follicles cultured during 1 and 7 days. Before and after culture, the pieces of ovarian cortex were fixed for histological analyses and the follicles were classified as primordial, intermediate, primary and secondary, as well as normal or atretic follicles. The results of the present study indicate that 200 ng/mL GDF-9 maintains the survival of preantral follicles and promotes activation of primordial follicles. Furthermore, GDF-9 stimulates the transition from primary to secondary follicles, maintaining ultrastructural integrity of the follicles. Our findings indicate that both mRNA and protein for IGF-I are expressed in different follicular compartments of preantral and antral follicles. *In vitro* studies have demonstrated that culture of goat ovarian cortical slices in medium supplemented with 50 ng/ml IGF-I promotes follicular survival, follicular growth and primordial to primary follicle transition. The protein and mRNAs for GH receptor were expressed in all compartments of antral follicles. Addition of 10 ng/ml GH after 7 days of culture of goat ovarian cortical slices promoted follicular survival, the growth of primordial follicles and progression to primary follicles. The results indicate that GDF-9, IGF-I and GH alone or in associations maintain preantral follicle survival *in vitro* and promotes primordial follicles activation stimulating the transition from primordial follicles to subsequent stages. Nevertheless, this study showed that the IGF/GH and IGF alone are more efficient to increase the percentage of intermediate and primary follicles, respectively. In conclusion, IGF-I protein and mRNA were expressed in all follicular categories of goat. The GH-R protein and mRNA protein were expressed in antral follicles. Furthermore, GDF-9 (200 ng/ml), IGF-I (50 ng/ml) e GH (10 ng/ml) maintained goat preantral follicle survival and promoted the activation and development of primordial follicles. Nevertheless, the IGF-I/GH and IGF-I

were more efficient to promote the transition from primordial to intermediate follicles and from intermediate to primary follicles, respectively.

## Lista de figuras

### Revisão de literatura

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrando o ovário mamífero com suas principais estruturas.....	25
---	----

### Capítulo 1

<b>Figura 1</b> – Figure 1. Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing degenerated primary follicles (A) and normal secondary follicles (B).....	66
---	----

<b>Figura 2</b> – Figure 2. Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM medium and MEM with different concentration of GDF-9.....	67
--	----

<b>Figura 3</b> – Figure 3. Percentages of primordial (A) and developing follicles (intermediate [B], primary [C] and secondary [D] in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM medium and MEM with different concentrations of GDF-9.....	69
--	----

<b>Figura 4</b> – Figure 4. Electron micrograph of a preantral follicle in non-cultured ovarian cortex (control).....	71
---	----

<b>Figura 5</b> – Figure 5. Electron micrograph of intermediate follicle in ovarian cortex cultured for 7 days with 200 ng/ml of GDF-9.....	71
---	----

<b>Figura 6</b> – Figure 6. Electron micrograph of secondary follicle in ovarian cortex cultured for 7 days with 200 ng/ml of GDF-9.....	72
--	----

### Capítulo 2

<b>Figura 1</b> – Figure 1. Expression of IGF-I mRNA (mean $\pm$ SEM) in goat ovarian follicles .....	89
---	----

<b>Figura 2</b> – Figure 2. IGF ligand immunoreactivity in the different structures found within goat ovaries .....	90
<b>Figura 3</b> – Figure 3. Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid-Schiff–hematoxylin, showing degenerated primary follicles (A) and normal primary follicles (B) .....	91
<b>Figura 4</b> – Figure 4. Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM <sup>+</sup> and MEM <sup>+</sup> plus 1, 10, 50, 100, 200 ng/ml IGF-I .....	92
<b>Figura 5</b> – Figure 5. Mechanically isolated follicles visible under an fluorescence microscope after fluorescence staining for follicle viability (calcein-AM and ethidium homodimer-1). Preantral follicle in cultured ovarian tissue in MEM <sup>+</sup> containing 50 ng/ml of IGF-I for 7 days were visible by (A) light microscopy and (B) fluorescence microscopy. Scale bars represent 25 µm .....	93
<b>Figura 6</b> – Figure 6. Percentages of primordial (A) and developing follicles (intermediate [B], primary [C] and secondary [D]) in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM <sup>+</sup> medium and in MEM <sup>+</sup> plus different concentrations of IGF-I .....	95

### Capítulo 3

<b>Figura 1</b> – Figure 1. Expression of GH-R mRNA in goat ovarian follicles (means $\pm$ SEM). (A) COCs from small and large antral follicles .....	117
<b>Figura 2</b> – Figure 2. GH-R immunoreactivity in goat ovarian stroma tissue around preantral follicles .....	118
<b>Figura 3</b> – Figure 3. GH-R immunoreactivity in goat small antral follicles .....	118
<b>Figura 4</b> – Figure 4. GH-R immunoreactivity in goat large antral follicles .....	119

**Figura 5** – Figure 5. Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid-Schiff–hematoxylin, showing degenerated primary follicles (A) and normal secondary follicles (B) .....120

**Figura 6** – Figure 6. Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus 1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml GH .....120

**Figura 7** – Figure 7. Mechanically isolated follicles visible under an fluorescence microscope after fluorescence staining for follicle viability with calcein-AM and ethidium homodimer-1. Follicles from ovarian tissue that was cultured in MEM<sup>+</sup> containing 10 ng/ml of GH over 7 days (A, B) and MEM<sup>+</sup> alone (C, D), which are visible on light microscopy (A, C) and fluorescence microscopy (B, D) .....121

**Figura 8** – Figure 8. Percentages of primordial (A), intermediate (B) and primary (C) follicles in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM<sup>+</sup> medium and MEM<sup>+</sup> plus different concentrations of GH .....123

## Capítulo 4

**Figura 1** – Figure 1. Histological section after staining with periodic acid-Schiff and hematoxylin showing (A) normal follicles and (B) degenerated follicles in non-cultured tissue .....139

**Figura 2** – Figure 2. Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus GDF-9, IGF-I and GH alone or in different associations .....140

**Figura 3** – Figure 3. Mechanically isolated follicles visible under an fluorescence microscope after fluorescence staining for follicle viability (calcein-AM and ethidium homodimer-1). Preantral follicle in cultured ovarian tissue in MEM<sup>+</sup> containing GDF-9/IGF-I/GH for 7 days were visible by (A) light microscopy and (B) fluorescence microscopy .....141

**Figura 4** – Figure 4. Percentages of primordial (A), intermediate (B) and primary (C) in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus GDF-9, IGF-I and GH alone or combined .....143

## Lista de tabelas

### Capítulo 1

<b>Tabela 1</b> – Table 1. Follicle and oocyte diameter (mean±SD) in non-culture tissues and in tissues cultured for 7 days in MEM <sup>+</sup> (control medium) and MEM <sup>+</sup> supplemented with various concentrations of GDF-9 .....	70
---	----

### Capítulo 2

<b>Tabela 1</b> – Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of goat cells and tissues .....	85
--	----

<b>Tabela 2</b> – Table 2. Relative intensity of immunohistochemical staining for IGF-I ligand in goat ovarian follicles .....	91
--	----

<b>Tabela 3</b> – Table 3. Oocyte diameter and follicular diameter in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 7 days in MEM <sup>+</sup> (control medium) and MEM <sup>+</sup> supplemented with various concentrations of IGF-I .....	96
---	----

### Capítulo 3

<b>Tabela 1</b> – Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of goat cells and tissues .....	112
--	-----

<b>Tabela 2</b> – Table 2. Oocyte and follicle diameter in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 7 days in MEM <sup>+</sup> (control medium) and MEM <sup>+</sup> supplemented with various concentrations of GH .....	124
---	-----

### Capítulo 4

<b>Tabela 1</b> – Table 1 - Different media tested for the <i>in vitro</i> culture of caprine preantral follicles.....	136
--	-----



**Tabela 2** – Table 2. Percentage of viable preantral follicles after 7 days *in vitro* culture stained with calcein-AM.....141

**Tabela 3** – Table 3. Oocyte and follicle diameter in non-cultured tissues (fresh control) and in tissue cultured for 7 days in MEM<sup>+</sup> (control medium) and MEM<sup>+</sup> supplemented with GDF-9, IGF-I and GH alone or in different associations .....144

## Lista de abreviaturas

ActR	: Receptor para ativina
AREG	: Anfiregulina
ALK5	: Receptor de ativina tipo kinase-5
AMH	: Hormônio anti-Mülleriano
ANOVA	: Análise de variância
ATP	: Adenosina Trifosfato
as	: Anti senso
BDNF	: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BMPs	: Proteínas Morfogenéticas Ósseas
bp	: Pares de base
BrdU	: Bromodesoxiuridina
BSA	: Albumina Sérica Bovina
BTC	: Betacelulina
°C	: Graus Celsius
Ca <sup>++</sup>	: Íon cálcio
CC	: Células do cúmulus
cDNA	: Ácido Desoxirribonucléico complementar
CG	: Células da granulosa
CGP	: Células Germinativas Primordiais
c-Kit	: Receptor para <i>Kit ligand</i>
CL	: Corpo lúteo
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de Carbono
COCs	: Complexos Cúmulus-oócitos
DAB	: Diaminobenzidina
DNA	: Ácido desoxirribonucléico
DNase	: Desoxirribonuclease
dNTP	: Nucleotídeos
EGF	: Fator de Crescimento Epidermal
EGF-R	: Receptor para Fator de Crescimento Epidermal
EREG	: Epiregulina
FGF	: Fator de Crescimento Fibroblástico
FGF-2	: Fator de Crescimento Fibroblástico básico

FSH	: Hormônio Folículo Estimulante
Fig.	: Figura
GDF-9	: Fator de Crescimento e Diferenciação – 9
GDF-9B	: Fator de Crescimento de Diferenciação – 9B
GH	: Hormônio do Crescimento
GHBP	: Proteína ligante para o Hormônio do Crescimento
GH-R	: Receptor para o Hormônio do Crescimento
GnRH	: Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	: horas
HB-EGF	: Ligante Heparina similar ao Fator de Crescimento Epidermal
IAA	: Ácido 3-indol acético
IGF-I	: Fator de Crescimento semelhante à Insulina – I
IGF-II	: Fator de Crescimento semelhante à Insulina – II
IGFBP	: Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
IGFR-I	: Receptor para o Fator de Crescimento semelhante à Insulina-I
IGFR-II	: Receptor para o Fator de Crescimento semelhante à Insulina-II
IgG	: Imunoglobulina
K <sup>+</sup>	: Íon potássio
kDa	: Quilodaltons
KGF	: Fator de Crescimento Keratinócito
KL	: <i>Kit ligand</i>
LH	: Hormônio Luteinizante
LH-R	: Receptor para Hormônio Luteinizante
MEM	: Meio Essencial Mínimo
MEM <sup>+</sup>	: Meio Essencial Mínimo suplementado
mg	: Miligrama
min.	: Minutos
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
mOsm/L	: Miliosmol/Litro
MOIFOPA	: Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
mRNA	: Ácido Ribonucléico mensageiro
Na <sup>+</sup>	: Íon sódio
ng	: Nanograma

nm	: Nanômetro
PAPPA-A	: Proteína Plasmática Associada à Gestação
PAS	: Ácido periódico de Schiff
PBS	: Tampão Fosfato Salino
PCNA	: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR	: Reação em Cadeia da Polimerase
pH	: Potencial Hidrogeniônico
PLSD	: Diferença significativa mínima e protegida
$P < 0.05$	: Probabilidade de erro menor do que 5%
$P > 0.05$	: Probabilidade de erro maior do que 5%
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAase	: Enzima ribonuclease
RT	: Transcriptase reversa
RT-PCR	: Reação em Cadeia de Polimerase-Transcriptase Reversa em tempo real
SCF	: Fator de Células Tronco
s	: Senso
sec	: Segundo
$\pm$ SD	: Mais ou menos o desvio padrão
TGF- $\beta$	: Fator de Crescimento Transformante beta
VEGF	: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VIP	: Peptídeo Intestinal Vasoativo
$\chi^2$	: Qui-quadrado
ZP	: Zona pelúcida
$\mu$ g	: Microgramas
$\mu$ L	: Microlitro
$\mu$ m	: Micrômetro
%	: Porcentagem
~	: Aproximadamente

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
2.1 Ovário mamífero.....	24
2.2 Oogênese.....	26
2.3 Foliculogênese.....	26
2.4 Classificação e caracterização estrutural dos folículos ovarianos.....	27
2.5 Crescimento folicular.....	27
2.6 População folicular.....	28
2.7 Atresia folicular.....	28
2.8 Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>	31
2.9 Importância do FSH, LH e GH no controle da foliculogênese.....	32
2.9.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	32
2.9.2 Hormônio Luteinizante (LH).....	34
2.9.3 Hormônio do Crescimento (GH).....	35
2.10 Importância dos fatores de crescimento no controle da foliculogênese.....	37
2.10.1 Fator de Crescimento de Diferenciação-9 (GDF-9).....	37
2.10.2 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I).....	39
2.10.3 Kit Ligand (KL).....	41
2.10.4 Fator de Crescimento Epidermal (EGF).....	42
2.10.5 Proteínas Morfogenéticas Ósseas -2, -4, -6 e -7 (BMP-2,-4,-6,-7).....	44
2.10.6 Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15).....	45
2.10.7 Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF).....	46
2.10.8 Fator de Crescimento Keratinócito (KGF).....	47
2.10.9 Neurotrofinas.....	47
2.10.10 Ativina.....	48
2.10.11 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF).....	49
2.11 Técnicas para o estudo da foliculogênese.....	50
2.11.1 Cultivo <i>in vitro</i> .....	50
2.11.2 Ferramentas para avaliação da expressão de proteínas e RNAm	
em folículos ovarianos.....	52
2.11.2.1 Imunohistoquímica.....	52
2.11.2.2 Biologia Molecular.....	52

2.11.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	53
2.11.4 Manipulação genética de animais (Transgenia).....	54
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>55</b>
<b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....</b>	<b>57</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
5.1 Objetivo Geral.....	58
5.2 Objetivos Específicos.....	58
<b>6 CAPÍTULO 1 - Fator de Crescimento e Diferenciação 9 estimula a ativação de</b> fóliculo primordiais caprinos <i>in vitro</i> e a progressão para folículos secundários.....	<b>60</b>
<b>7 CAPÍTULO 2 - Expressão de RNAm para o Fator de Crescimento semelhante à</b> Insulina-I (IGF-I) em folículos ovariano caprinos e a influência do IGF-I sobre a sobrevivência e o desenvolvimento <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos.....	<b>79</b>
<b>8 CAPÍTULO 3 - Expressão do Receptor do Hormônio do Crescimento (GH-R) em</b> Folículos Ovarianos Caprinos e Influência do GH sobre a Sobrevivência e o Desenvolvimento <i>in vitro</i> de Folículos Pré-antrais.....	<b>106</b>
<b>9 CAPÍTULO 4 - Associação entre Fator de Crescimento e Diferenciação 9, Fator de</b> Crescimento Semelhante à Insulina I e Hormônio do Crescimento Sobre a Sobrevivência e o Desenvolvimento <i>In vitro</i> de Folículos Pré-antrais Caprinos.....	<b>131</b>
<b>10 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>151</b>
<b>11 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>152</b>
<b>12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>153</b>
<b>13 APÊNDICE.....</b>	<b>187</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os caprinos (*Capra hircus*), pertencentes à família Bovidae, representam um dos primeiros animais a serem domesticados pelos homens. Segundo pesquisas da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), o nordeste brasileiro tem sido destacado há séculos como área propícia para a exploração de ruminantes domésticos, uma vez que as condições edafo-climáticas da região concedem a estes animais créditos como potenciais fornecedores de carne, leite e pele. A caprinovinocultura está apresentando um ciclo de crescimento mundial. Este crescimento intensificou-se nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, detentores dos maiores rebanhos atualmente. Acompanhando esta tendência mundial, projeta-se hoje uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos. Serão mais de 50 e 100 milhões de cabeças de caprinos e ovinos, respectivamente (FONSECA, 2005). Diante destas perspectivas, nas últimas décadas, uma quantidade significativa de pesquisas tem sido realizada na área de reprodução animal, visando aumentar o potencial reprodutivo de caprinos de alto valor zootécnico.

Ao nascimento, o ovário caprino contém milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o *pool* de estoque de folículos ovarianos. Entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação, visto que a maioria morre por um processo natural designado atresia folicular (MARKSTRÖM et al., 2002). Neste contexto, torna-se prioritário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão dos processos relacionados com a formação, o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos caprinos, especialmente na fase inicial. Desta forma, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) surge como uma importante ferramenta para esse estudo, dando suporte necessário para a elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial. A ativação, ou seja, a saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência para a fase de crescimento é a primeira e essencial etapa, onde os folículos primordiais deixam o estágio de repouso e iniciam o seu crescimento. Os mecanismos precisos que controlam o início e a progressão do crescimento folicular ainda estão sendo investigados. Em espécies mamíferas, o contínuo crescimento folicular é controlado tanto por hormônios (gonadotróficos e somatotróficos), como fatores de crescimento que agem, direta ou indiretamente, de forma autócrina e/ou parácrina.

Neste contexto, uma melhor identificação e compreensão das diferentes substâncias envolvidas na promoção do desenvolvimento folicular e no curso da atresia são

aspectos importantes para subsidiar o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente para que ocorra a ativação folicular *in vitro*, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais (DEMEESTERE et al, 2005). Por conseguinte, poderá ser uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diversos estádios de desenvolvimento, para as biotécnicas de produção *in vitro* de embriões e clonagem (TELFER, 1996).

Para uma melhor compreensão da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao ovário mamífero, foliculogênese, população e atresia folicular, regulação da foliculogênese, destacando a importância dos hormônios e fatores de crescimento, e ainda modelos utilizados para o estudo da foliculogênese. Os benefícios oriundos de uma melhor compreensão do desenvolvimento folicular, para a melhoria da eficiência reprodutiva dos caprinos, também serão enfatizados.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Ovário mamífero**

O ovário desempenha duas funções prioritárias para o sistema reprodutivo de fêmeas mamíferas, sendo responsável pela: 1) diferenciação e liberação de um oócito maduro para fertilização (MCGEE; HSUEH, 2000); 2) síntese e secreção de hormônios que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade estral/menstrual e manutenção do trato reprodutivo e suas funções (HIRSHFIELD, 1991). Em todas as espécies mamíferas, o ovário é composto de duas regiões distintas, uma medular e outra cortical, circundada pelo epitélio germinal. Na maioria das espécies, a medula ovariana está localizada mais internamente e consiste de um arranjo irregular de tecido conjuntivo fibroelástico e tecido nervoso e vascular que chega ao ovário através do hilo (SILVA, 2005). O córtex ovariano, localizado mais externamente, representa a região funcional do órgão, sendo composto de tecidos conectivos (fibroblastos, colágeno e fibras reticulares), folículos ovarianos e corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento ou de regressão (SILVA, 2005). A funcionalidade deste órgão durante a vida reprodutiva das fêmeas depende da perfeita interação entre fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, que atuam coordenando o processo da foliculogênese ovariana.



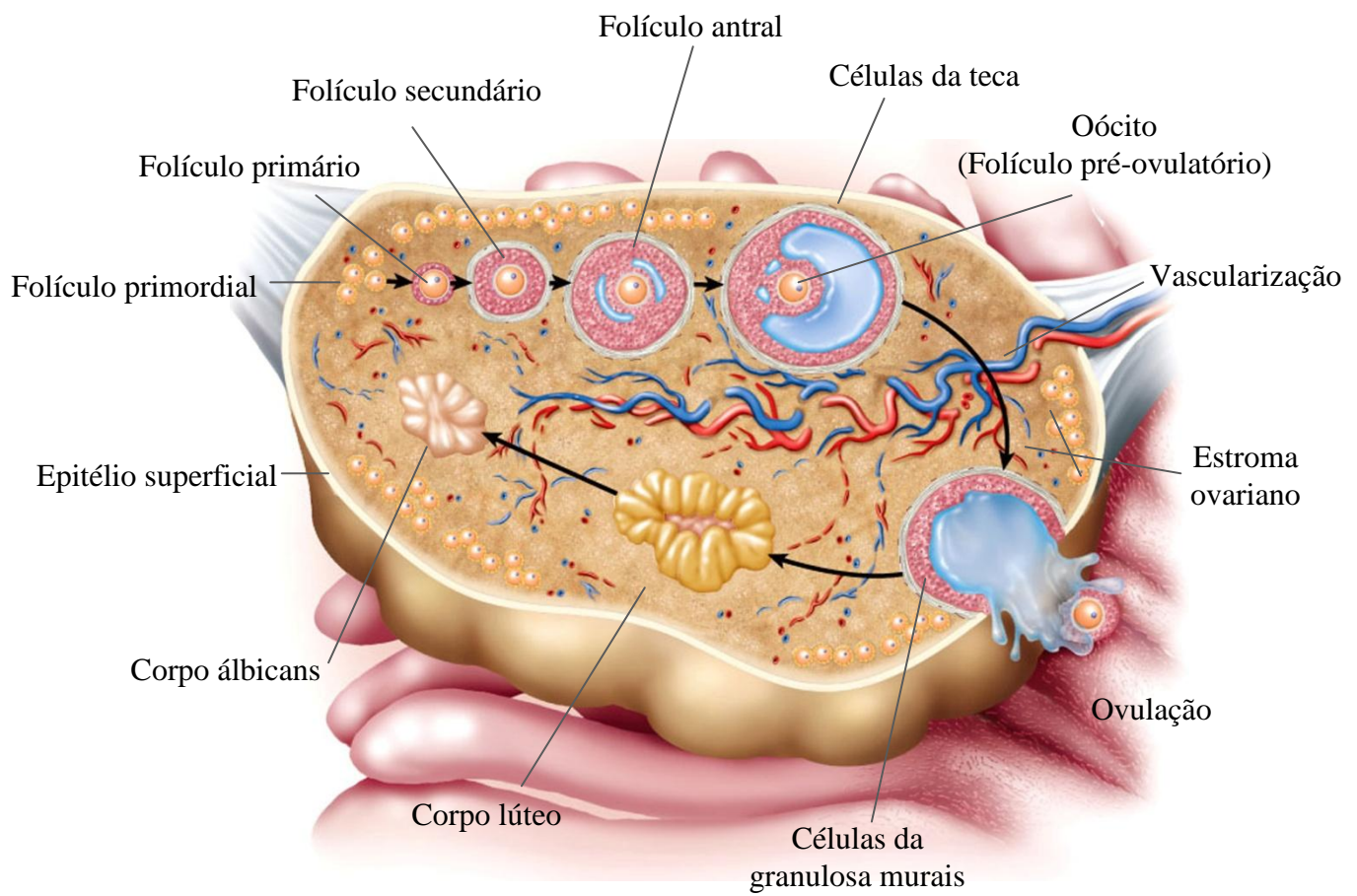


Figura 1. Esquema ilustrando o ovário mamífero com suas principais estruturas.

## 2.2 Oogênese

Conforme descrito por Rüsse (1983), a oogênese em ruminantes consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do oócito haplóide fecundado. A oogênese inicia-se antes do nascimento, mas somente alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (WASSARMAN, 1988). No embrião, as células germinativas primordiais localizadas na parede do saco vitelínico migram para as gônadas em desenvolvimento, perdem suas características de motilidade e sofrem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas transformando-se em oogônias (SADEU et al., 2006). Dois tipos de células germinativas com funções diferentes resultam da última divisão mitótica das CGP. Uma inicia, imediatamente, outra divisão mitótica e dá origem a uma linha de células oogônias, enquanto a outra permanece em intérfase e divide-se periodicamente, originando novas CGP que se diferenciarão posteriormente em oogônias. Uma vez formadas, as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991). No estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica ou vesícula germinativa, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (MOORE; PERSAUD, 1994). Na puberdade, imediatamente antes da ovulação, com o pico dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), os oócitos que terminaram seu crescimento retomam a meiose e o núcleo passa do estágio de vesícula germinativa para diacinese (MOORE; PERSAUD, 1994). Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário (BETTERIDGE et al., 1989). Inicia-se a seguir a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (GORDON, 1994). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então, completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado (MOORE; PERSAUD, 1994).

## 2.3 Foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf

ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A foliculogênese ocorre simultaneamente a oogênese, quando o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies. Em outras palavras, a foliculogênese inicia após e termina antes da oogênese e pode ser dividida em duas fases: 1) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; 2) fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (HULSHOF et al., 1994).

## **2.4 Classificação e caracterização estrutural dos folículos ovarianos**

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1991). De acordo com os aspectos morfológicos, os folículos podem ser divididos em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, transição, primários e secundários e 2) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de De Graaf ou pré-ovulatório (HULSHOF et al., 1994).

## **2.5 Crescimento folicular**

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da passagem dos folículos do *pool* de reserva, ou folículos quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e pré-ovulatório) (RUSSE, 1983). O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa. Neste processo, os folículos primordiais gradualmente adquirem células da granulosa de formato cúbico, tornam-se folículos de transição, caracterizados pela presença de células da granulosa com ambos formatos pavimentoso e cúbico, e em seguida, folículos primários, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico (GOUGEON; BUSSO, 2000). Além da mudança da forma das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente (HIRSHFIELD, 1991). Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais, bem como os mecanismos envolvidos na variação do período de início do crescimento folicular são ainda enigmáticos e representam uma das maiores questões relacionadas com a biologia ovariana (FORTUNE et al., 2000).

Uma característica notável dos folículos primários é a presença de uma zona pelúcida, formada por glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), que circunda o oócito (RANKIN et al., 2001). Os folículos são denominados secundários quando apresentam pelo menos duas camadas de células da granulosa e células da teca em torno da membrana basal (BARNETT et al., 2006). Neste estágio, as células da granulosa apresentam 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 (KIDDER; MHAWI, 2002).

A próxima fase da foliculogênese, em que os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, é caracterizada pela organização das células da granulosa em várias camadas com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células granulosa, denominada antro. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006).

## **2.6 População folicular**

A quantidade total de folículos presente no ovário mamífero é determinada logo no período embrionário em primatas e ruminantes (BETTERIDGE et al., 1989) ou em um breve período após o nascimento em roedores (HIRSHFIELD, 1991). Apesar deste conceito ter sido descrito por Waldeyer desde 1870 (WALDEYER, 1870) e vigorar há mais de 150 anos (BYSKOV et al., 2005), recentes trabalhos têm demonstrado mecanismos envolvidos na formação, após o nascimento, de novas células germinativas e folículos na mulher (BUKOVSKY et al., 2004) e camundonga adultas pela atuação de células-tronco (JOHNSON et al., 2004). O número de folículos pré-antrais por ovário varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW et al., 2000); 33.000 na ovelha (AMORIM et al., 2000); 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999a) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986).

## **2.7 Atresia folicular**

O número de folículos ovarianos que chega ao estágio ovulatório é muito pequeno. Estima-se que aproximadamente 99,9% sofrem um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia, fazendo com que o ovário seja um órgão de baixíssima

produtividade (JOHNSON, 2003). Segundo Ingram (1962), vários são os fatores que podem influenciar o processo de atresia, como idade, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, hormônios, nutrição e isquemia.

Observações *in vitro* sugerem que a atresia não é um processo súbito, que envolve a morte em conjunto de todas as células da granulosa. A viabilidade de algumas células da granulosa de folículos atrésicos e a ausência de sinais de degeneração dos oócitos, em início de atresia, sugere que os folículos podem recuperar-se da atresia e retornar à ovulação (HIRSHFIELD, 1991).

A atresia folicular não é igualmente prevalente em todos os estádios de desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994), sendo predominante em folículos antrais (HIRSHFIELD, 1988). Em ratos, por exemplo, folículos pré-antrais atrésicos são raros (HIRSHFIELD, 1988). Apesar de ser um fenômeno natural, independentemente da fase na qual ocorre, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida útil de um animal, fazendo com que o potencial do ovário seja fracamente aproveitado.

A atresia pode ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 1995). A isquemia é uma das principais causas do desencadeamento da morte celular por degeneração (FARBER, 1982). A redução da oxigenação celular durante a isquemia resulta em diminuição da produção de ATP afetando o funcionamento da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  presente na membrana celular. As mudanças na permeabilidade membranária provocam alterações nos níveis intracelulares de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ . O aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  para o citoplasma, que ativa a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, associado com modificações na distribuição de  $\text{Ca}^{++}$  e com aumento de água intracelular podem levar ao aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração. Com a evolução da degeneração, a morte celular é identificada histologicamente como necrose (BARROS et al., 2001).

Ainda na década de 80, foi postulado que a atresia ocorre por um processo de morte celular programada conhecido por apoptose (TSAFIRI; BRAW, 1984). Posteriormente, um grande número de evidências demonstraram que a apoptose é o principal mecanismo bioquímico responsável pela atresia folicular (MARKSTROM et al., 2002). Este tipo de morte celular é um processo ativo que é encontrado em todos os organismos multicelulares, ocorrendo em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a um estímulo fisiológico. A principal alteração observada é a condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear. Independentemente da condensação da cromatina, endonucleases dependentes de cálcio e

magnésio são ativadas, resultando na clivagem do DNA entre as unidades nucleossomais, a cada 180-200 pares de bases, formando corpos apoptóticos (TILLY, 1996).

Durante a atresia, muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária (MORITA; TILLY, 1999). Nestes folículos, alterações nas células da granulosa são raramente observadas. À medida que o folículo se desenvolve, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa.

A progressão da apoptose em folículos ovarianos é dependente de uma regulação cooperativa de diferentes fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos e o balanço entre os fatores que promovem a sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose pode decidir se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (HSU; HSUEH, 2000). Duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: família das caspases e a família Bcl-2 (MARKSTROM et al., 2002). As caspases são consideradas as executoras principais do caminho apoptótico e atuam ativando DNases, que são endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal. A DNase e sua unidade inibitória são constantemente expressas nas células. A clivagem, mediada por caspases, da subunidade inibitória resulta na liberação e ativação das endonucleases que cliva o DNA a cada 180-200 pares de bases nitrogenadas. A família Bcl-2 compreende tanto membros anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> e membros pró-apoptóticos, incluindo Bax, Bid, Bik, BOD e Bcl-X<sub>S</sub> (MARKSTROM et al., 2002).

Técnicas como a histologia clássica e a microscopia eletrônica de transmissão constituem ferramentas importantes na avaliação da qualidade folicular. Na análise histológica, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (WOOD et al., 1997). Foi demonstrado nos trabalhos de Silva et al. (2002) que oócitos de folículos primordiais caprinos são mais sensíveis à degeneração do que as células da granulosa. Ultra-estruturalmente, os oócitos inclusos em folículos primordiais degenerados apresentam um progressivo aumento dos vacúolos citoplasmáticos e retração oocitária, eventos que precedem o aparecimento de alterações nas células da granulosa. Também são observados sinais de danos às membranas e cristas mitocondriais presentes no ooplasma. As células da granulosa tornam-se túrgidas e ocorre diminuição do número de organelas no seu citoplasma (TASSEL; KENNEDY, 1980). Já em folículos antrais, a picnose nuclear e a vacuolização citoplasmática

ocorrem primariamente nas células da granulosa (HAY et al., 1976). Em seguida, ocorre o aparecimento de alterações degenerativas nas células tecais (O'SHEA et al., 1978) e, finalmente, no oócito (HAY et al., 1976).

## **2.8 Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular *in vitro***

A composição do meio é um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Figueiredo et al. (1994) descreveram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais bovinos *in vitro* foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina. Foi demonstrado também que, a adição de uma mistura de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina ao meio de cultivo de base denominado controle (Meio Essencial Mínimo - MEM) suplementado com antibióticos: penicilina – 20 UI/mL, estreptomicina – 200 µg/mL, 10% de soro fetal bovino e ITS (insulina – 6,25 µg/mL, transferrina – 6,25 ng/mL e selênio – 6,25 ng/mL) aumentou significativamente a percentagem de folículos morfologicamente normais de 29,4% (meio controle) para 78,0% (meio tratado). Jewgenow et al. (1998) também mostraram que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao meio de cultivo (MEM) é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*. Neste trabalho, também foi demonstrado que o MEM foi mais eficiente do que o TCM 199 durante o cultivo de folículos pré-antrais felinos. Além disso, o completo desenvolvimento de oócitos primários até estarem aptos à maturação e fecundação *in vitro* foi obtido quando folículos pré-antrais de camundongas foram cultivados em MEM (EPPIG & O'BRIEN, 1996).

Sabe-se que os folículos podem ser potencialmente influenciados pelos fatores de crescimento produzidos pelas células do estroma e por outros folículos, ou por fatores produzidos dentro dos próprios folículos (hormônios e fatores de crescimento) (FORTUNE, 2003). Assim, diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, tanto de animais de laboratórios como animais domésticos (vacas, cabras e ovelhas). Substâncias como soro fetal, FSH, 17β-estradiol, EGF, FGF, ativina, insulina e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) são largamente utilizadas.

A seguir, serão descritos alguns resultados relacionados aos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais utilizando os hormônios FSH, LH e GH e diversos fatores de crescimento.

## **2.9 Importância do FSH, LH e GH no controle da foliculogênese**

A regulação da proliferação celular, diferenciação, e atresia relacionadas com a foliculogênese é resultado de uma complexa interação entre fatores locais e endócrinos (SILVA et al., 2006a). Nesse contexto observa-se uma grande importância de gonadotrofinas e somatotrofinas no que se refere ao crescimento dos folículos ovarianos (LEVI-SETTI et al., 2004). As gonadotrofinas apresentam uma maior importância nos estádios mais avançados do desenvolvimento folicular. Entretanto, inúmeras alterações quantitativas e qualitativas foram observadas na população de folículos pré-antrais de camundongas hipofisectomizadas (EDWARDS et al., 1977) e ovelhas (DUFOUR et al., 1979) evidenciando que as gonadotrofinas afetam os estádios de desenvolvimento pertencentes à fase pré-antral. Recentemente, estudos da foliculogênese inicial realizados com camundongas transgênicas demonstraram que a mutação de genes que controlam a expressão das gonadotrofinas, bem como de seus receptores, afeta diretamente não só a ovulação e formação de corpo lúteo, mas também o processo de formação de folículos primordiais, crescimento folicular e atresia (BARNETT et al., 2006).

Existem fortes evidências demonstrando a participação do GH sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais (ZHAO et al., 2002; SHIMIZU et al., 2008). Outros trabalhos também evidenciaram um papel para o GH e o GHR como fatores promotores da sobrevivência celular. Aparentemente células expressando o GHR têm a cascata de sinais anti-apoptóticos PI-3K/Akt sendo expressa constitutivamente, aumentando a sobrevivência celular (COSTOYA et al., 1999).

A seguir serão relatados os efeitos do FSH, LH, GH bem como dos fatores de crescimento envolvidos no controle da foliculogênese.

### **2.9.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)**

O hormônio gonadotrófico FSH é fundamental para a manutenção da função ovariana. A interação deste hormônio com seu receptor de superfície iniciam uma cadeia de reações intracelulares características de receptores acoplados à proteína-G, incluindo estimulação de adenilato ciclase e fosforilação de proteínas específicas (RICHARDS, 1994). A ligação do FSH ao seu receptor é restrita às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular, síntese de esteróides e expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Hormônio



Luteinizante (LH).

A expressão de receptores para o FSH nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais bovinos, bem como em oócitos de folículos primordiais de animais de laboratório, reforçam a idéia da ação do FSH sobre o crescimento dos folículos pré-antrais (ROY, 1993, WANDJI et al., 1992). Durante o cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70  $\mu\text{m}$ ) bovinos, o FSH promoveu um aumento do diâmetro folicular (HULSHOF et al., 1995). Após seis dias de cultivo na presença de FSH, folículos primários e secundários (60-179  $\mu\text{m}$ ), isolados enzimaticamente de ovários de fetos bovinos, aumentaram o diâmetro, a sobrevivência folicular, bem como a secreção de progesterona e estradiol (WANDJI et al., 1996). Gutierrez et al. (2000) isolaram folículos secundários bovinos e, após cultivo de 28 dias, observaram que o FSH promoveu o crescimento folicular e aumentou as taxas de formação de antro. Em suínos, o FSH está envolvido na proliferação e diferenciação de células da granulosa de folículos pré-antrais (HIRAO et al., 1994).

Em hamsters, pequenos folículos pré-antrais mostraram ser dependentes de FSH, pois esse hormônio reduziu significativamente a percentagem de folículos atrésicos (ROY; GREENWALD, 1989). Liu et al. (1999) observaram que o FSH estimulou o crescimento de folículos pré-antrais (95–120  $\mu\text{m}$ ) isolados de ovários de camundongas adultas. Nesta mesma espécie, o FSH promoveu a sobrevivência, a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a secreção de estradiol e inibina em folículos isolados (95–142 $\mu\text{m}$ ) (CORTVRINDT et al., 1997).

Matos et al. (2007) mostraram que 50 ng/mL de FSH adicionado ao meio de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de caprinos foi responsável pela manutenção da viabilidade e da integridade ultra-estrutural dos folículos pré-antrais, e pelo aumento dos diâmetros folicular e oocitário. Contrariamente, o FSH não exerceu efeito sobre o diâmetro folicular e oocitário, bem como sobre o número de células da granulosa cultivadas em tecido ovariano de bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997). Além disso, não foi observado o efeito da adição de 5 ng/ml de FSH (DERRAR et al., 2000), ou de outras concentrações de FSH (1, 10 ou 100 ng/ml) sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos cultivados durante 7-14 dias (FORTUNE et al., 1998).

Através da indução da liberação de fatores de crescimento pelos grandes folículos antrais e células do estroma, o FSH pode exercer um efeito indireto sobre o desenvolvimento de folículos em fases iniciais, pois estudos evidenciaram que o FSH promove a proliferação de células da granulosa, aumentando a expressão de fatores parácrinos como o Fator de

Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e a ativina (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Além disso, o FSH regula a expressão do Kit Ligand (KL), do Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e da Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15) em folículos de camundongas (JOYCE et al., 1999, THOMAS et al., 2005). Os referidos fatores têm se mostrado importantes na ativação de folículos primordiais e posteriormente no crescimento de folículos primários e secundários (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

### **2.9.2 Hormônio Luteinizante (LH)**

O hormônio luteinizante (LH), assim como o FSH, é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior, sendo um regulador primário da função ovariana. O LH pode apresentar múltiplos papéis sobre o desenvolvimento folicular, porém a maioria dos estudos tem focado sua ação em folículos em estádios mais avançados de desenvolvimento, durante a fase pré-ovulatória (WU et al., 2000). O LH tem um papel bem estabelecido e essencial na síntese de esteróides e na ovulação. Enquanto a ocorrência da ovulação normal é impossível na ausência do LH (WEISS et al., 1992; TOLEDO et al., 1996), o papel específico deste hormônio na foliculogênese inicial, bem como na maturação oocitária ainda é pouco conhecido. Sabe-se que as células da teca expressam receptores para LH (LHR), e a ligação hormônio/receptor estimula a síntese de substratos androgênicos desde a vida fetal até o final da vida reprodutiva de fêmeas mamíferas (ADASHI, 1994; GOUGEON, 1996). As células da granulosa adquirem seus próprios receptores para LH na fase final de desenvolvimento folicular sob influência do FSH (ERICKSON et al. 1979). Nesse estágio, o FSH e o LH agem sinergicamente para promover o desenvolvimento folicular, aumentando a atividade da aromatase, a produção de inibina, bem como preparando o folículo pré-ovulatório para o pico de LH (LEVY et al., 2000).

Ainda que receptores não-funcionais de LH tenham sido detectados em gônadas de roedores mesmo antes da formação folicular, o primeiro receptor funcional para LH (LHR) foi detectado em ovários de camundongas 5 dias após o nascimento (O'SHAUGHNESSY et al., 1997). Isto coincide com o período de diferenciação morfológica das células intersticiais da teca de folículos primários em crescimento e com a capacidade de expressão da esteroidogênese basal. O FSH e LH utilizados isoladamente têm demonstrado suportar o crescimento folicular *in vitro* (CORTVRINDT et al., 1998). Wu et al. (2000), realizando experimentos em camundongas, mostraram que o LH é necessário para o desenvolvimento *in vitro* de pequenos folículos pré-antrais. Outro estudo relatou que 70% dos folículos pré-antrais

alcançaram o estágio de metáfase II quando o cultivo foi realizado por 13 dias em meio contendo FSH e LH juntos (CORTVRINDT et al., 1998). O LH introduzido ao meio no sexto dia de cultivo, induziu a ovulação *in vitro* de folículos pré-antrais de camundongas cultivados por 5 dias na presença de FSH (BOLAND et al., 1993). Apesar da ação do LH ser direcionada para o estágio final da foliculogênese, sua ação conjunta com o FSH auxilia na proliferação e diferenciação celular, produção de estrógeno e posterior maturação (QVIST et al., 1990). Recentemente, Braw-Tal; Roth (2005) demonstraram a presença de receptores para LH na teca interna de folículos pré-antrais em estádios mais avançados e tais receptores estão diretamente relacionados à viabilidade folicular, sendo sua presença progressivamente reduzida com a atresia.

### **2.9.3 Hormônio do Crescimento (GH)**

O GH é uma glicoproteína sintetizada pelos somatotrofos no lobo anterior da hipófise e secretada na circulação para ligar-se aos receptores nos tecidos alvo com o objetivo de estimular o crescimento destes (HERRINGTON; CARTER-SU, 2001), desempenhando um papel vital no controle da função gonadal (CHANDRASHEKAR et al., 2004). Estudos têm sugerido que este hormônio desempenha um importante papel no crescimento folicular, ovulação e função luteal (BARNETT et al., 2006). Experimentos *in vivo* têm revelado que o GH atua promovendo o desenvolvimento de folículos ovarianos de bovinos (GONG et al., 1991), aumentando as concentrações periféricas de insulina e/ou IGF-I em novilhas (GONG et al., 1997) e reduzindo os níveis de apoptose em folículos pré-ovulatórios de roedores (DANILOVICH et al., 2000). Além disso, o GH age sobre as células da granulosa de ratas acelerando o processo de diferenciação das células foliculares em células luteínicas (HUTCHINSON et al., 1988).

Outros trabalhos com folículos pré-antrais de camundongas medindo 100-105 µm mostraram que o GH, na concentração de 1 mg/mL, aumentou o diâmetro folicular durante 4 dias de cultivo (LIU et al., 1998; KIKUCHI et al., 2001). Kobayashi et al. (2000), utilizando essa mesma concentração em seus experimentos com camundongas, mostraram que o GH promoveu a produção de estradiol, a secreção de inibina em cultivo e a proliferação das células da granulosa e da teca. Já em bovinos, a utilização de 100 ng/mL de GH adicionado de insulina aumentou a síntese de progesterona e a proliferação das células da granulosa cultivadas por 4 dias (LANGHOUT et al., 1991).

Estudos demonstraram que o RNAm para o receptor do GH é abundante no oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e pequenos antrais de ovelhas (ECKERY et al. 1997) bem como em células da granulosa de humanos (CARLSSON et al., 1992). Em ovários bovinos, o RNAm já foi localizado no oócito de folículos primordiais e primários e começa a ser expresso em células da granulosa de folículos primários permanecendo durante o estágio secundário (KOLLE et al., 1998).

Os efeitos do GH no ovário podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos indiretos estão relacionados à atuação do IGF-I, uma vez que o GH estimula no ovário a expressão gênica deste fator e que, por conseguinte, mediará os efeitos do GH (LIU et al., 1998), enquanto os efeitos diretos estão relacionados com a expressão de GH-R e suas proteínas ligantes (GHBP), já detectadas em ovários de humanos (SHARARA; NIEMAN, 1994).

Foi relatado que camundongas com deficiência na expressão para GH-R apresentaram redução na taxa de ovulação, no número de folículos antrais e ainda aumentaram o número de folículos atrésicos. Estes sinais não foram reversíveis após tratamento com IGF-I, sugerindo que o GH exerce um efeito direto no ovário (BACHELOT et al., 2002).

O efeito benéfico do GH na fertilidade de fêmeas pode ainda estar relacionado aos efeitos estimulatórios deste hormônio na cinética da maturação nuclear. Estudos têm demonstrado que oócitos bovinos tratados com GH completaram a meiose I de forma mais rápida, aumentaram a taxa de clivagem e melhoraram a taxa de formação de blastocisto em relação à oócitos não tratados (IZADYAR et al., 1997). Outro trabalho mostrou que o GH afeta a maturação do oócito e aumenta os receptores de gonadotrofinas auxiliando na foliculogênese/gametogênese (SIROTKIN; MAKAREVICH, 2002). A utilização do GH aumentou ainda a proporção de oócitos bovinos manifestando características de maturação citoplasmática e nuclear, evidenciando que o GH melhora a coordenação entre ambos os tipos de maturação do oócito (IZADYAR et al., 1997).

A interação entre o eixo somatotrófico com o eixo gonadotrófico é de grande importância também para o controle da maturação sexual (CHANDRASHEKAR et al. 2004). Dados obtidos de diferentes espécies indicam que em fêmeas essas ações incluem efeitos estimulatórios, sinérgicos ou permissivos do GH e IGF-I na liberação de GnRH a partir do hipotálamo (LACKEY et al., 1999) e de gonadotrofinas a partir da hipófise (KLEINBERG, 1998; CHANDRASHEKAR et al., 1999; CHANDRASHEKAR et al., 2001), nos níveis de receptores de gonadotrofinas nas células da granulosa foliculares (JIA et al., 1986) e no desenvolvimento de glândulas mamárias (BAUMAN; VERNON, 1996; KLEINBERG, 1998).

Os esteróides gonadais, por sua vez, promovem liberação de GH (BONDANELLI et al., 2003) que age em sinergismo para promover crescimento somático e maturação física que precede e acompanha o desenvolvimento da puberdade (CLARK; ROGOL, 1996; DELEMARRE et al., 2001). A influência do eixo somatotrófico no eixo gonadotrófico certamente representa um dos mecanismos que levam à maturação sexual e crescimento físico. Já as relações entre o eixo somatotrófico e o envelhecimento reprodutivo são complexas e a quantidade de informações pertinentes a este assunto é limitada. Sabe-se que níveis circulantes de GH e IGF-I declinam progressivamente durante o transcorrer da idade adulta (TOOGOOD; SHALET, 1998), contudo ainda não está claro se o resultado da somatopausa contribui para o declínio da função reprodutiva relacionado à idade. Por esta razão, o uso de GH em terapia de reposição hormonal em idosos é assunto de grande interesse, necessitando-se de mais estudos (CHANDRASHEKAR et al., 2004).

## **2.10 Importância dos fatores de crescimento no controle da foliculogênese**

Como mostrado anteriormente, o crescimento dos folículos presentes no ovário mamífero pode ser regulado tanto por gonadotrofinas como somatotrofinas. Além disso, inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos. A seguir serão descritos os efeitos do Fator de Crescimento de Diferenciação-9 (GDF-9), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I), Kit Ligand (KL), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Proteína Morfogenética Óssea (BMP-2, -4, -6, -7 e -15), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator de Crescimento Keratinócito (KGF), Neurotrofinas, Ativina e Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF).

### **2.10.1 Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9)**

O GDF-9, descoberto em 1993 (MCPHERRON; LEE, 1993), é uma proteína homodimérica secretada pelo oócito, pertencente à família de fatores de crescimento transformantes-TGF- $\beta$  (CHANG et al., 2002), que também inclui várias proteínas morfogênicas (BMPs) e ativinas (CHANG et al., 2002; JUENGEL JL; MCNATTY, 2005; YOSHINO et al., 2006). O fator de crescimento e diferenciação-9B (GDF-9B), conhecido como BMP-15, foi descoberto posteriormente (AALTONEN et al., 1999; DUBE et al., 1998; LAITINEN et al., 1998), e é também expresso pelo oócito, sendo considerado como um

potente regulador da função ovariana (BRAW-TAL et al., 1993; GALLOWAY et al., 2000; HANRAHAN et al., 2004; MONTGOMERY et al., 2001). A ação do GDF-9 é iniciada através da sua ligação aos receptores de membrana específicos dos tipos I e II com atividade serina-treonina quinase. O GDF-9 liga-se ao receptor de BMP tipo II (BMPRII) e em seguida ao receptor de ativina tipo kinase-5 (ALK5) propagando a sinalização através da ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família de SMADs conhecidas como *receptor-regulated SMADs* (R-SMADs), SMAD2 e SMAD3. A fosforilação de R-SMADs permite a sua interação com *common-mediator SMAD* (co-SMAD), SMAD4, formando um complexo capaz de atingir o núcleo, onde irão modular a transcrição de genes-alvos (MASSAGUÉ, 1998; SPICER et al., 2008).

Estudos evidenciaram que o GDF-9 promove o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca de ratas (NILSON; SKINNER, 2002), estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos (HREISSON et al., 2002). Além disso, exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais murinos (HAYASHI et al., 1999). Dong et al. (1996) mostraram que na ausência do GDF-9, não ocorre a formação de folículos secundários, levando conseqüentemente à degeneração dos oócitos inclusos em folículos primários. Hreisson et al. (2002) demonstraram que o GDF-9 na concentração de 200 ng/mL promove a sobrevivência e a progressão dos folículos ao estágio secundário após 7 dias de cultivo. Wang e Roy (2004) propuseram que o GDF-9 pode influenciar a expressão de fatores de crescimento folicular como o KL e que, durante 9 dias de cultivo, 10 ng/mL de GDF-9 estimula o crescimento de folículos primordiais e que ainda em altas doses (200 ng/mL) ocorre o aumento da proporção de folículos secundários de hamster. Em ratas, Orisaka et al. (2006) verificaram que a adição de 100 ng/ml de GDF-9 promove a viabilidade e o crescimento folicular durante a transição da fase pré-antral para fase antral inicial. Este mesmo autor mostrou que o GDF-9 protege as células da granulosa de folículos pré-antrais, mas não folículos antrais, contra a ação apoptótica induzida pelas ceramidas. Em outro trabalho, foi mostrado que a injeção diretamente nos ovários de fragmentos de gene que codifica para o GDF-9, a partir da biblioteca cDNA do GDF-9 suíno, promoveu a redução do número de folículos primordiais e o aumento concomitante do número de folículos primários, secundários e antrais iniciais (SHIMIZU et al., 2006). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a adição de 200 ng/ml de GDF-9 ao MEM<sup>+</sup>, durante 7 dias de cultivo, provoca a manutenção da sobrevivência folicular, o crescimento e o aumento do percentual de folículos secundários caprinos, mantendo a sua integridade ultra-estrutural (MARTINS et al.,

2008). O RNAm para o GDF-9 tem sido localizado em oócitos de ovários bovinos, ovinos (BODENSTEINER et al., 1999), caprinos (SILVA et al., 2005) e humanos (AALTONEN et al., 1999). A sua expressão em oócitos de folículos primordiais de ovelhas e cabras levantou a possibilidade de que o GDF-9 é essencial para a ativação de folículos primordiais e o seu subsequente desenvolvimento. Outros estudos demonstraram que o GDF-9 e os seus receptores estão expressos em todas as categorias foliculares em ovários da espécie caprina (SILVA et al., 2005).

O processo final da maturação oocitária depende também da sinalização entre o oócito e as células somáticas como também da expansão das células do cúmulus. Este processo é caracterizado pelo aumento da expressão de genes que controlam a síntese de hialuronidases e prostaglandinas (RICHARDS, 2005). Recentemente foi demonstrado que em camundongos a expansão do cúmulus requer simultaneamente a ativação das proteínas Smad 2/3 (DRAGOVIC et al., 2007) e da proteína kinase ativada por mitógenos (MAPK) (DIAZ et al., 2006). A identidade dos fatores que induzem a expansão das células do cúmulus não é completamente clara, mas evidências demonstram que a participação do GDF-9 e do GDF-9B é importante neste processo (DRAGOVIC et al., 2005; GUI; JOYCE, 2005; YOSHINO et al., 2006). Recentes estudos têm demonstrado que esses dois fatores promovem efeito benéfico na qualidade dos oócitos maturados *in vitro*. Em bovinos, a utilização de GDF-9 e GDF-9B aumentou a formação de blastocistos (HUSSEIN et al., 2006) e em camundongas, a adição de GDF-9 ao meio de cultura dobrou a taxa de sobrevivência fetal (YEO et al., 2008).

### **2.10.2 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I)**

A regulação do funcionamento ovariano em mamíferos envolve a participação de diferentes elementos que compõem o sistema de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), que inclui os fatores I e II (IGF-I e IGF-II); os receptores do tipo I e II (IGFR-I e IGFR-II) para os IGFs e as proteínas ligantes (transportadoras – IGFBPs) para esses fatores de crescimento (ADASHI et al., 1985; GIUDICE, 1992; LeROITH et al., 1995). A biodisponibilidade e conseqüentemente a ação dos IGFs é regulada em parte por uma superfamília de proteínas homólogas denominadas de IGFBPs, que ligam às IGFs com grande afinidade, designadas de IGFBP-1 até IGFBP-6 (RAJARAM et al., 1997).

O fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) é um polipeptídeo composto por 70 aminoácidos, estruturalmente e funcionalmente relacionado à insulina, conhecido por sua capacidade de promover o crescimento e a diferenciação celular. Embora

tradicionalmente visto como um produto hepático, o IGF-I pode ser sintetizado em diversos tecidos, nos quais exerce importantes funções autócrinas e parácrinas (DAUGHADAY; ROTWEIN, 1989). O IGF-I foi inicialmente denominado de somatomedina C e identificado como um mediador da ação do hormônio do crescimento (GH) ou somatotrofina (ST), que ativa rapidamente a transcrição do gene do IGF-I e também regula alterações na estrutura da cromatina dentro do gene do IGF-I, delineando desta forma um alvo dentro da cromatina para a ação do GH (THOMAS et al., 1994).

Conforme citado acima, o sistema IGF é composto por dois tipos de receptores, o receptor do tipo I, ou seja, IGFR-I, e o receptor do tipo II (IGFR-II) ou IGF-II/manose-6-fosfato (IGF-II/M6P) (ADASHI, 1998). O IGFR-I é uma proteína tipo tirosina quinase transmembranária que consiste de duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$  extracelular e possui uma expressiva homologia com o receptor da insulina (SILVA et al., 2009a; IZADYAR et al., 1998, LeROITH et al., 1995). As regiões ricas em cisteína das subunidades  $\alpha$  do receptor de insulina e do receptor do tipo I de IGF são 64-67% homólogas, enquanto que os domínios da tirosina quinase das subunidades  $\beta$  são 84% homólogas. Em adição ao IGF-I, o receptor do tipo I de IGF também pode ligar IGF-II e insulina, embora com uma afinidade menor, bem como parece interagir com as IGFBPs (MOHSENI-ZADEH; BINOUX, 1997). O IGFR-I é o principal mediador das ações semelhantes à somatomedina, tanto do IGF-I como do IGF-II (JONES; CLEMMONS, 1995; SILVA et al., 2009a). Os eventos após a ligação com o receptor do tipo I de IGF, similares aos do receptor da insulina, incluem a fosforilação da tirosina da subunidade  $\beta$  do receptor e das proteínas IRS (*“insulin receptor substrate”*), interações com a fosfoinositol-3 quinase e ativação da MAP-quinase (LeROITH et al., 1995).

As IGFBP estão presentes em todos os fluidos biológicos e atuam inibindo ou potencializando a ação dos dois tipos de IGF nas células alvo (MONGET et al., 2002). Existem dois grupos de IGFBP: (1) IGFBP-1, -2, -4, -5, -6 (24-35 kDa) e (2) IGFBP-3 (150kDa) que é a forma mais predominante no soro (MONGET et al., 2002; SILVA et al., 2008). Os níveis de IGFBP-2, -4 e -5 em ruminantes, diminuem e aumentam dramaticamente durante o crescimento folicular na fase terminal e atresia, respectivamente. Em particular, a expressão do RNAm da IGFBP-2 diminui durante o crescimento folicular em ovários de ovinos, bovinos e suínos e a expressão de RNAm da IGFBP-5 aumenta em células da granulosa de folículos atresícos de bovinos e ovinos. Há fortes evidências sugerindo que a alteração nos níveis de IGFBP é consequência de um aumento da degradação proteolítica das IGFBPs pela proteína plasmática associada à gestação (PAPP-A). A expressão do RNAm para a PAPP-A é restrita ao compartimento das células da granulosa e é positivamente



correlacionada com a expressão de aromatase e receptores de LH (MONGET et al., 2002).

Em ovários de suínos e roedores, o IGF-I tem sido localizado nas células da granulosa de folículos antrais saudáveis enquanto que o IGF-II foi encontrado nas células da granulosa de folículos saudáveis e atresícos (ZHOU et al., 1996). Em ovinos, ambos receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (MONGET et al., 1989). O IGF-I, adicionado durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, estimulou o crescimento folicular em humanos (LOUHIO et al., 2000), bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), ratos (ZHAO et al., 2001a) e camundongos (LIU et al., 1998) em sinergia com o FSH. Experimentos de Zhou e Zhang (2005) mostraram que o IGF-I na concentração de 100 ng/L proporcionou o crescimento e a viabilidade de oócitos inclusos em folículos pré-antrais caprinos. Em folículos pré-antrais bovinos, a utilização de 50 ng/ml de IGF-I, durante seis dias de cultivo, promoveu o aumento do diâmetro folicular bem como a produção de estradiol (THOMAS et al., 2007). Em suínos, a utilização dessa mesma concentração de IGF-I resultou no crescimento folicular, no estímulo da proliferação das células da granulosa e na prevenção da apoptose de folículos pré-antrais cultivados por 4 dias na presença de soro. Em camundongos, o IGF-I (10, 50 e 100 ng/mL) aumentou a esteroidogênese de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por 6, 10 e 12 dias (DEMEESTERE et al., 2004). Em ratos, o IGF-I (1-100 ng/ml) estimulou o desenvolvimento de folículos secundários comprovado pelo aumento significativo do diâmetro folicular e do conteúdo do DNA. A análise desses folículos através da microscopia eletrônica de transmissão mostrou retículo endoplasmático bem desenvolvido e mitocôndrias intactas nas células da granulosa. Além disso, foi observado que as microvilosidades entre o oócito e as células da granulosa e as junções gap entre as células foliculares também aumentaram quando estes folículos foram cultivados na presença de IGF-I, sugerindo que este fator de crescimento promove a manutenção da integridade funcional dos folículos (ZHAO et al., 2001a).

### **2.10.3 Kit ligand (KL)**

O KL, também denominado fator de células tronco (SCF) ou fator de crescimento multipotente, é um fator de crescimento que exerce influência nas células alvo através de sua ligação ao receptor tirosina-quinase, conhecido com c-kit (CARLSSON et al., 2006). Numerosos trabalhos têm mostrado que em ovários de roedoras o KL e c-kit são importantes para a migração, proliferação e sobrevivência de células germinativas primordiais (ZAMA et

al., 2005), ativação de folículos primordiais (PARROTT; SKINNER, 1999), crescimento e sobrevivência do oócito (JIN et al., 2005) e proliferação das células da granulosa (OTSUKA; SHIMASAKI, 2002). Em humanos já foi relatado que os oócitos em todos os estádios de desenvolvimento expressam RNAm para o c-kit e sua proteína (DONEDA et al., 2002). Em humanos, a proteína c-kit foi expressa em oócito de folículos primordiais, (HOYER, et al., 2005; ROBINSON, et al., 2001; STOOP, et al., 2005), primários e secundários (CARLSSON et al., 2006).

Similarmente, em camundongas as células da granulosa de folículos em todos os estádios de desenvolvimento expressam RNAm para o KL e sua proteína, embora a expressão seja muito baixa em células da granulosa de folículos primordiais (DONEDA et al., 2002). Em ovários de humanos adultos, o KL é expresso nas células da granulosa de folículos primários (CARLSSON et al., 2006). Em ovários fetais, as células da granulosa de folículos primordiais, primários, secundários e antrais iniciais também expressam KL (HOYER, et al., 2005). O fato de o KL ser derivado das células da granulosa e o c-kit ser expresso pelo oócito e células da teca, constitui excelente exemplo de como as interações parácrinas entre o oócito e as células somáticas controlam muitos aspectos da formação e desenvolvimento folicular. A utilização do KL no cultivo *in vitro* de ovários de ratas recém nascidas, por 5 ou 14 dias, aumentou a percentagem de folículos em crescimento, quando comparado ao meio controle (PARROTT; SKINNER, 1999), sugerindo um papel do KL na ativação de folículos primordiais. Tem sido demonstrado, também, que o KL exerce efeito anti-apoptótico nas células germinativas primordiais de camundongas (SAKATA et al., 2003) e nos oócitos de folículos primordiais e primários de camundongas (JIN, et al., 2005) e humanos (CARLSSON et al., 2006).

#### **2.10.4 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)**

O EGF é um fator pertencente à grande família EGF, a qual consiste de vários membros que atuam sobre o desenvolvimento folicular: TGF- $\alpha$ , HB-EGF, anfiregulina (AREG), betacelulina (BTC) e epiregulina (EREG) (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). A proteína EGF tem sido demonstrada no oócito e células da granulosa de folículos nos estádios iniciais e avançados (humano: BENNETT et al., 1996; hamster: ROY; GREENWALD, 1990; suíno: SINGH et al., 1995a), enquanto que o RNAm do EGF foi descrito somente no oócito e nas células da granulosa de folículos antrais suínos (SINGH et al., 1995a). A ação do EGF é mediada por um receptor de membrana, ErbB1, o qual é pertencente à superfamília ErbB

(RIESE; STERN, 1998). O receptor para o EGF é uma glicoproteína transmembranária (CARPENTER, 1999) e está localizado na membrana celular das células da granulosa em todos os estádios de desenvolvimento folicular, células intersticiais circundando pequenos folículos pré-antrais, células da teca e oócito de todos os estádios foliculares. A expressão da proteína para o receptor do EGF e o RNA mensageiro é regulada positivamente pelas gonadotrofinas e pelos esteróides (GARNETT et al., 2002) e têm sido localizada em oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais e também nas células luteais de porcas (SINGH et al., 1995b) e ratas (TEKPETEY et al., 1995). O EGF e seu receptor são expressos nos folículos ovarianos caprinos em todos os estádios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo e na superfície do epitélio ovariano (SILVA et al., 2006b).

Estudos mostraram que o EGF promove a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais (MORBECK et al., 1993), o aumento do diâmetro de folículos pré-antrais bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), hamsters (ROY, 1993), camundongos (BOLAND; GOSDEN, 1994) e humanos (ROY; KOLE, 1998), induz a transição de folículos suínos do estágio primário para secundário (MORBECK et al., 1993), reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* e promove a ativação de folículos primordiais ovinos e manutenção da viabilidade por até 6 dias de cultivo (ANDRADE et al., 2005). Quando testado em diferentes concentrações, o EGF (10 ng/mL) adicionado ao meio de cultivo de folículos pré-antrais suínos, inibiu a apoptose das células da granulosa e levou a um aumento da formação de antro (MAO et al., 2004). Já quando testado em caprinos, o EGF (50 ng/mL) mostrou um efeito estimulatório na viabilidade oocitária (ZHOU; ZHANG, 2005) e em concentração mais elevada (100 ng/mL), um efeito benéfico no crescimento de oócitos de folículos primários (SILVA et al., 2004a). Outros trabalhos com caprinos mostraram que a utilização de EGF (1 e 10 ng/ml) durante 7 dias de cultivo promoveu o aumento do percentual de folículos primários e a manutenção da viabilidade folicular similar ao controle não cultivado (CELESTINO et al., 2009).

Conforme citado anteriormente, outros fatores pertencentes à família EGF também agem sobre o desenvolvimento folicular. O TGF- $\alpha$ , cuja expressão já foi demonstrada nas células foliculares em todos os estádios (REEKA et al., 1998), promove a proliferação das células da granulosa e da teca em bovinos (SKINNER; COFFEY, 1988) e modula a expressão de receptores para o FSH (FINDLAY; DRUMOND, 1999). O HB-EGF, demonstrado em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais, é considerado um fator mitogênico destas células (PAN et al., 2004). A anfiregulina, betacelulina e epiregulina já foram expressas em células da granulosa de folículos em estágio terminal estimulando a

expansão das células do cúmulus e a maturação oocitária (PARK et al., 2004). A anfiregulina estimula a expressão de genes envolvidos na expansão das células do cúmulus (Ptgs2, Has2 Tnfaip6) e na regulação da esteroidogênese (StaR, Cyp11a1 e Pgr) (SHIMADA et al., 2006)

#### **2.10.5 Proteínas Morfogenéticas Ósseas -2, -4, -6 e -7 (BMP-2, -4, -6, -7)**

Várias BMPs, BMP -2, -4, -6 e -7, localizadas nos ovários, estão relacionadas à foliculogênese ovariana, sendo a maioria das pesquisas realizadas em roedores. A expressão da BMP-2 tem sido observada em células tecaais de folículos antrais bovinos e, ocasionalmente, em oócitos (FATEHI et al., 2005). A BMP-4, expressa pelas células pré tecaais e tecaais, promove a transição de folículos primordiais para primário em ratas (LEE et al., 2001) e mantém a viabilidade folicular prevenindo a apoptose nesta espécie (NILSSON; SKINNER, 2003). Além disso, aumenta a sensibilidade das células da granulosa ao estímulo do FSH e inibe a síntese de progesterona, também, em ratas (SHIMASAKI et al., 1999).

A BMP-6 é produzida por oócitos, células da granulosa e da teca em várias espécies: murinos (ERICKSON; SHIMASAKI, 2003), bovinos (GLISTER et al., 2004) e ovinos (JUENGEL; MCNATTY, 2005). Já a BMP-7 é produzida pelas células da teca de folículos secundários e antrais (SHIMASAKI et al., 2004). Para exercer suas funções biológicas, as BMP-6 ou -7 interagem com dois tipos de receptores presentes na superfície celular (MASSAGUÉ; CHEN, 2000). Inicialmente, as BMPs ligam-se aos receptores do tipo I, ou seja, com o receptor de ativina-IA ou receptor de BMP-IB. Após a ativação do receptor do tipo I, ocorre o recrutamento do receptor do tipo II, ou seja, receptores de ativina-IIA ou IIB, ou receptores de BMP-II. A interação entre os receptores induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (*SMADS*) que são deslocados para o núcleo para regular a expressão de genes específicos (MASSAGUÉ, 2000). Em camundongas, também já foi relatada a expressão destes receptores em folículos ovarianos (SHIMASAKI et al., 2004).

Estudos *in vitro* para avaliar o efeito da BMP-6 sobre o crescimento folicular foram realizados principalmente na espécie murina (OTSUKA et al., 2001). Durante o cultivo de células da granulosa de folículos antrais de camundongas, foi demonstrado que a BMP-6 inibe a síntese de progesterona induzida pelo FSH, por meio da inibição de enzimas esteroidogênicas. A BMP-6 não altera a produção de estradiol e não influencia a proliferação das células da granulosa em camundongas (OTSUKA et al., 2001), mas promove viabilidade celular e aumenta a produção de inibina-A, ativina-A e folistatina em células da granulosa de bovinos (GLISTER et al., 2004).

Com relação à BMP-7, Lee et al. (2001) injetaram-na no interior da bolsa ovariana de ratas e em seguida caracterizaram as alterações na foliculogênese, ovulação e esteroidogênese. Estes autores demonstraram que a BMP-7 reduziu o número de folículos primordiais e aumentou o número de folículos primários, secundários e antrais, indicando que a BMP-7 promove a ativação dos folículos primordiais e o posterior crescimento folicular. Além disso, a administração da BMP-7 promoveu mitose nas células da granulosa e inibiu a produção de progesterona. Estudos *in vitro*, também demonstraram que a BMP-7 promoveu a ativação e crescimento de folículos primordiais, bem como aumentou a expressão de receptores para FSH durante o cultivo de ovários de camundongas (LEE et al., 2004). Além disso, durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa de ratas, foi observado que a BMP-7 modulou a ação do FSH no sentido de aumentar a produção de estradiol e inibir a síntese de progesterona (SHIMASAKI et al., 1999). É bem estabelecido que as células da granulosa de folículos em crescimento respondem ao estímulo do FSH *in vivo*, produzindo estradiol. Já a produção de progesterona foi observada somente no estágio de folículo pré-ovulatório. Entretanto, quando as células da granulosa são cultivadas *in vitro*, observou-se aumento na produção tanto de estradiol como de progesterona em resposta ao estímulo do FSH. Isto sugere que um inibidor da síntese de progesterona, ou seja, um inibidor da luteinização, deve estar atuando *in vivo* (SHIMASAKI et al., 2004). A BMP-7 foi um dos primeiros fatores identificado com ação biológica que promove a inibição da luteinização em células da granulosa (SHIMASAKI et al., 1999). Para entender como a BMP-7 regula a ação do FSH em células da granulosa, foi demonstrado que a BMP-7 aumentou a expressão da enzima P450 aromatase, favorecendo a produção de estradiol (LEE et al., 2001).

#### **2.10.6 Proteína Morfogenética Óssea (BMP-15)**

Como citado anteriormente, a BMP-15, também conhecida como fator de crescimento de diferenciação-9B (GDF-9B), é um dos membros da superfamília do TGF $\beta$ . Já foram identificados três tipos de receptores para as BMPs: receptores BMP tipo IA, tipo IB e II. Em algumas espécies já estudadas, como roedores, ovinos e em humanos, a BMP-15 mostrou estar expressa principalmente no oócito de folículos primários avançados (FINDLAY et al., 2002). Já para a espécie caprina, a proteína BMP-15 foi encontrada nos oócitos de todos os tipos de folículos e células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais, mas não em folículos primordiais. Os RNAs para BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II

foram detectados nos folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e células da granulosa de folículos antrais (SILVA et al., 2005).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a BMP-15 promoveu a proliferação das células da granulosa e estimulou o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores, ou seja, é um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (FORTUNE, 2003; OTSUKA et al., 2000; NILSSON; SKINNER, 2002). Em células da granulosa de ratas, foi mostrado que o BMP-15 recombinante estimulou a proliferação independente do FSH, mas diminuiu os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona sem afetar a produção de estradiol (OTSUKA et al., 2000). O BMP-15 é capaz de inibir a expressão do receptor de FSH (OTSUKA et al., 2001) e estimular a expressão do KL nas células da granulosa de ratas (OTSUKA; SHIMASAKI, 2002), além de estimular a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do cumulus de camundongas (YOSHINO et al., 2006). A BMP-15 tem um papel essencial nos estádios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário) promovendo proliferação das células da granulosa (DONG et al., 1996).

#### **2.10.7 Fator de Crescimento Fibroblástico básico (FGF-2)**

Vários tipos de FGF também exercem influência sobre o desenvolvimento dos folículos ovarianos, sendo o FGF-2 (FGF básico) o fator investigado de forma mais extensiva. Em ovários bovinos, o FGF-2 foi localizado nos oócitos de folículos primordiais e primários e em células da granulosa e da teca de folículos pré-antrais em crescimento e antrais (VAN WEZEL et al., 1995). Estudos mostraram que os receptores para FGF-2 estão principalmente localizados na camada das células da granulosa (WANDJI et al., 1992). O FGF-2 é importante na regulação de várias funções ovarianas, tais como: mitose (ROBERTS; ELLIS, 1999), esteroidogênese (VERNON; SPICER, 1994), diferenciação (ANDERSON; LEE, 1993) e apoptose (TILLY et al., 1992) das células da granulosa. Em gatas, a adição de 10 ng/mL de FGF-2 ao meio de cultivo aumentou a proliferação das células da granulosa de pequenos folículos pré-antrais (40–90  $\mu$ m) (JEWGENOW, 1996). O FGF-2 também se mostrou eficiente na ativação e crescimento de folículos primordiais e primários de ratas (NILSSON et al., 2001). Recentemente, Nilsson e Skinner (2004) mostraram que o FGF-2 e o KL são necessários para promover a ativação de folículos primordiais de ratas (NILSSON et al., 2004). Nuttinck et al. (1996) relataram que, em 48 h de cultivo, o FGF-2 (10, 50 ou 100 ng/mL) aumentou a multiplicação das células da granulosa em pequenos folículos pré-antrais

bovinos na ausência de FSH, atenuando a degeneração oocitária causada por esse hormônio. Em contraste, após 6 dias de cultivo *in vitro*, o FSH (100 ng/mL) e FGF-2 (50 ng/mL) apresentaram efeitos similares, ambos aumentando o diâmetro folicular e a multiplicação das células da granulosa bovinas (WANDJI et al., 1996). Já em caprinos, Matos et al. (2006) mostraram que a utilização de 50 ng/mL durante 5 dias de cultivo promoveu o aumento do diâmetro de oócitos e de folículos pré-antrais.

Outro membro desta família potencialmente interessante é o FGF-8. Em ovários de camundongas, a expressão gênica deste fator mostrou-se restrita ao oócito (VALVE et al., 1997), sugerindo a sua participação na sinalização às células foliculares a partir do oócito. Recentemente, a expressão gênica do FGF-8 e receptores tipo FGFR-3c e 4 foi detectada em *pools* de folículos primordiais, primários e secundários obtidos a partir de ovários fetais de bovinos (BURATINI et al., 2005).

#### **2.10.8 Fator de Crescimento do Queratinócito (KGF)**

O KGF, considerado também um fator de crescimento fibroblástico (FGF-7), é uma proteína de 28 kDa produzida pelas células mesenquimais que estimula as mitoses das células epiteliais (FINCH et al., 1989) que atuam através de seus receptores do tipo FGFR-2. Estudo prévio têm documentado que o KGF é produzido pelas células da teca de folículos antrais e influencia o crescimento das células da granulosa (PARROT; SKINNER, 1998). Outros trabalhos demonstraram que este fator estimulou a transição de folículos primordiais para primário, pois quando os ovários de ratas de 4 dias de idade foram cultivados na presença de 50 ng/mL houve um aumento na transição dos folículos primordiais para estágio subsequente (SKINNER, 2005).

#### **2.10.9 Neurotrofinas**

Existem fortes evidências de que neurotrofinas como o fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e neurotrofinas 3 e 4 exercem funções nos estádios iniciais do desenvolvimento folicular. Os RNAs que codificam esses fatores e seus receptores (p75 NGFR, trkA e trkB) estão presentes durante a formação e crescimento de folículos pré-antrais (OJEDA et al., 2000). Uma deficiência de neurotrofinas 3 e 4 e BDNF promoveu redução significativa do número de folículos pré-antrais (OJEDA et

al., 1999). Entre as neurotrofinas, o Peptídeo Intestinal Vaso Ativo (VIP), abordado a seguir, é também um iniciador potencial do crescimento folicular.

O VIP, um neuropeptídeo encontrado primeiramente no duodeno de suínos (HULSHOF et al., 1994), contém 28 aminoácidos e é membro da mesma família à qual também pertencem a secretina, o glucagon, a gastrina e o Polipeptídeo Ativador da Adenilato-ciclase Pituitária (PACAP) (PEDRO, 2003). O VIP age em suas células alvo através de três tipos diferentes de receptor: PAC<sub>1</sub>-R, VPAC<sub>1</sub>-R e VPAC<sub>2</sub>-R e tem sido encontrado em vários órgãos e tecidos periféricos como o pulmão, testículos, adrenais e ovário (ARIMURA, 1992). Além disso, o VIP já foi identificado em fibras nervosas de folículos ovarianos de roedores (AHMED et al., 1986), bovinos (HULSHOF et al., 1994) e aves (JOHNSON et al., 1994). Estudos têm demonstrado que o VIP está envolvido na regulação da esteroidogênese (ZHONG; KASSON, 1994), promove o acúmulo de AMPc (HEINDEL et al., 1996), estimula a produção do ativador do plasminogênio (APA et al., 2002) e a maturação oocitária (APA et al., 1997) e promove a sobrevivência das células da granulosa por inibir a apoptose (LEE et al., 1999).

### **2.10.10 Ativina**

A ativina é composta de duas sub-unidades de inibina- $\beta$ , a  $\beta_A$  e/ou  $\beta_B$ , que combinam-se para formar a ativina A, B ou AB (FORTUNE, 2003). Em ovários de ratas (ZHAO et al., 2001b) e bovinos (HULSHOF et al., 1997), a ativina A e seus receptores tipo II (ActRII) foram detectados tanto no oócito como nas células da granulosa de folículos primordiais. Em ovários de humanos, a ativina A foi localizada imunohistoquimicamente nas camadas das células da granulosa de folículos primários e secundários, bem como nas células da granulosa e do cúmulus de folículos terciários (RABINOVICI et al., 1992) e as três sub-unidades de inibina foram detectadas em folículos primários e secundários de macacas Rhesus (RABINOVICI; JAFFE, 1990). Trabalhos de Silva et al. (2006a) mostraram que a ativina-A é capaz de promover a manutenção da viabilidade folicular e estimular o crescimento de folículos inclusos em tecido ovariano de caprinos bem como de folículos primários isolados.

Outras pesquisas demonstraram que a ativina-A estimulou o crescimento de folículos pré-antrais de bovinos (HULSHOF et al., 1997) e de camundongos quando associado ao FSH (LIU et al., 1998). Além disso, Li et al. (1995) revelaram que esta substância aumentou o número de células da granulosa demonstrado pela incorporação de timidina [<sup>3</sup>H] em folículos pré-antrais de ratas de 14 dias de idade.



Também foi observado *in vitro* que a ativina-A estimula a maturação meiótica de oócitos em humanos (ALAK, et al., 1998), ratos (ITOH, et al., 1990; SADATSUKI, et al., 1993) e macacos (ALAK, et al., 1996). A ativina-A também exerce efeito anti-luteinizante pelo aumento da atividade da aromatase e supressão da síntese de progesterona em diferentes espécies (camudongos: SMITZ, et al., 1998; bovinos: SHUKOVSKI, et al., 1993; primatas: MIRO; HILLIER, 1992).

A ativina é regulada pela folistatina que é uma cadeia polipeptídica não relacionada a superfamília TGF- $\beta$ . Esta proteína é sintetizada pelas células da granulosa e tem a capacidade de se ligar à subunidade  $\beta$  e por meio disso inibir irreversivelmente a atividade da ativina (SHINTANI, et al., 1997).

#### **2.10.11 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)**

O VEGF é um dos fatores responsáveis pela angiogênese folicular, pois ele atua estimulando a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (REDMER; REYNOLDS, 1996). Em folículos ovarianos, o VEGF é produzido pelas células da teca e células da granulosa (YAMAMOTO et al., 1997), e seus receptores, Flk-1 e Flk-1 /KDR, também são expressos nesses mesmos locais. Tem-se verificado que as gonadotrofinas estimulam a produção de VEGF pelas células da granulosa de folículos ovarianos de ratas (KOOS et al., 1995). Além de promover angiogênese, alguns estudos verificaram que o VEGF tem um efeito mitogênico direto nas células da granulosa e age no crescimento folicular de ovários de ratas (OTANI et al., 1999). Pesquisas mostraram que a administração de 500 ng/mL de VEGF, diretamente em ovários de ratas, aumentou significativamente, após 48 horas, a proporção de folículos primários e secundários pequenos (DANFORTH et al., 2001). Verificou-se também que a injeção direta de 2  $\mu$ g/mL em ovários de camundongas aumenta o crescimento vascular, promove o desenvolvimento folicular e diminui a apoptose no folículo (QUINTANA et al., 2004). Estudos demonstraram que o cultivo *in vitro* somente de células da granulosa de ratas, durante 24 horas com 50 ng/mL VEGF, antes da criopreservação, reduz os danos destas células, inibindo a apoptose (SO-YOUNG et al., 2006). Utilizando a técnica de microarranjos, observou-se que, durante a transição de folículos primordiais para folículos primários em ovários de ratas, houve alteração na expressão de genes que codificam RNA-m para VEGF e aumento da expressão da própria proteína, sendo tal fato confirmado pela técnica de PCR (KEZELE et al., 2005). Em caprinos,

análises imunohistoquímicas demonstraram a expressão de VEGFR-2 em oócitos e células da granulosa em todos os estádios foliculares, exceto nas células da granulosa de folículos primordiais. Neste trabalho ainda, a utilização de 200 ng/ml de VEGF promoveu a integridade ultra-estrutural dos folículos pré-antrais cultivados *in situ* durante 7 dias (BRUNO et al., 2009).

## **2.11 Técnicas para o estudo da foliculogênese**

Para maximizar o potencial reprodutivo de animais domésticos geneticamente superiores ou em extinção, bem como o tratamento da infertilidade em humanos, faz-se necessário a elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese inicial através da utilização de folículos ovarianos pré-antrais como doadores de oócito (FORTUNE, 2003). Dessa forma, com o intuito de evitar a vasta perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, têm sido desenvolvidos, nas últimas décadas, sistemas de cultivo *in vitro* que possibilitam o estudo dos fatores envolvidos na foliculogênese e na atresia folicular. A sessão seguinte aborda uma das principais técnicas empregadas para este fim.

### **2.11.1 Cultivo *in vitro***

Conforme exposto anteriormente, uma quantidade mínima (cerca de 0,1%) dos oócitos inclusos em folículos pré-antrais irá ovular e, conseqüentemente, ter alguma possibilidade de ser fecundado. Em virtude desta grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, e na tentativa de utilizar de maneira eficiente o potencial de gametas femininos no futuro, vem sendo desenvolvida a biotécnica de MOIFOPA.

Esta biotécnica visa a recuperação de um grande número de oócitos inclusos nos folículos pré-antrais (FOPA) e cultivo *in vitro* até sua completa maturação, prevenindo a atresia, através da utilização de diferentes substâncias (hormônios, fatores de crescimento, antioxidantes, etc.) no meio cultivo. A etapa da MOIFOPA referente ao cultivo *in vitro* é denominada ovário artificial. Além disso, a MOIFOPA-Ovário Artificial representa uma alternativa para o fornecimento de uma população homogênea de oócitos viáveis, oriundos de FOPAs para as biotécnicas de fecundação *in vitro* e clonagem (TELFER, 1996), contribuindo assim para a produção *in vitro* de embriões em larga escala.

Para promover o desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais *in vitro* é necessário o estabelecimento de um sistema de cultivo ideal para cada etapa do

desenvolvimento folicular. O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma técnica que vem sendo largamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, 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 (ovário artificial). Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados são dependentes do tipo de meio, sistema de cultivo utilizado e da espécie animal empregada para os estudos (EPPIG; SCHOEDER, 1989, BOLAND et al., 1994, FORTUNE, 2003).

Diferentes sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos visando estudar os fatores que controlam a foliculogênese, bem como promover o crescimento e a maturação oocitária associado com a multiplicação e diferenciação das células da granulosa (HARTSHORNE, 1997). 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) obtiveram grande sucesso com a ativação de folículos primordiais *in vitro* e este modelo tem sido utilizado por diferentes grupos de pesquisadores. Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível utilizar este modelo. Para estes animais, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos primários caprinos (SILVA et al., 2004a), bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), babuínos (WANDJI et al., 1997) e humanos (HOVATTA et al., 1997). O cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano tem a vantagem de manter o contato celular e facilitar a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1996). Apesar do cultivo *in situ* proporcionar a manutenção da integridade tridimensional dos folículos e a interação destes com células do estroma, o cultivo de folículos isolados é atualmente o mais utilizado, já que permite o monitoramento individual dos folículos durante todo o período de cultivo (ABIR et al., 2001).

Com relação aos avanços obtidos com o cultivo folicular, foi verificada a formação de antro após o cultivo *in vitro* de folículos secundários (150 µm) de bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), ovinos (CECCONI et al., 1999) e caprinos (SILVA et al., 2009b). Para suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO et al., 1994). Os melhores resultados do cultivo folicular foram obtidos em roedores, sendo observada a obtenção de crias viáveis a partir do cultivo de oócitos provenientes de folículos pré-antrais de camundongas, nos quais o oócito adquiriu competência para maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (EPPIG;

SCHROEDER, 1989). Tal crescimento foi obtido através de dois sistemas de cultivo: (1) cultivo de ovários inteiros para obtenção da transição de folículo primordial para primário e (2) isolamento e posterior cultivo de folículos primários e secundários. Recentemente, Gupta et al. (2008) produziram embriões bubalinos a partir da fecundação de oócitos derivados de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Diante dessas informações, fica evidente o potencial da aplicação desta biotécnica nas diferentes espécies de mamíferos.

Para melhor compreender o papel de hormônios e fatores de crescimento em ovários mamíferos, além do cultivo *in vitro*, é importante quantificar e identificar o local de produção de cada substância envolvida nas diferentes etapas do desenvolvimento folicular. Atualmente diferentes técnicas podem ser empregadas para análise da expressão de proteínas e receptores envolvidos na foliculogênese antes e depois do cultivo, constituindo um importante instrumento de estudo da foliculogênese.

### **2.11.2 Ferramentas para avaliação da expressão de proteínas e RNA em folículos ovarianos**

#### **2.11.2.1 Imunohistoquímica**

A imunohistoquímica representa um conjunto de procedimentos diagnósticos que utilizam anticorpos (policlonais ou monoclonais) como reagentes de grande especificidade para a detecção de antígenos que marcam estruturas em cortes histológicos ou em células cultivadas. Esta técnica tem permitido a identificação de diferentes tipos de proteínas (enzimas, receptores e produtos de genes), que estão relacionados ao comportamento biológico das células. Esta técnica vem sendo utilizada com frequência para avaliar a expressão de fatores de crescimento e hormônios, bem como seus receptores, presentes nos ovários, além de ser utilizada também para verificar a proliferação das células da granulosa (ABIR et al., 2006).

#### **2.11.2.2 Biologia Molecular**

O estudo da expressão gênica (análise de proteínas, DNA, RNAm) de diversas substâncias (ligantes e seus receptores) auxilia a compreensão do papel de hormônios e fatores de crescimento em cada fase do desenvolvimento folicular, uma vez que possibilita identificar a localização e o quanto cada uma das substâncias presentes no ovário estão sendo

produzidas. Muitas atuações das células foliculares ovarianas relacionadas à sobrevivência, ao crescimento e à diferenciação, são refletidas 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 et al. 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. A técnica mais utilizada para quantificar a expressão de RNAm é a RT-PCR em tempo real (Reação em Cadeia de Polimerase-Transcriptase Reversa em tempo real) (KREUZER; MASSEY, 2002). 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. A reação de PCR em tempo real, uma variante da PCR convencional, permite uma análise precisa da quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. O PCR em tempo real possui a habilidade de medir os produtos em tempo real (real-time PCR), ou conforme estão acumulando, sendo um detector confiável medindo a quantidade de produto de PCR em um ponto no qual a reação ainda se encontra na fase exponencial. Somente a fase exponencial do PCR pode ser utilizada para determinar a quantidade de cópias iniciais. Durante esta fase, um limiar do sinal de fluorescência é determinado, onde todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar é calculado como função da quantidade de ruído (background) de fluorescência e é plotado exatamente onde o sinal gerado pela amostra é significativamente maior que a fluorescência de ruído. Portanto, o número fracional de ciclos de PCR necessários para gerar sinal fluorescente suficiente para alcançar este limiar é definido como o limiar do ciclo (cycle threshold-Ct). Estes valores Ct são diretamente proporcionais à quantidade de cópias iniciais e são a base para calcular níveis de expressão de RNAm e medidas de números de cópias de 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). Diante do exposto, as técnicas de PCR em tempo real são ferramentas fundamentais para o estudo detalhado do complexo e misterioso processo da foliculogênese.

### **2.11.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

O microscópio eletrônico de transmissão é um sistema de produção de imagens de altíssima resolução (0,1 nm) que se baseia na interação de elétrons com átomos presentes nos componentes teciduais (JUNQUEIRA, 2004).

Os estudos morfológicos utilizando microscopia eletrônica têm sido muito aplicados na avaliação do desenvolvimento e na análise da viabilidade de folículos pré-antrais *in vitro* em diferentes espécies de mamíferos, sendo indispensáveis para identificar oócitos intactos e determinar a qualidade das CGs (MARTINS et al., 2008; CELESTINO et al., 2009; FAIR et al., 1996; LUCCI et al., 2001). Ademais, a microscopia eletrônica de transmissão é considerada uma boa técnica para avaliação das organelas celulares e das mudanças ultra-estruturais (SALEHNIA et al., 2002) ocorridas durante a atresia folicular, sendo, portanto, um método mais preciso e eficiente do que a histologia clássica para avaliar os folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro*.

#### **2.11.4 Manipulação genética de animais (Transgenia)**

Outra técnica, que vem sendo empregada com sucesso, é a utilização de camundongas geneticamente modificadas. Os modelos empregados incluem nocaute espontâneo ou artificial de genes que codificam hormônios, fatores de crescimento e seus receptores, ou produção de camundongas transgênicas com super-expressão de receptores ou proteínas, que leva ao aumento supra fisiológico dos níveis de determinada substância nestes animais (HUHTANIEMI et al., 2006). Alguns destes genes afetam diretamente os mecanismos que regulam o ovário, enquanto outros têm efeito indireto. Através deste modelo, pode-se observar o desenvolvimento das gônadas e conseqüentemente dos folículos e do ciclo reprodutivo destes animais na ausência total de um determinado fator, ou ainda o efeito de uma super-expressão do mesmo, em cada fase de desenvolvimento como diferenciação ovariana, formação de folículos primordiais, crescimento folicular, atresia, ovulação e formação de corpo lúteo (BARNETT et al., 2006).

Apesar deste ser um dos modelos mais completos, a utilização de animais transgênicos para estudo da foliculogênese possui várias limitações, como elevado custo, necessidade de equipamentos e técnicos altamente qualificados, além de um refinamento dos métodos de mutagênese. Além disso, a manipulação genética de seres vivos traz, ao lado dos benefícios, alguns riscos potenciais, nem sempre percebidos com facilidade, o que levanta problemas éticos.

### 3 JUSTIFICATIVA

A espécie caprina com sua rusticidade e adaptabilidade tem um papel social bastante importante nas populações de baixa renda da região nordeste brasileira. A exploração desta atividade é responsável pelo fornecimento de pele, carne e leite de ótima qualidade nutricional, o que garante a sustentabilidade de diversas famílias nordestinas e promove a fixação do homem no campo.

Frente a esta importância, diversas biotécnicas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos. Dentre estas biotécnicas destaca-se a MOIFOPA, cujo objetivo é otimizar a utilização do potencial oocitário das fêmeas.

Desta forma, sabendo-se que os folículos primordiais constituem o pool de reserva de folículos quiescentes e compreendem cerca de 95% de toda população folicular do ovário mamífero, e sabendo-se ainda que tais folículos necessitam ser ativados para que entrem em fase de crescimento, é de fundamental importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo de base capaz de ativar esses folículos e promover seu posterior crescimento *in vitro*. O desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente, além de possibilitar o fornecimento de um grande número de oócitos para subsidiar outras biotécnicas, possibilitará a melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral.

Diversas pesquisas delineadas tiveram como meta investigar o efeito de vários componentes no cultivo de folículos pré-antrais tanto de animais de laboratórios como de animais domésticos como, por exemplo, vaca, cabra e ovelha. Conforme abordado na revisão de literatura, o GDF-9 é extremamente importante para a formação de folículos secundários em hamster e humanos além de ser crucial para promover a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais em diferentes espécies. Com relação ao IGF-I, cujo RNAm já foi expresso em células da granulosa de suínos e roedores, foi evidenciado que esta substância estimula a esteroidogênese em folículos pré-antrais de camundongas, age como fator de sobrevivência e promove o desenvolvimento de folículos pré-antrais de humanos, caprinos, bovinos, suínos, roedores e murinos. Outros estudos mostraram que o RNAm para o receptor do GH está presente em folículos pré-antrais de humanos, ovinos e bovinos. Além disso, em roedores, murinos e bovinos o GH desempenha importante função no desenvolvimento de folículos pré-antrais.

Apesar dos diversos estudos realizados, a expressão de IGF-I, GH-R e seus respectivos RNAm em ovários caprinos, bem como os efeitos de diferentes concentrações de GDF-9, IGF-I, GH isoladamente ou em associação após 7 dias de cultivo sobre

desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos ainda não foram verificados.

Para determinar a qualidade de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* e, conseqüentemente, melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivo testados, é de fundamental importância empregar, além dos procedimentos de histologia clássica, a microscopia eletrônica de transmissão e de fluorescência.

Vale salientar que a utilização de técnicas de imunohistoquímica e biologia molecular, com intuito de se conhecer a expressão gênica de substâncias reguladoras da foliculogênese, nos permitirão estabelecer estratégias para adição de componentes em momentos ideais do cultivo.

No futuro, será possível a utilização dos oócitos, oriundos de uma numerosa população de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*, em programas de fecundação *in vitro*, clonagem e transferência de embriões, contribuindo a longo prazo para a multiplicação de animais de excelente valor zootécnico e aqueles em via de extinção. Além disso, o êxito destas pesquisas poderá contribuir de maneira significativa para melhorar as taxas de sucesso dos tratamentos de infertilidade humana.



#### **4. HIPÓTESE CIENTÍFICA**

Diante do exposto, formularam-se as seguintes hipóteses:

- 1) A expressão de IGF-I (ligante) e GH (receptor) variam de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular.
- 2) As substâncias GDF-9, IGF-I e GH afetam o cultivo *in vitro* de FOPA caprinos de forma concentração dependente.
- 3) A associação do GDF-9, IGF-I e GH influenciam positivamente o desenvolvimento *in vitro* de FOPA caprinos.

## 5 OBJETIVOS

Esta tese foi dividida em quatro capítulos e os objetivos gerais e específicos são descritos abaixo.

### 5.1 Objetivo geral

- 1) Avaliar o efeito do GDF-9, IGF-I e GH, isoladamente ou em diferentes associações, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.
- 2) Verificar a expressão do RNA mensageiro e da proteína para o IGF-I e GH-R em folículos ovarianos caprinos.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar os efeitos do GDF-9 sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento de folículos primordiais caprinos durante o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano por 1 ou 7 dias.
- 2) Investigar nos compartimentos foliculares (oócitos, células da granulosa ou da teca) a expressão do RNAm e da proteína para o IGF-I em ovários caprinos, bem como avaliar os efeitos do IGF-I sobre a viabilidade, a ativação e o crescimento de folículos primordiais caprinos durante o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano por 1 ou 7 dias.
- 3) Investigar nos compartimentos foliculares (oócitos, células da granulosa ou da teca) a expressão do RNA mensageiro e da proteína para o receptor do GH em ovários caprinos, bem como avaliar os efeitos do GH sobre a viabilidade, a ativação e o crescimento de folículos primordiais caprinos durante o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano por 1 ou 7 dias.
- 4) Verificar o efeito da associação entre GDF-9, IGF-I e GH, nas melhores concentrações observadas nos experimentos anteriores, sobre a viabilidade, a ativação e o crescimento *in*

*vitro* de folículos primordiais caprinos após 1 ou 7 dias de cultivo.

Nas páginas seguintes, serão apresentados os resultados desta tese na forma de quatro capítulos referentes a quatro artigos científicos. Vale salientar que um artigo já foi publicado em periódico incluso no Qualis CAPES categoria “A1” e três encontram-se em fase de julgamento. Além disso, segue no apêndice um artigo, já publicado em periódico incluso no Qualis CAPES categoria “B3”, oriundo da revisão de literatura deste trabalho.

## **6. CAPÍTULO 1**

**Fator de Crescimento e Diferenciação 9 estimula a ativação de folículos primordiais caprinos *in vitro* e a progressão para folículos secundários**

## Resumo

O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) sobre a sobrevivência e a ativação de folículos pré-antrais, bem como a subsequente progressão ao estágio de folículo secundário. Para tanto, fragmentos de córtex ovariano foram cultivados por 1 e 7 dias em Meio Essencial Mínimo (MEM) na ausência ou presença de GDF-9 em diferentes concentrações (1 – 200 ng/ml). No dia 0 e após 1 e 7 dias de cultivo, os fragmentos foram fixados para análise histológica e microscopia eletrônica de transmissão. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o seu estágio de desenvolvimento (primordial, intermediário, primário e secundário) e suas características morfológicas (normais ou degenerados). Além disso, o diâmetro folicular e oocitário foram determinados antes e após o cultivo. Os resultados mostraram que, comparado ao tecido não cultivado (Dia 0), houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do percentual de folículos normais em todos os meios testados, exceto quando utilizado GDF-9 na concentração de 200 ng/ml. Além disso, em todos os meios testados houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do percentual de folículos primordiais diante de um concomitante aumento do percentual de folículos em desenvolvimento. O maior percentual de folículos secundários foi observado, após 7 dias de cultivo, em MEM adicionado de 200 ng/ml de GDF-9. Em todas as concentrações testadas houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do diâmetro folicular após 7 dias de cultivo quando comparado ao tecido não-cultivado. Concluindo, os resultados do presente estudo mostraram que a utilização de 200 ng/ml de GDF-9 promove a manutenção da sobrevivência folicular e a ativação dos folículos primordiais. Além disso, o GDF-9 estimula a transição de folículos primários para folículos secundários, mantendo a sua integridade ultra-estrutural.

Palavras-chave: Cultivo, GDF-9, folículos pré-antrais.

## **Growth and Differentiation Factor-9 Stimulates Goat Primordial Follicles Activation *In vitro* and the Progression to Secondary Follicles**

F.S. Martins<sup>A</sup>, J.J.H. Celestino<sup>A</sup>, M.V. A. Saraiva<sup>A</sup>, M.H.T. Matos<sup>A</sup>, J.B. Bruno<sup>A</sup>, C.M.C. Rocha-Junior<sup>B</sup>, I.B. Lima-Verde<sup>A</sup>, C.M. Lucci<sup>B</sup>, S. N. Bão<sup>C</sup>, J.R. Figueiredo<sup>A</sup>.

All correspondence to: Fabricio Sousa Martins, R. Dr. Alfredo Weyne, 55. Apt. 103-C, Bairro: Fátima. Cep: 60415-520 – Fortaleza-CE-Brasil. E-mail: fabriciosm@fortalnet.com.br

<sup>A</sup> Laboratory of Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles – LAMOFOPA, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza 60740-000, CE, Brazil.

<sup>B</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

<sup>C</sup> Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

### **Abstract**

This study aimed to investigate the effects of GDF-9 on the preantral follicles survival, activation and subsequent follicle progression using goat ovarian cortical culture *in vitro*. To this purpose, pieces of ovarian cortex were cultured for 1 and 7 days in Minimum Essential Medium with or without GDF-9 (1 to 200 ng/ml). On day 0 and after culture, the cortical pieces were fixed for histological and transmission electron microscopy evaluation. Preantral follicles were simultaneously classified according to their development stage (primordial, intermediate, primary and secondary) and their morphological feature (normal or degenerated). In addition, the follicular and oocyte diameter were evaluated before and after culture. The results showed that culture of ovarian tissue, in all media tested, reduced ( $P < 0.05$ ) the percentage of normal follicles when compared to non-cultured cortical tissue (day 0), except when 200 ng/ml of GDF-9 was added. The percentage of primordial follicles was reduced ( $P < 0.05$ ) and there was a concomitant increase in the percentage of developing follicles in all media tested. Furthermore, the highest rate of secondary follicles was observed after 7 days of culture in MEM plus GDF-9 at 200 ng/ml. In all concentrations, follicular diameter significantly increased after 7 days of culture when compared to non-cultured

cortical tissue. In conclusion, our results indicate that GDF-9 at 200 ng/ml maintain preantral follicles survival and promotes primordial follicles activation. Furthermore, GDF-9 is important to stimulate the transition from primary to secondary follicles maintained the ultrastructural integrity.

*Keywords: Activation, Goat, Preantral follicles, Culture, GDF-9*

## **Introduction**

In mammals, the ovary is a heterogeneous organ containing follicles at various stages of development. In order to produce mature oocytes, follicles are activated from the pool of dormant primordial follicles and develop through primary and secondary stages before acquiring an antral cavity. At the antral stage, most follicles undergo atretic degeneration, whereas a few of them grow further and reach the preovulatory stage under the cyclic gonadotropin stimulation that occurs after puberty (McGee and Hsueh, 2000). Over the last two decades, many culture systems have been developed with the aim to promote primordial follicles activation and growth of preantral follicles *in vitro*, although knowledge about the factors that control the earliest stages of folliculogenesis is still scarce.

Progression through successive stages of follicle development requires bi-directional communication between oocyte and granulosa cells, and granulosa and theca cells (Eppig 2001). Many of the extracellular signalling molecules implicated in this dialogue belong to the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily. Growth differentiation factor-9 (GDF-9) belongs to the TGF- $\beta$  superfamily and is shown to be expressed exclusively in the oocyte (McGrath et al., 1995). In addition, the essential role of GDF-9 in folliculogenesis was shown by targeted deletion of the GDF-9 gene in mice (Dong et al., 1996). The GDF-9 null mice are incapable of ovulation due to an arrest of follicle development at the primary stage. Thus, GDF-9 was the first oocyte-derived growth factor shown to be required for ovarian somatic cell function. Subsequent studies have shown that treatment with GDF-9 stimulates granulosa cell proliferation (rat: Vitt et al., 2000), preantral follicle growth (human: Elvin et al., 2000), cumulus cell expansion (human: Elvin et al., 1999) and resulted in a higher proportion of viable human follicles in organ culture, suggesting a possible role of GDF-9 in follicular survival (human: Hreinsson et al., 2002). Moreover, the presence of GDF-9 in primary and later stages of goats follicles (Silva et al.,

2005) suggests that GDF-9-mediate signaling events may be important in the preantral follicle development in this specie. However, the outcome of GDF-9 at various concentrations in promoting goat primordial follicle activation and further progression to secondary stage after *in vitro* culture has not been related. Thus, the aim of the present study was to investigate the potential role of GDF-9 at different concentrations on the caprine early follicular development. To this end, it was evaluated survival, activation, and further growth of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue.

## **Materials and methods (GDF-9)**

### *Ovaries*

This study was performed in (Fortaleza, Ceará, Brazil), from January to March of 2007, during the rainy season. Ovaries (n=10) from five adult (1 – 3 years old), non-pregnant mixed breed goats were collected at a local slaughterhouse. The animals were cyclic and in good body condition. Immediately after death of the animals, the ovaries were washed in alcohol 70% followed by two times in 0.9% saline solution. The pair of ovaries from each animal was transported in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (0.25 µg/ml) to the laboratory within 1 h at 33°C. In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments and then cut in half. The medulla, large antral follicles and corpora lutea were removed. Subsequently, the ovarian cortex of each pair of ovaries was divided in to 11 fragments of approximately 3 x 3 x 1 mm.

### *In vitro culture of ovarian tissue*

One fragment was taken randomly and immediately fixed for histological examination (control). From this fragment, a small piece (1 mm<sup>3</sup>) was taken and fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for Transmission Electron Microscopy (TEM). The 10 remaining fragments were individually cultured in 24-wells culture dishes, each well containing 1 ml of culture medium at 39 °C with 5% CO<sub>2</sub> in air. The medium used was MEM (osmolarity: 300 mOsm/l, pH: 7.2) supplemented with ITS (insulin 6.25 µg/ml, transferrin 6.25 µg/ml, and selenium 6.25 ng/ml), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/ml BSA. The ovarian cortex fragments were cultured for 1 or 7 days in MEM alone or MEM containing different concentrations of GDF-9 (1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml – Cell Sciences – Canton, USA).



Unless otherwise indicated, the reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Each treatment was repeated five times and the culture media was replenished every other day.

#### *Histological evaluation and ultrastructural analysis*

Immediately after fragmentation, representative pieces of ovarian cortex were immersion-fixed for 12 h in 10% neutral buffered formaldehyde (pH 6.8-7.2) to serve as non-cultured control. After 1 or 7 days of culture in each medium, the pieces of ovarian cortex were fixed as described above, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. For each piece of ovarian cortex, 7  $\mu\text{m}$  thick sections were mounted on coated slides and stained with Periodic Acid Schiff and hematoxylin.

To better evaluate follicular morphology, ultrastructural analysis was performed on preantral follicles from the control treatment, as well as from the treatment which shows the best results of morphology, activation and growth. Briefly, after fixation, small pieces (1  $\text{mm}^3$ ) of caprine ovarian cortex were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM  $\text{CaCl}_2$  in a 0.1 M sodium cacodylate buffer. Subsequently, the samples were in bloc contrasted with uranyl acetate, dehydrated in acetone and embedded in Spurr epoxy resin. Semi-thin section (3  $\mu\text{m}$ ) were stained with toluidine blue. Ultra-thin sections (70 nm) were examined using a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron microscope operating at 80 kV. Parameters such as density and integrity of ooplasm and granulosa cell organelles, vacuolization and basement membrane integrity were evaluated.

#### *Follicle classification and measurement*

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, i.e., intermediate (one layer of flattened to cuboidal granulosa cells around the oocyte), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells), or secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells). The percentages of primordial and developing follicles were calculated on day 0 (control) and after 1 or 7 days of culture in each medium. In addition, follicular and oocyte diameter were evaluated using only normal follicles from day 0 and after culture. Only follicles with a visible oocyte nucleus were evaluated to avoid counting the same follicle twice. Furthermore, primordial and developing follicles were classified as

morphologically normal (follicles containing an intact oocyte and granulosa cells well-organized in layers without pyknotic nucleus) and degenerated follicles (oocyte with pyknotic nucleus, retracted cytoplasm or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane) (Silva et al., 2000).

### 2.5. Statistical analysis

The percentage of morphologically normal follicles, as well as the percentage of primordial or developing follicles in non-cultured tissue or after 1 and 7 days of culture in different media were compared by a Fisher test (Instat for Windows XP). Follicle and oocyte diameters in non-cultured and cultured tissue were compared by ANOVA and Kruskal-Wallis test. Values were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### *Effect of GDF-9 on the preantral follicles survival*

Histological analysis showed that degenerated (Fig. 1A) and normal (Fig. 1B) follicles were found in non-cultured and cultured ovarian cortical pieces. In degenerated follicles, a shrunken oocyte, a pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells were observed. A total of 1950 follicles were counted to evaluate follicular morphology, activation and growth.

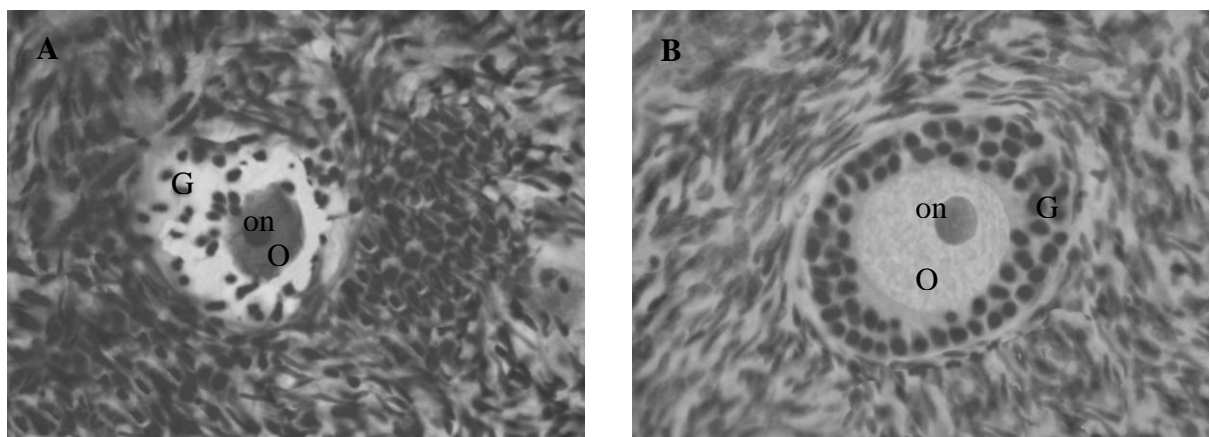


Figure 1 – Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing degenerated primary follicles (A) and normal secondary follicles (B). O: oocyte; on: oocyte nucleus; G: granulosa cells (x400).

Figure 2 shows the percentage of normal follicles in non-cultured (day 0: control) ovarian cortical pieces and after 1 or 7 days of culture in different media. Culture of ovarian tissue for 1 or 7 days, in all media tested, significantly reduced ( $P < 0.05$ ) the percentage of normal follicles when compared to non-cultured cortical tissue (90,9%), except when 200 ng/ml of GDF-9 (83,2%) ( $P > 0.05$ ) was added to the culture medium. The increase of culture duration from 1 to 7 days significantly reduced ( $P < 0.05$ ) the percentage of intact follicles, except in tissues cultured in MEM plus 100 and 200 ng/ml of GDF-9. After 7 days of culture, the concentrations of 100 and 200 ng/ml of GDF-9 showed a significantly higher ( $P < 0.05$ ) percentage of normal follicles (76.0 and 83.2%, respectively) when compared to the other treatments.

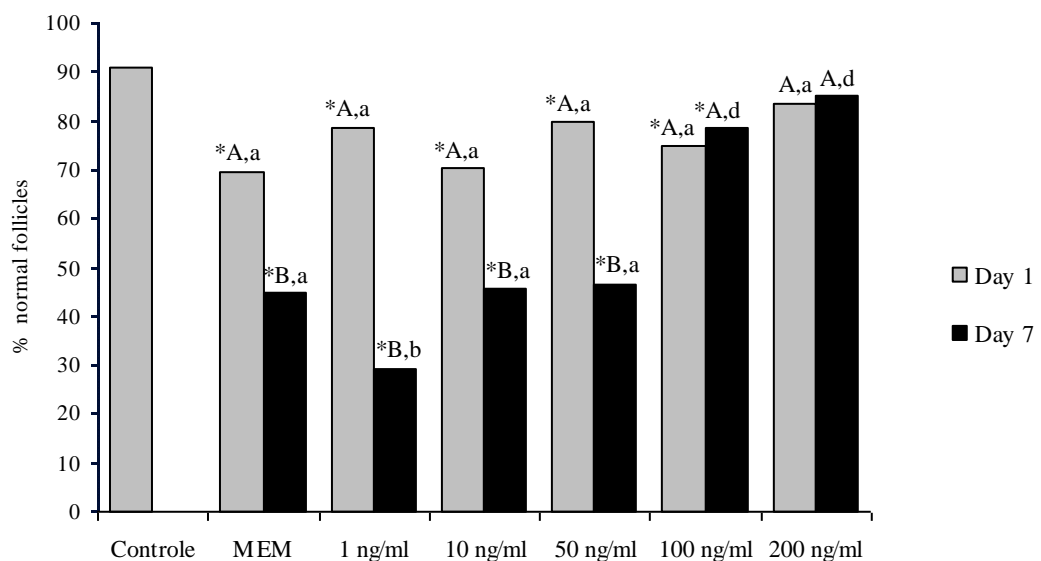


Figure 2 - Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM medium and MEM with different concentration of GDF-9.

(\*) Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control). (A,B) Values with different letter denote significant differences between cultured periods within a

given media. (a,b,c) Values with different letters denote significant differences among treatments at the same day of culture ( $P<0.05$ ).

#### *Goat primordial follicle activation and growth during in vitro culture*

In non-cultured tissue (day-0), the percentages of primordial, intermediate, primary and secondary follicles were 79.3, 15.3, 4.0, 1.3% respectively. After 1 or 7 days of culture in all media tested, the percentage of primordial follicles was significantly reduced (Fig. 3A,  $P<0.05$ ), and there was a concomitant increase in the percentage of intermediate follicles (Fig. 3B,  $P<0.05$ ) compared to non-cultured tissue. In addition, after 7 days of culture, there was a significant increase in the percentage of primary follicles (in all treatments) (Fig. 3C,  $P<0.05$ ) and secondary follicles (in all concentrations of GDF-9) compared to control (Fig. 3D,  $P<0.05$ ). This result indicates that this growth factor is important to promote the transition from primary to secondary follicles. Furthermore, cortical tissue cultured in MEM plus 200 ng/ml of GDF-9 for 7 days had a higher percentage of secondary follicles when compared to the other concentrations (Fig. 3D,  $P<0.05$ ). With the progression of the culture from 1 to 7 days, it was observed a significant decrease in the percentage of primordial (in all treatments; Fig. 3A;  $P<0.05$ ) and intermediate follicles (in 200 ng/ml of GDF-9; Fig. 3B). In addition, all treatment provided a significantly increase in the percentage of primary (Fig. 3C,  $P<0.05$ ) and similar results were observed for secondary follicles, except when tissues were cultured in MEM alone or with 50 ng/ml of GDF-9 (Fig. 3D,  $P<0.05$ ). After 7 days of culture in MEM and MEM containing 1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml of GDF-9, a significant increase ( $P<0.05$ ) in follicle diameter was seen when compared to non-cultured tissue. In contrast, no significant changes in the oocyte diameter were observed during culture. Nevertheless, MEM plus GDF-9 200 ng/ml promoted the highest oocyte and follicular diameter (Table 1.)

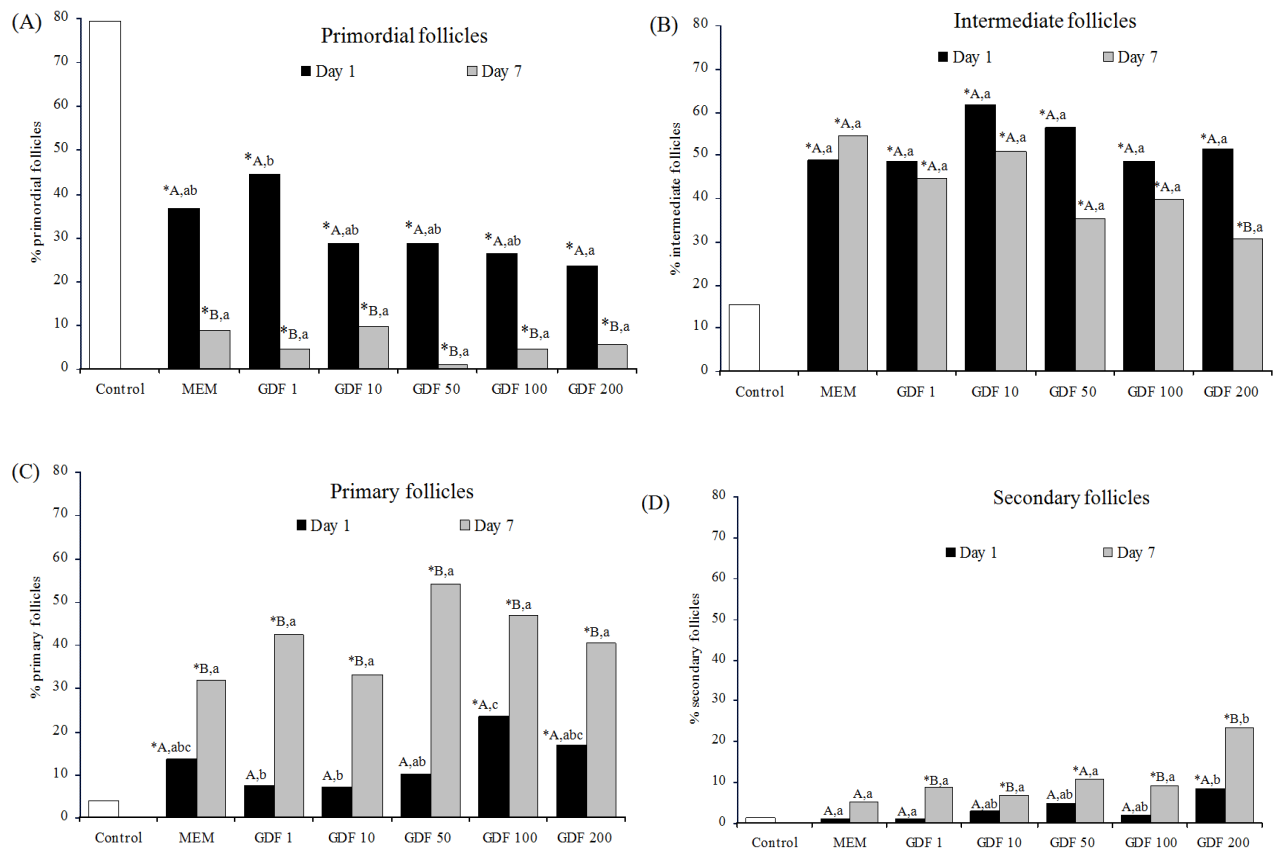


Figure 3 – Percentages of primordial (A) and developing follicles (intermediate [B], primary [C] and secondary [D]) in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM medium and MEM with different concentrations of GDF-9. (30 follicles evaluated in each one of five replicates per treatment). (\*) Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control). (A,B) Values with different letter denote significant differences between cultured periods within a given media. (a,b) Values with different letter denote significant differences among treatments at the same day of culture ( $P < 0.05$ ).

Table 1. Follicle and oocyte diameter (mean $\pm$ SD) in non-culture tissues and in tissues cultured for 7 days in MEM<sup>+</sup> (control medium) and MEM<sup>+</sup> supplemented with various concentrations of GDF-9.

	Oocyte diameter ( $\mu$ m)	Follicle diameter ( $\mu$ m)
Non-cultured (day 0)	35.9 $\pm$ 0.5	43.5 $\pm$ 0.9
MEM	36.6 $\pm$ 1.2 <sup>bc</sup>	50.9 $\pm$ 1.4 *
GDF 1	35.5 $\pm$ 1.4 <sup>bc</sup>	51.7 $\pm$ 1.3 *
GDF 10	32.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	50.7 $\pm$ 1.2 *
GDF 50	36.7 $\pm$ 2.6 <sup>ab</sup>	52.8 $\pm$ 2.5 *
GDF 100	35.8 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	51.5 $\pm$ 1.6 *
GDF 200	41.5 $\pm$ 1.4 <sup>ac</sup>	55.9 $\pm$ 1.8 *

\* Differs significantly from non-cultured tissue ( $P<0.05$ ).

a,b – Values within columns with different letters among treatments are significantly different ( $P<0.05$ ).

#### *Ultrastructural analysis of goat preantral follicles*

In accordance with histological results, TEM analysis was performed in non-cultured follicles (control-day 0 – Fig. 4) and in follicles cultured for 7 days in MEM plus 200 ng/ml of GDF-9 (Fig. 5-6). The ultrastructural features of these follicles had similar characteristics exhibiting high variable sparse vesicles spread throughout the ooplasm, both smooth and rough endoplasmatic reticulum, either as isolated aggregations or as complex associations with mitochondria and vesicles. The oocyte cytoplasm of follicles present round and elongated mitochondria, clustered around the nucleus, with parallel or transverse cristae and continuous mitochondrial membranes. The oocyte in intermediate follicles was oval or spherical and surrounded by squamous cells intermingled with cuboidal granulosa cells. In theses follicles, the organelles were uniformly allocated in the cytoplasm and the zona pellucida (ZP) was absent at this stage (Fig. 5). Ultrastructural analysis performed in secondary follicles shown that the oocyte was surrounded by cuboidal granulosa cells with two or more layer and the nucleus was large, rounded and positioned in an eccentric position. The organelles were found at periphery, the number of smooth endoplasmic reticulum

increased and a great number of mitochondria were elongated. A striking difference at this stage was the presence of a well developed ZP with a homogeneous matrix containing an great number of microvilli of the oocyte and follicular cells. (Fig. 6).

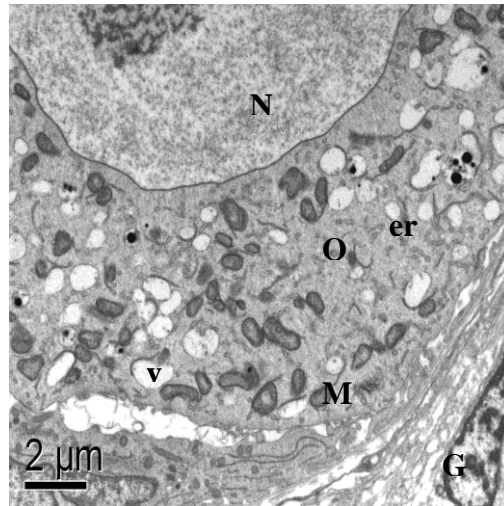


Figure 4 – Electron micrograph of a preantral follicle in non-cultured ovarian cortex (control). Note cytoplasm with numerous rounded and elongated mitochondria. O: oocyte; G: granulosa cells; N: nucleus; M: mitochondria; er: endoplasmic reticulum; v: vesicle. (magnification: 8000x)

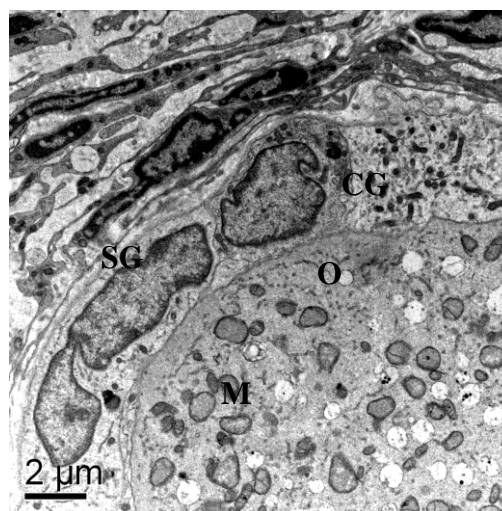


Figure 5 – Electron micrograph of intermediate follicle in ovarian cortex cultured for 7 days with 200 ng/ml of GDF-9. O: oocyte; SG: squamous granulosa cells; CG: cuboidal granulosa cells; M: mitochondria. (magnification: 8000x)

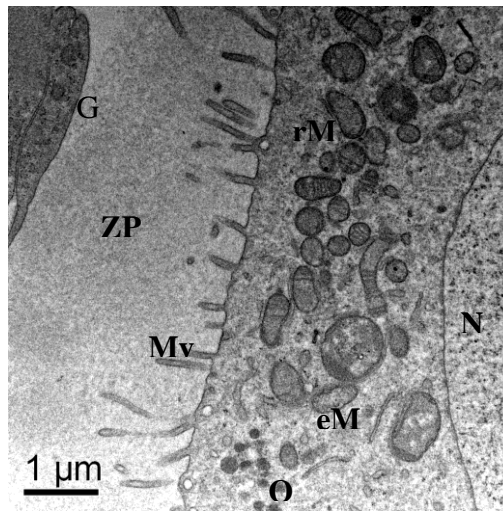


Figure 6 – Electron micrograph of secondary follicle in ovarian cortex cultured for 7 days with 200 ng/ml of GDF-9. Note zona pellucida around the oocyte. O: oocyte; G: granulosa cells; N: nucleus; rM: round mitochondria; eM: elongate mitochondria; Mv: microvilli. (magnification: 20000x)

## Discussion

In the current study, we showed a positive effect of GDF-9 on the goat ovarian follicles survival and development during 7 days of culture. Some TGF- $\beta$  superfamily members such as GDF-9 and GDF-9B (also known as Bone Morphogenetic Protein-15) have been found to be selectively expressed by oocyte from early-stage follicles – primary follicles in rodents and primordial follicles in cows and sheep (McGrath et al. 1995, Jaatinen et al. 1999, Bodensteiner et al. 1999, Elvin et al. 2000, McNatty et al. 2001). In goats, Silva et al. (2004), evidenced that GDF-9 protein were found in the oocyte of all types of follicles and in the granulosa cells of primary, secondary, and antral but not primordial follicles. The various type-I and type-II receptors through which each of these ligands can signal are expressed by (pre) granulosa cells of the corresponding early follicle stages, making these cells potential targets for paracrine signalling.



Our results showed that the highest concentration of GDF-9 tested, i.e. 200 ng/ml, promoted the maintenance of the follicular viability in tissue slices cultured for 7 days, suggesting that GDF-9 acts as a survival factor, preventing atresia, which progressively occurs with time in culture. This result probably occurs due to a protection of the granulosa cells from apoptosis using high doses of GDF-9. In accordance with our results, Hreinsson et al. (2002) demonstrated that 100 ng/ml of GDF-9 resulted in a higher proportion of viable follicles in human organ culture for 14 days. Recently, an *in vitro* study showed that GDF-9 at 100 ng/ml promoted preantral follicles growth and suppressed granulosa cells apoptosis (Orisaka et al., 2006). On the other hand, in our study, lower GDF-9 concentrations (1, 10, 50 or 100 ng/ml) decreases follicular viability after 7 days of culture. We infer that small concentrations of GDF-9 may be not sufficient for promoting the maintenance of goat follicular survival.

This study showed an increase in follicular activation during *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue for 7 days independently of the GDF-9 addition. Similar results were obtained in studies with caprine (Martins et al, 2005; Silva et al, 2006; Matos et al, 2007), bovine (Wandji et al, 1996; Braw-Tal and Youssefi, 1997) and baboon (Fortune et al., 1998) ovarian sections in which the number of primordial follicles was dramatically reduced with a concomitant increase in the number of developing follicles. Possibly, *in vitro* conditions improve the development of follicles providing the release of stimulatory factors or cessation of the production of inhibitory factors by stromal, granulosa, or pre-thecal cells. Although some researches indicated that there is no detectable GDF-9 expression in the oocyte of primordial follicle of some species (human: Hayashi et al., 1999, Aaltonen et al., 1999, rats: Jaatinen et al., 1999, Ovine and Bovine: Bodensteiner et al., 1999; Caprine: Silva et al., 2004, mice: McGrath et al., 1999), an *in vivo* study demonstrated that GDF-9 promotes a decrease in primordial follicle number compared with control (Vitt et al., 2000). On the other hand, similar to our results, Nilsson and Skinner (2002) demonstrate that 50 ng/ml of GDF-9 did not promote the primordial to primary follicle transition in rat ovaries during 14 days of *in vitro* culture.

To our knowledge, this is the first study that reports an increase in the percentage of goat secondary follicles after 7 days of *in vitro* culture of preantral follicles with GDF-9 (200 ng/ml). These data suggest that a large amount of primary follicles is stimulated to progress to later developmental stages when treated with GDF-9. Another possibility is the fact that the primordial follicles pool is indirectly stimulated to grow from primordial to

intermediate, intermediate to primary and primary to secondary. Similarly, *in vitro* exposure of rodent (Hayashi et al. 1999, Nilsson & Skinner 2002, 2003, Wang & Roy, 2004) and human (Hreiss et al. 2002) ovarian tissue to GDF-9 has been shown to promote primary follicle progression. Moreover, Wang and Roy (2004) established that higher doses of GDF-9 (200 ng/ml) increased the percentage of primordial, primary and even secondary follicles of hamsters suggesting that GDF-9 not only stimulates the formation of primordial follicles but also their progression into preantral stages. Conversely, follicle development beyond the primary stage occurs neither in GDF-9 null mice (Dong et al. 1996) nor in ewes homozygous for naturally occurring inactivating mutations in the *gdf-9* gene (Hanrahan et al. 2004) or in ewes actively immunized against GDF-9 (Juengel et al., 2002) indicating an obligatory role for this growth factor.

In the present study, after 7 days, the highest follicular diameter was observed after culture with 200 ng/ml of GDF-9 when compared to control. This effect may be due to an increase in the number of mitosis in granulosa cells since oocyte size had no alteration when compared to control. Recently, Orisaka et al. (2006) reported that addition of 100 ng/ml of GDF-9 to the culture media had no effect on rat oocyte size compared to control. It is possible that the lack of effect of GDF-9 on oocyte growth could be due to the low concentrations of growth factor used for a large number of activated follicles observed in our study or the deficiency of a cofactor produced in the ovary required for signaling the follicular development. Under our culture system conditions, this cofactor may be washed out or its expression altered, causing no increase in oocyte size.

Several studies have demonstrate that TEM analysis, after *in vitro* culture of preantral follicles, is an important tool to give close insights into the ultrastructural characteristics of follicles, providing better investigation about their feature (Van den Hurk et al., 1998; Zhao et al., 2000; Salehnia et al., 2002, Matos et al., 2007). In this study, TEM revealed that preantral follicles cultured for 7 days in MEM with 200 ng/ml of GDF-9 had aspect ultrastructurally normal, which confirm the results observed at the light microscopy analysis. In the present study, the shape of mitochondria at the vast majority in the oocyte cytoplasm of primordial follicles was round, which indicates immaturity (Perkins and Frey, 2000) and after culture the round shape of mitochondria were replaced by elongate shape in the oocyte cytoplasm of primary and secondary follicles. This pleomorphic variation observed in mitochondrial shape possibly represents their role in the metabolism of the developing follicles (Lucci et al., 2001).

In summary, the results of this study demonstrated for the first time that after 7 days of culture of goat ovarian cortical slices, the addition of 200 ng/ml of GDF-9 appeared to be more effective in promoting follicular survival, growth and the progression to secondary follicle stage maintaining follicular ultrastructure. This suggests that GDF-9 plays an important role in the goat preantral follicles development.

### Acknowledgements

We would like to thank CAPES, CNPq, RENORBIO and all the members of the laboratory, especially the undergraduate students Sarah Bezerra Honório and José Erisvaldo Maia Júnior whose help and enthusiasm made this study possible.

### References

- Aaltonen, J., Laitinen, M.P., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Horelli-Kuitunen, N., Seppa, L.H., Tuuri, T., Sjoberg, J., Butzow, R., Hovatta, O., Dale, L. and Ritvos, O. (1999). Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84,2744–2750.
- Bodensteiner, K.J., Clay, C.M., Moeller, C.L. and Sawyer, H.R. (1999). Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60, 381–386.
- Braw-tal R. and Yossefi, S. (1997). Studies in vivo and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fert.* 109, 165-171.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N. and Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383, 531–535.
- Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M. and Matzuk, M.M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13:1035-1048 26.

- Elvin, J.A., Yan, C. and Matzuk, M.M. (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cel. Endocrino.* 159, 1-5.
- Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction.* 122, 829–838.
- Fortune, J.E., Kito, S, Wandji, S.A. and Srsen, V. (1998) Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. *Theriogenology*, 49:441-449.
- Hanrahan, J.P., Gegan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R. and Galloway, S.M. (2004) 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*). *Biol. Reprod.* 70, 900-909.
- Hayashi, M., McGee, E.A., Min, G., Klein, C., Rose, U.M., van Duin and M., Hsueh, A.J. (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology.* 140, 1236-1244
- Hreinsson, J.G., Scott, J.E., Rasmussen, C., Swahn, M.L., Hsueh, A.J. and Hovatta, O. (2002) Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 316-321.
- Jaatinen, R., Latinen, M.P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinhemio, K., Lehtonen, E. and Ritvos, O. (1999). Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homologue GDF-9B. *Mol. Cell Endocrinol.* 156, 189-193.
- 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, O., McNatty, K.P. (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67, 1777-1789.
- Lucci, C.M., Silva, J.R.V., Carvalho, C.A., Figueiredo, J.R. and Bão, S.N. (2001). Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *S. Rumin. Res.* 41, 61-69.
- 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. and Figueiredo, J.R. (2005). Development of

goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. Anim. Reprod. 2(2), 106-113.

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  o, S.N., Lucci, C.M. and Figueiredo, J.R. (2007). Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. Zygote. 15,173-182.

McGee, E.A. and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr. Rev. 21, 200-214.

McGrath, S.A., Esquela, A.F. and Lee, S.J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. Mol. Endocrinol. 9,131-136.

McNatty, K.P., Juengel, J.L., Wilson, T. Galloway, S.M. and Davis, G.H. (2001). Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. Reprod. Fertil. Dev. 13, 549-555.

Nilsson, E.E. and Skinner, M.K. (2002). Growth and Differentiation Factor-9 Stimulates Progression of Early Primary but Not Primordial Rat Ovarian Follicle Development. Biol. Reprod. 67, 1018-1024.

Nilsson. E.E. and Skinner, M. K. (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. Biol. Reprod. 69, 1265-1272.

Orisaka, M., Orisaka, S.J., Jin-Yi, C. J., Wang, Y., Kotsuji, F., and Tsang, B.K. (2006) Growth Differentiation Factor-9 Is Anti-Apoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. Mol. Endocrinol. 10, 2456-2468.

Perkins, G.A. and Frey, T.G. (2000) Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. Micron. 31, 97-111.

Salehnia, M., Moghadan, E.A. and Velojerdi, M.R. (2002) Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. Fert Steril. 78, 644-645.

Silva, J.R.V., Lucci, C.M., Carvalho, F.C.A., B  o, S.N., Costa, S.H.F., Santos, R.R., Figueiredo, J.R. (2000). Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. Theriogenology. 54, 809-822.

- Silva, J.R.V., Van Den Hurk, R., Van Tol, H.T.A., Roelen, B.A.J. and Figueiredo, J.R. (2004) Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and BMP Receptors in the Ovaries of Goats. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 11-19.
- Silva, J.R.V., Tharasanit, T. Taverne, M.A.M, Van der Weijden, G.C., Santos, R.R., Figueiredo, J.R., and Van den Hurk, R. (2006). The activin-follistatin system and *in vitro* early development in goats. *J. Endocrinol.* 189, 113-125.
- Van Den Hurk, R., Spek, E.R., Hage, W.J., Fair, T., Ralph, J.H., Schotanus, K. (1998) Ultrastructure and viability of isolate preantral follicles. *Human Reprod.* 4, 833-841.
- Vitt, U.A., Hayashi, M., Klein, C. and Hsueh, A.J. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.* 62, 370-377.
- Wandji, S.a., Eppig, J.J. and Fortune, J.E. (1996). FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. *Theriogenology.* 45, 817-832.
- Wang, J. and Roy, S.K. (2004). Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 70, 577-585.
- Zhao, J., Dorland, M., Taverne, M.A.M., Van Der Weijden, G.C., Bevers, M.M. and Van Den Hurk, R. (2000). *In vitro* culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Mol. Reprod. Develop.* 55, 65-74.

## **7 CAPÍTULO 2**

**Expressão de RNAm para o Fator de Crescimento semelhante à Insulina-I (IGF-I) em  
folículos ovarianos caprinos e a influência do IGF-I sobre a sobrevivência e o  
desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos**

### Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar, em ovários caprinos, a expressão da proteína e do RNAm para o IGF-I, bem como avaliar os efeitos do IGF-I sobre a viabilidade e o desenvolvimento de folículos pré-antrais inseridos em córtex ovariano. Os ovários foram utilizados para a localização imunohistoquímica do IGF-I ou usados para verificar a expressão do RNAm para o IGF-I. Para tanto, folículos pré-antrais, complexos cúmulus-oócito, células da granulosa murais e células da teca foram coletadas para estudar a expressão do RNAm. Para os estudos *in vitro*, fragmentos de córtex ovariano foram cultivados por 1 e 7 dias com IGF-I nas concentrações de 0, 1, 10, 50, 100 e 200 ng/ml. Os resultados da análise imunohistoquímica evidenciaram forte reação para o IGF-I nos oócitos e nas células da granulosa de todos os estádios foliculares, exceto nas células da granulosa de folículos primordial e primário. As análises da expressão de RNAm demonstraram um discreto aumento da produção de IGF-I durante a transição para folículos primário e secundário. Após 7 dias de cultivo, a adição de 50 ng/ml de IGF-I ao meio de cultivo promoveu uma elevada percentagem de folículos normais quando comparado às demais concentrações testadas. Além disso, o percentual mais elevado de folículos primários foi observado após 7 dias de cultivo em MEM<sup>+</sup> acrescido de 10 e 50 ng/ml de IGF-I. Entre todas as concentrações testadas, a utilização de 50 ng/ml promoveu o melhor aumento do diâmetro dos folículos inseridos em córtex ovariano cultivados por 7 dias. Concluindo, a expressão da proteína e do RNAm para IGF-I foi demonstrada em todas as categorias foliculares na espécie caprina. Além disso, o IGF-I promove a manutenção da sobrevivência folicular, a ativação de folículos primordiais e estimula a transição de folículos intermediários para folículos primários.

Palavras-chave: ovário, folículos ovarianos, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I)



## Expression of mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on the *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles

F.S. Martins<sup>A,D</sup>, M.V.A. Saraiva<sup>A</sup>, J. J.H. Celestino<sup>A</sup>, J.B. Bruno<sup>A</sup>, A.P. Almeida<sup>A</sup>, R.M.S. Cunha<sup>C</sup>, J.R.V. Silva<sup>C</sup>, C.C. Campello<sup>A</sup>, C.M. Lucci<sup>B</sup>, M.H.T. Matos<sup>A</sup>, J.R. Figueiredo<sup>A</sup>

<sup>A</sup> Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Veterinary Faculty, State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza 60740-000, CE, Brazil.

<sup>B</sup> Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasília, Asa Norte, Campus Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, DF, Brazil.

<sup>C</sup> Biotechnology Nucleus of Sobral – Federal University of Ceará, Av. Geraldo Rangel, 100/186, Sobral, CE CEP: 60.041-040, Brazil

<sup>D</sup> Corresponding author: 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. 3101.9860; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: fabricao@netbandalarga.com.br

### Abstract

The aim of this study was to investigate the protein and mRNA expression levels of IGF-I and the effects of IGF-I on preantral follicle survival and development, using an *in vitro* goat ovarian cortical culture system. The ovaries were used for immunohistochemical localization of IGF-I protein or used to demonstrate mRNA expression of IGF-I. For the latter goal, preantral follicles, cumulus-oocyte complex, mural granulosa and theca cells were collected to study mRNA expression. For *in vitro* studies, ovarian cortex were cultured for 1 and 7 days with IGF-I (0, 1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml). Immunohistochemical results showed strong reactions for IGF-I in oocytes and granulosa cells of all follicular stages, except in granulosa cells of primordial and primary follicles. mRNA expression analysis demonstrated a discrete increase in the production of IGF-I during the transition from primordial to the primary and secondary follicle stages. After 7 days of culture, addition of 50 ng/ml of IGF-I to the medium showed the greatest percentage of normal follicles when compared with other concentrations. Furthermore, the highest percentage of primary follicles was observed after 7 days of culture in MEM<sup>+</sup> plus 10 and 50 ng/ml. Culture of ovarian tissue for 7 days in MEM<sup>+</sup> plus 50 ng/ml promoted the greatest increase in follicular diameter of all of the concentrations tested. In conclusion, IGF-I protein and mRNA are expressed in all follicular categories of goat. Furthermore, IGF-I maintains preantral follicle survival, promotes primordial follicle activation and stimulate the transition from intermediate to primary follicles.

**Keywords:** ovary, follicle, Insulin-like growth factor

## Introduction

Most research in reproductive biotechnology has focused on developing *in vitro* culture systems for immature oocytes enclosed in preantral follicles, since these follicles could in the future be sources of fertilizable oocytes for *in vitro* embryo production. Preantral follicle development can be divided into three stages: activation of primordial follicles, the primary to secondary follicle transition, and further growth of secondary follicles (Fortune, 2003). Due to the protracted nature of preantral follicle development in large mammals, culture systems should be developed to accelerate follicular growth without inducing inappropriate follicular differentiation.

The actions of several local growth factors that are involved in the complex process of preantral follicular growth have been investigated *in vitro*. Many studies have highlighted the role of the insulin-like growth factor I (IGF-I) system in the control of follicular growth (Giudice, 1992; Armstrong and Webb, 1997; Armstrong et al., 1998; Woad et al., 2000). The bioactivity of IGF-I is controlled by its association with IGF-binding proteins (IGFBPs) which can either inhibit or facilitate IGF action (Monget & Bondy, 2000). The expression of mRNA encoding IGF-I in ovarian follicles is developmentally regulated in a species-specific manner (Armstrong & Webb, 1997; Webb & Armstrong, 1998). Although it has been clearly established that IGF-I is expressed in granulosa cells of rodents (Oliver et al., 1989) and pigs (Hatey et al., 1992), its expression in the ruminant remains controversial, with reports demonstrating both the presence (Spicer et al., 1993; Leewenberg et al., 1995; Spicer & Echternkamp, 1995; Yuan et al., 1998) and absence (Perks et al., 1995; 1999; Armstrong et al., 1998) of mRNA encoding IGF-I in both bovine and ovine granulosa cells.

The responsiveness of ovarian follicles to IGF-I has been demonstrated in numerous studies. When added during *in vitro* culture of preantral follicles, IGF-I has been shown to stimulate follicular growth in various species (rat: Zhou et al., 1991, Zhao et al., 2001; cow: Gutierrez et al., 2000; human: Louhio et al., 2000). In addition, IGF-I increased follicular diameter, increased DNA content, promoted functional integrity and stimulated steroidogenesis during rat preantral follicle culture (Demeestere et al., 2005). Moreover, IGF-I promotes proliferation of cultured human theca cells (Duleba et al., 1998). However, although IGF-I has a stimulatory effect on early follicle growth, McCaffery et al. (2000) highlighted the importance of its regulatory mechanism, showing that inappropriate exposure of bovine preantral follicles to IGF-I has a detrimental effect on oocyte development. However, much

less is known about the involvement of the IGF-I in the regulation of goat preantral follicular development.

In an attempt to address the lack of knowledge regarding the involvement of IGF-I in goat folliculogenesis, the present study was designed (1) to verify the patterns of expression of protein and mRNA of IGF-I in goat follicles at different stages of development and (2) to investigate a possible influence of different concentrations of IGF-I on the survival, activation and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*.

## Materials and methods

### Messenger RNA and protein localization of IGF-I in goat follicles

To evaluate mRNA expression, ovaries (n=30) were collected and rinsed in saline (0.9% NaCl) containing antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), after which ten were used for isolation of primordial, primary and secondary follicles. The remaining ovaries were used for collection of COCs, mural granulosa and theca cells from small and large antral follicles. Primordial, primary and secondary follicles were isolated via at mechanical procedure described previously (Lucci et al. 1999). After isolation, these follicles were first washed several times to completely remove the stromal cells, and then placed by category into separate Eppendorf tubes in groups of 10. This procedure was completed within 2 h, and all samples were stored at –80°C until the RNA was extracted. From a second group of ovaries (n=20), cumulus–oocyte complexes (COCs) were aspirated from small (1–3 mm) and large (3–6 mm) antral follicles. From the follicle content, compact COCs were selected as described by Van Tol & Bevers (1998). Thereafter, groups of 10 COCs were stored at –80°C until RNA extraction. To collect mural granulosa and theca cells, small (n=10) and large antral follicles (n=10) were isolated from ovaries (n=5) and dissected free of stromal tissue with forceps, as described previously (Van Tol & Bevers 1998). The follicles were then bisected and mural granulosa / theca were collected and stored at –80°C.

Isolation of total RNA was performed using Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brazil). As per the manufacturer's instructions, 1 mL of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was centrifuged at 10,000x g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and introduced on to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340

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

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for 5 min at 70°C, and then chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20 µl made up of 10 µl sample RNA, 4 µl 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 8 units RNaseOUT, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 10 mM DTT and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at 42°C followed by 5 min at 80°C and was then stored at –20°C. Minus RT blanks were prepared under the same conditions but without inclusion of reverse transcriptase.

Quantification of mRNA for IGF-I was performed using SYBR Green. PCR reactions were carried out using 1 µl cDNA as template in 7.5 µl of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 µl of ultra-pure water and 0.5 µM of each primer. The primers were designed to perform amplification of mRNA for IGF-I. GAPDH and  $\beta$ -actin were used as endogenous controls for normalization of gene expression (Table 1). The thermal cycling profile for the first round of PCR was as follows: initial denaturation and activation of the polymerase for 15 min at 94°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 45 sec at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a Mastercycler real-time PCR machine (Eppendorf, Germany).

Localization of IGF protein was performed on serial 5-µm sections cut from the ovaries (n=10) of five different goats. These sections were mounted on poly-L-lysine-coated slides, dried overnight at 37°C, deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded ethanol series. Endogenous peroxidase was blocked by incubating the deparaffinized sections in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min. The sections were then washed with PBS, and the epitopes were activated by microwaving the sections for 7 min at 900 W in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0). After microwaving, the sections were washed in PBS / 0.05% Tween (PBS-T) before being incubated for 30 min with 5% normal goat serum in PBS to minimize non-specific binding. Then, the sections were incubated with polyclonal anti-IGF-I (Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:50. After this incubation, sections were washed three times with PBS and incubated for 45 min with biotinylated secondary antibody (anti-rabbit IgG from Santa Cruz, CA, USA) then diluted 1:200 in PBS containing 5% normal goat serum. Next, the sections were washed three times in PBS-T before being incubated for 45 min with an avidin–biotin complex (1:600-Vectastain Elite ABC kits; Vector Laboratories). The sections were then

washed three times in PBS and stained with diaminobenzidine (0.05% DAB in Tris/HCl, pH 7.6, and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Sigma tablets) for a maximum of 10 min. The stained sections were rinsed in PBS and water then counterstained for 10 s in Mayer's hematoxylin. Finally, the sections were washed for 10 min in running tap water, and subsequently dehydrated in a graded ethanol series followed by xylene treatment and finally mounted for histological evaluation. The staining intensity was scored as follows: absent (–), weak (+), moderate (++) or strong (+++). Controls for non-specific staining were performed by (1) replacing the primary antibody with IgGs from the same species in which the specific antibody was raised, at the same concentration, and (2) incubating with diaminobenzidine reagent alone to exclude the possibility of non-suppressed endogenous peroxidase activity. For immunohistochemical analysis, the follicles were classified as described later for the culture.

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of goat cells and tissues.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense	Position	GenBank accession no.
IGF-I	ATGCTCTCCAGTTCGTGTGT	s	182-202	GI: 217666 (2008) <i>Capra hircus</i> GHR
	TTGAGAGGCGCACAGTACATCT	as	341-363	
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	s	287-309	GI: 27525390 (2005) <i>Capra hircus</i> GAPDH
	ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	as	440-462	
Beta-Actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	s	187-211	GI: 28628620 (2003) <i>Capra hircus</i> Beta-Actin
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTC	as	386-410	

s: sense; as: antisense

#### *In vitro* culture of ovarian tissue and morphological evaluation

Ovaries (n=10) from five adult (1–3 years old), non-pregnant mixed breed goats were collected at a local slaughterhouse. The animals were cyclic and in good body condition. Immediately after the death of the animals, the ovaries were washed in 70% alcohol followed by two washes in 0.9% saline solution. The pair of ovaries from each animal was transported to the laboratory in 20 ml of Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (0.25 µg/ml) within 1 h, at 33°C.

In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of the surrounding fat tissue and ligaments. Moreover, the medulla, visible growing follicles and corpora lutea were

removed. The ovarian cortex of each pair of ovaries was then divided in 13 fragments (approximate size 3 x 3 mm, 1 mm thick) using a needle and scalpel under sterile conditions. One fragment was taken randomly and immediately fixed for histological examination (control). The 12 remaining fragments were placed individually in 24-well culture dishes, with each well containing 1 ml of culture medium. They were cultured for 1 or 7 days at 39°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>. The medium used was MEM (osmolarity: 300 mOsm/l, pH: 7.2) supplemented with ITS (insulin 6.25 µg/ml, transferrin 6.25 µg/ml and selenium 6.25 ng/ml), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/ml BSA, which was called MEM<sup>+</sup> (All from Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA). The ovarian cortex fragments were cultured in MEM<sup>+</sup> alone or MEM<sup>+</sup> containing different concentrations of IGF-I (1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml). Each treatment was repeated five times, and the culture medium was changed every two days.

Immediately after fragmentation, representative pieces of ovarian cortex were immersion-fixed for 12 h in 10% neutral buffered formaldehyde (pH 6.8-7.2) to serve as non-cultured control (fresh control). After 1 or 7 days of culture in each medium, the pieces of ovarian cortex were fixed as described above, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. The samples were sectioned (7 µm thick) and mounted on charged slides, then allowed to dry overnight at 37°C before staining with Periodic Acid Schiff and hematoxylin. Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined on a microscope (Nikon, Japan) under 400X magnification.

The developmental stages of follicles have been defined previously (Silva et al., 2004) as primordial (oocyte surrounded by flattened granulosa cells) or developing follicles, i.e., intermediate (oocyte surrounded by flattened granulosa cells and at least one cuboidal granulosa cell), primary (oocyte surrounded by a complete layer of cuboidal granulosa cells), or secondary (oocyte surrounded by two or more complete layers of cuboidal granulosa cells). Primordial and developing follicles were classified as morphologically normal (follicles containing an intact oocyte and granulosa cells well-organized in layers without pyknotic nucleus) and degenerated follicles (oocyte with pyknotic nucleus, retracted cytoplasm or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane) (Silva et al., 2000).

The percentages of primordial and developing follicles were calculated on day 0 (control) and after 1 or 7 days of culture in each medium. Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment x 5 repetitions = 150 follicles). In addition, follicular diameter was taken using only normal follicles from day 0 and after

culture. Follicular diameter was recorded from edge to edge of the granulosa cell membrane or from the outside edge of the theca cell layer when present. Two perpendicular diameters were recorded from edge to edge of both the oocyte and basal membrane, and the average of these two values was reported as follicular and oocyte diameter, respectively. It is important to note that only follicles with a visible oocyte nucleus were evaluated to avoid double counting.

#### Assessment of preantral follicle viability

A viability study using an experimental protocol similar to that described in the above morphological investigation was performed with the aim of analyzing the effects of caprine ovarian tissue culture on the viability of preantral follicles. Based on the results of morphological analysis, the viability of follicles was further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes. Additional pairs of ovaries (n=4) were cut into 18 fragments, of which six (n=6) were immediately processed for follicle isolation. The remaining fragments were cultured for 7 days in the same conditions described above, in MEM<sup>+</sup> alone or MEM<sup>+</sup> containing 50 ng/ml of IGF-I.

After culture, goat preantral follicles were isolated from ovarian fragments using the mechanical method described previously by Lucci et al. (1999).

Isolated preantral follicles were analyzed using a two-color fluorescence cell viability assay based on the simultaneous determination of live and dead cells by calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively. While the first probe detected intracellular esterase activity of viable cells, the later labels nucleic acids of 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 the suspension of isolated follicles, followed by an incubation at 37°C for 15 min. After labeling, follicles were washed once by centrifugation at 100xg for 5 min and resuspension in MEM, mounted on a glass microscope slide in 5  $\mu$ l antifading medium (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Germany) to prevent photobleaching, and finally examined using an a DMLB fluorescence microscope (Leica, Germany). The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered live if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if the chromatin was not labeled with ethidium homodimer (red).

## Statistical analysis

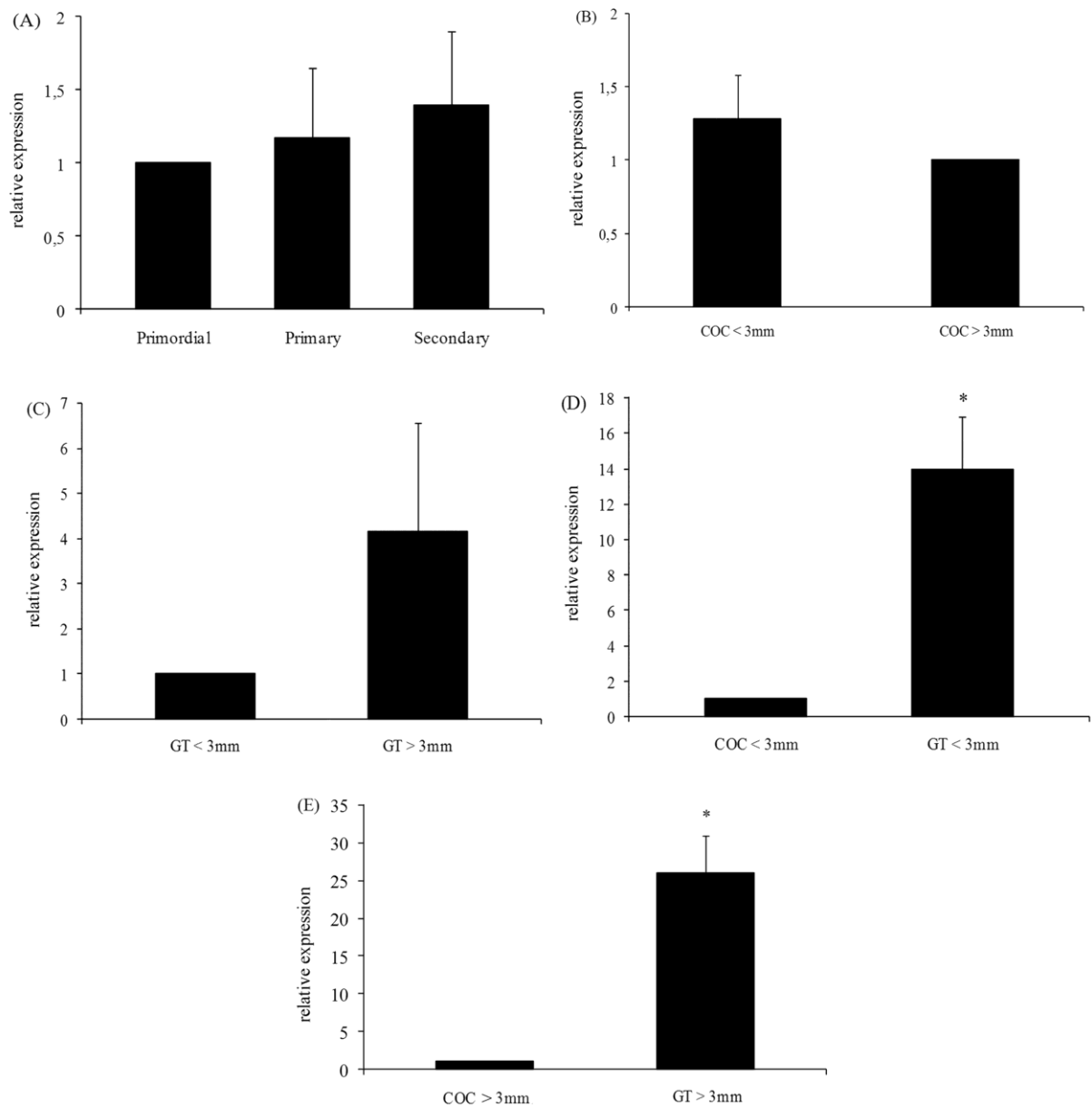
The expression of mRNA data in primordial, primary and secondary follicles were analyzed by ANOVA, and means were compared by Tukey's test, while *t* tests were used for paired comparisons of mRNA expression in small and large antral follicles ( $P < 0.05$ ). Culture data were analyzed statistically as follows. Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests were applied 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 for comparison of control groups against each treatment tested (Steel et al., 1997), while the SNK test was used to compare different concentrations of IGF and days of culture. Differences among groups were considered significant if  $P < 0.05$ , and results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

## Results

### Messenger RNA and protein expression of IGF-I in goat ovarian follicles

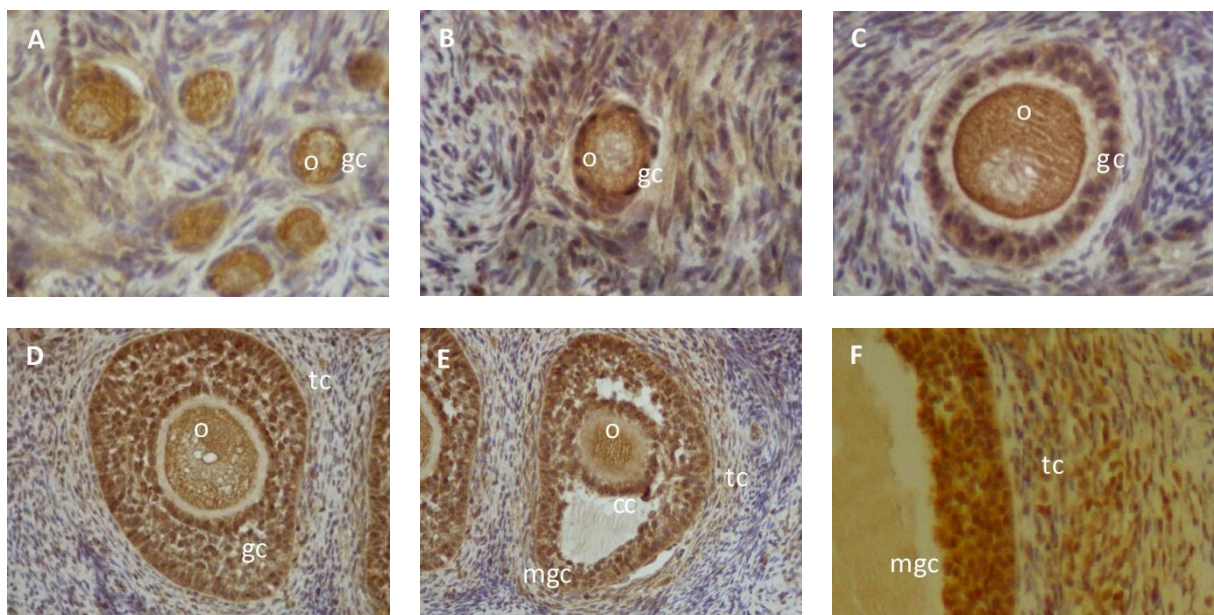
Quantification of mRNA expression demonstrated a discrete increase in the production of IGF-I during the transition from primordial to primary and secondary follicle stages, but the differences were not statistically significant ( $P > 0.05$ , Fig 1A). When the expression of IGF-I mRNA was compared between COCs collected from small and large antral follicles, no significant difference was observed ( $P > 0.05$ , Fig. 1B). A greater expression level of IGF-I mRNA was observed in granulosa / theca cells from large antral follicles, but the differences were not statistically significant ( $P > 0.05$ , Fig. 1C). Additionally, real-time PCR showed that granulosa and theca cells from small and large antral follicles produce significantly more IGF-I than their respective COCs ( $P < 0.05$ , Fig. 1 D and E).





**Figure 1.** Expression of IGF-I mRNA (mean  $\pm$  SEM) in goat ovarian follicles. (A) Primordial, primary and secondary follicles; (B) COCs from small and large antral follicles; (C) granulosa / theca cells from small and large antral follicles; (D) COCs and granulosa / theca cells from small antral follicles; (E) COCs and granulosa / theca cells from large antral follicles. \*( $P < 0.05$ )

To confirm the presence of IGF-I protein in follicular compartments, immunohistochemical studies showed a strong reaction for IGF-I in oocytes of primordial, primary, secondary and antral follicles (Figure 2, Table 2). Granulosa cells of primordial and primary follicles had a moderate reaction for IGF-I, while a strong immunoreaction was observed in secondary and antral follicles (Figure 2, Table 2). In addition, a weak immunoreaction for IGF-I was observed in theca cells from secondary follicles, but theca cells from small antral follicles had a moderate reaction. Moreover, a strong reaction for IGF-I was demonstrated in theca cells from large antral follicles (Figure 2, Table 2).



**Figure 2.** IGF ligand immunoreactivity in the different structures found within goat ovaries. (A) Primordial follicle; (B) intermediate follicles; (C) primary follicle; (D) secondary follicle; (E) antral follicle; (F) negative control reaction. o: oocyte; gc: granulosa cells; mgc: mural granulosa cells; cc: cumulus cells; tc: theca cells. (Original magnification  $\times 400$ ).

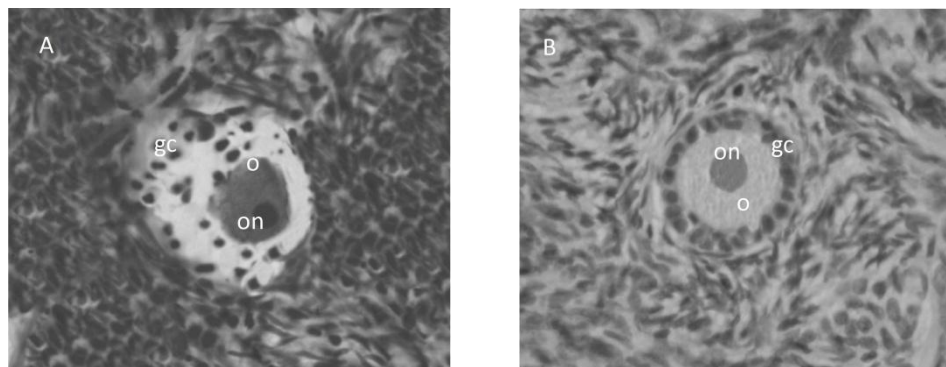
Table 2. Relative intensity of immunohistochemical staining for IGF-I ligand in goat ovarian follicles.

Follicle compartment	Ovarian follicles			
	Primordial	Primary	Secondary	Antral
Oocyte	+++	+++	+++	+++
Granulosa	++	++	+++	+++
Theca	NF	NF	+	+++

(-) absent; (+) weak; (++) moderate; (+++) strong immunoreaction. NF: not found

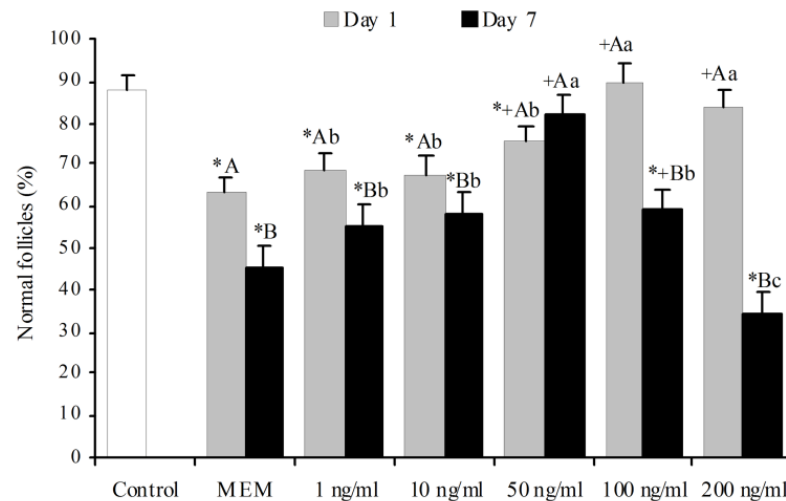
#### Effect of IGF-I on preantral follicle survival

Histological analysis showed that degenerated (Fig. 3A) and normal (Fig. 3B) follicles were found in cultured ovarian cortical pieces. In degenerated follicles, a shrunken oocyte with a pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells were observed. In total, 1,950 follicles were counted to evaluate follicular morphology, activation and growth.



**Figure 3.** Histological sections of non-cultured tissue after staining with periodic acid-Schiff-hematoxylin, showing a degenerated primary follicle (A) and a normal primary follicle (B). o, oocyte; on, oocyte nucleus; gc, granulosa cells. (Original magnification  $\times 400$ .)

Figure 4 shows the percentages of normal follicles in non-cultured control (day 0) and after 1 or 7 days of culture of ovarian cortical pieces in different media. In all media tested, culture of ovarian tissue had significantly reduced ( $P<0.05$ ) percentages of normal follicles when compared to fresh tissue (87.5%), except when 100 or 200 ng/ml of IGF-I was added to the medium for 1 day of culture (90.1 and 83.9%, respectively) and when 50 ng/ml of IGF-I was added for 7 days of culture (81.9%). When compared with control medium ( $\text{MEM}^+$ ), after 1 or 7 days of culture, addition of 50, 100 and 200 ng/ml of IGF-I significantly increased ( $P<0.05$ ) the percentage of histologically normal follicles, except after 7 days with 200 ng/ml of IGF-I ( $P>0.05$ ). In addition, after 1 day of culture, the greatest percentage of normal follicles was observed with 100 and 200 ng/ml of IGF-I. After 7 days of culture, addition of 50 ng/ml of IGF-I to the medium showed the greatest percentage of normal follicles (81.9%) when compared with other concentrations ( $P<0.05$ ). Increasing the culture period from 1 to 7 days significantly reduced ( $P<0.05$ ) the percentage of intact follicles in all treatments, except in tissues cultured in  $\text{MEM}^+$  plus 50 ng/ml of IGF-I ( $P>0.05$ ).



**Figure 4.** Percentage of morphologically normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in  $\text{MEM}^+$  and  $\text{MEM}^+$  plus 1, 10, 50, 100, 200 ng/ml IGF-I

\*: Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) ( $P < 0.05$ ).

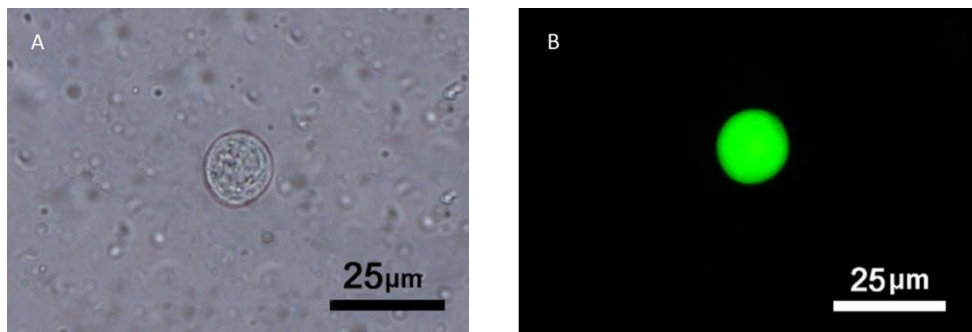
+: Denotes values that differ significantly from MEM<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ).

AB: Values with different letters denote significant differences between cultured periods within a given medium ( $P < 0.05$ ).

abc: Values with different letter denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).

#### Viability assessment of follicles after culture

Based on the results of the morphological evaluation, goat preantral follicles were isolated from fresh control and from ovarian fragments cultured for 7 days with 50 ng/mL of IGF-I, and a viability trial using these treatments was performed. A fluorescence cell viability assay based on labeling of live and dead cells by calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively, was employed. Figure 5 shows a viable preantral follicles after *in vitro* culture and labling with calcein-AM and ethidium homodimer-1. The percentage of viable follicles after 7 days of culture were similar between MEM<sup>+</sup> (91.05%) and IGF-I (93.0%).

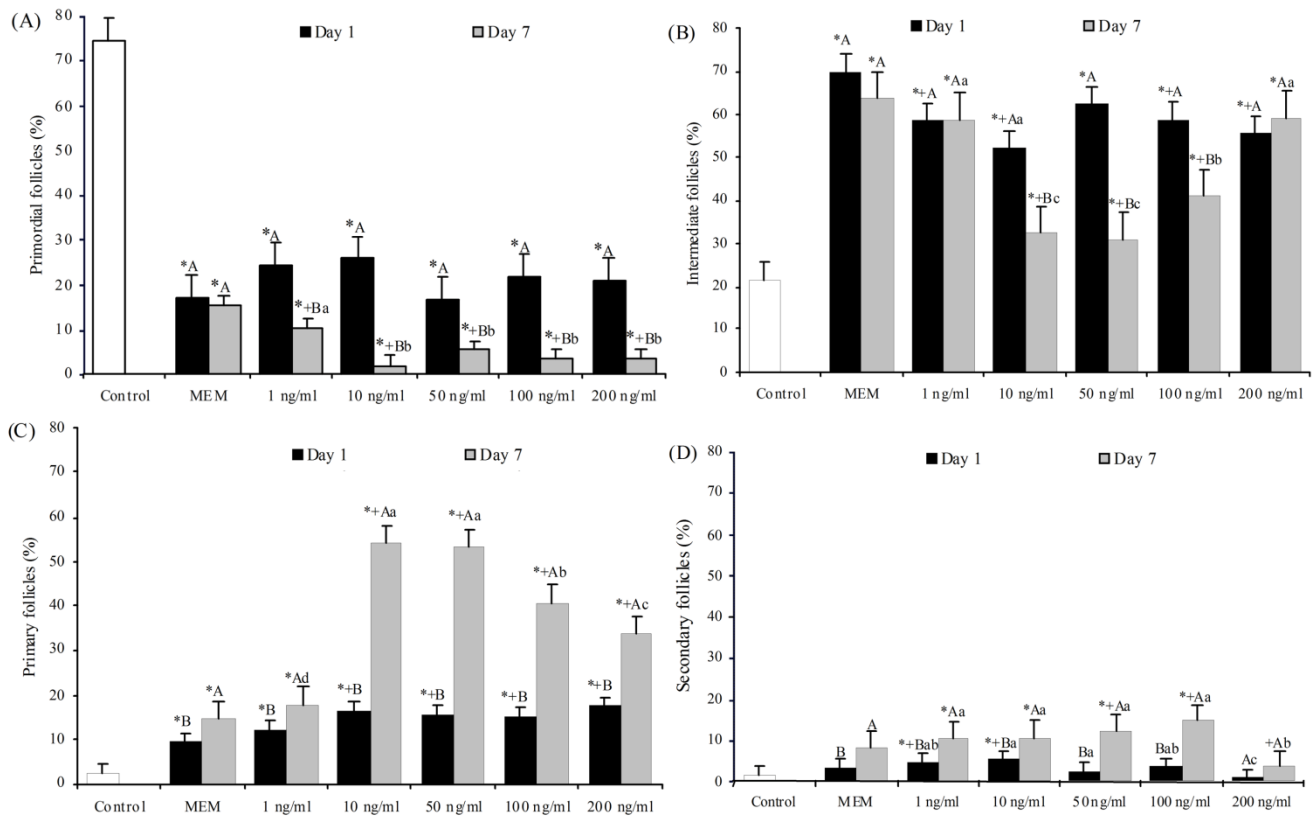


**Figure 5.** Mechanically isolated follicles visible under an fluorescence microscope after fluorescence staining for follicle viability (calcein-AM and ethidium homodimer-1). Preantral follicle in cultured ovarian tissue in MEM<sup>+</sup> containing 50 ng/ml of IGF-I for 7 days were visible by (A) light microscopy and (B) fluorescence microscopy. Scale bars represent 25  $\mu$ m.

### Goat primordial follicle activation and growth during *in vitro* culture

In non-cultured control, the percentages of primordial, intermediate, primary and secondary follicles were 74.46, 21.66, 2.44 and 1.44%, respectively. After 1 or 7 days of culture in all media tested, the percentage of primordial follicles ( $P<0.05$ , Fig. 6A,) was significantly reduced compared to fresh control. In contrast, there was a significant and concomitant increase in the percentage of intermediate and primary follicles in all treatments tested after 1 or 7 days of culture, when compared with fresh control ( $P<0.05$ , Fig. 6B-C). Furthermore, cortical tissue cultured in MEM<sup>+</sup> plus 10 or 50 ng/ml of IGF-I for 7 days had a greater percentage of primary follicles than did tissue cultured with other concentrations of IGF-I ( $P<0.05$ , Fig. 6C). When compared with MEM<sup>+</sup> alone, all IGF-I concentrations (except 1 ng/ml) significantly increased the percentage of primary follicles after 1 or 7 days. In addition, after 7 days of culture, the percentage of secondary follicles was significantly increased in medium containing 1, 10, 50 and 100 ng/ml of IGF-I, compared with fresh control ( $P<0.05$ , Fig. 5C). Only ovarian cortex cultured for 7 days with 50 and 100 ng/ml had greater percentages of secondary follicles when compared to MEM<sup>+</sup> alone ( $P<0.05$ , Fig. 6C ).

Regarding the progression of the culture period (from day 1 to 7), a significant decrease in the percentage of primordial follicles was observed in all treatments except MEM<sup>+</sup> ( $P<0.05$ , Fig. 6A). Moreover, a significant decrease in the percentage of intermediate follicles was also observed in 10, 50 and 100 ng/ml of IGF-I (Fig. 6B;  $P<0.05$ ), while all treatments resulted in a significant increase in the percentage of primary follicles ( $P<0.05$ , Fig. 6C). All treatments promoted a significant increase the percentage of secondary follicles with the progress of the culture period from 1 to 7 days, except when tissues were cultured with 200 ng/ml of IGF-I (Fig. 6D,  $P<0.05$ ).



**Figure 6.** Percentages of primordial (A) and developing follicles (intermediate [B], primary [C] and secondary [D]) in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM<sup>+</sup> medium and in MEM<sup>+</sup> plus different concentrations of IGF-I.

\*: Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) (P<0.05).

+: Denotes values that differ significantly from MEM (P<0.05).

AB: Values with different letters denote significant differences between cultured periods within a given medium (P<0.05).

abc: Values with different letters denote significant differences among treatments (P<0.05).

After 1 and 7 days of culture in MEM<sup>+</sup> containing 50 and 100 ng/ml of IGF-I, a significant increase in follicular and oocyte diameter was seen when compared with non-cultured tissue and the other treatments (P<0.05, Tab. 3). With the progression of the culture time from 1 to 7 days, a significant increase in follicular diameter was observed in all treatments except in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus 200 ng/ml of IGF-I (P<0.05). Nevertheless,

ovarian fragments cultured in MEM<sup>+</sup> plus IGF-I at 50 ng/ml, after 7 days of culture, had greater follicular diameter when compared to the other treatments (P<0.05).

Table 3. Oocyte diameter and follicular diameter in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 7 days in MEM<sup>+</sup> (control medium) and MEM<sup>+</sup> supplemented with various concentrations of IGF-I.

	Oocyte diameter (μm)		Follicular diameter (μm)	
Non-cultured	41.7 ± 1.9		57.1 ± 4.4	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
MEM	42.3 ± 3.5 <sup>Ab</sup>	42.7 ± 4.6 <sup>Ab</sup>	55.6 ± 2.8 <sup>A</sup>	56.6 ± 4.2 <sup>A</sup>
IGF 1	41.2 ± 3.3 <sup>Bb</sup>	45.7 ± 4.3 <sup>Ab</sup>	56.2 ± 3.4 <sup>Bb</sup>	61.5 ± 3.2 <sup>Ac<sup>d</sup></sup>
IGF 10	41.5 ± 3.8 <sup>Ab</sup>	41.2 ± 3.9 <sup>Ab</sup>	55.6 ± 4.8 <sup>Bb</sup>	60.2 ± 5.5 <sup>Ac</sup>
IGF 50	50.7 ± 2.7 <sup>*+Aa</sup>	53.6 ± 4.6 <sup>*+Aa</sup>	62.3 ± 2.3 <sup>*+Ba</sup>	78.6 ± 5.5 <sup>*+Aa</sup>
IGF 100	51.1 ± 2.5 <sup>*+Aa</sup>	52.8 ± 4.4 <sup>*+Aa</sup>	61.2 ± 3.0 <sup>*+Ba</sup>	67.1 ± 2.8 <sup>*+Ab</sup>
IGF 200	41.3 ± 2.8 <sup>Ab</sup>	42.1 ± 4.7 <sup>Ab</sup>	56.0 ± 4.8 <sup>Ab</sup>	57.2 ± 4.6 <sup>Ac</sup>

\*: Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) (P<0.05).

+: Denotes values that differ significantly from MEM (P<0.05).

AB: Values with different letters denote significant differences between cultured periods within a given medium (P<0.05).

abcd: Values with different letters denote significant differences among treatments (P<0.05).

## Discussion

Analysis of the expression pattern of mRNA encoding IGF-I demonstrated a progressive increase in the production of IGF-I during the transition from primordial to primary and secondary follicle stages. The presence of IGF-I protein in these follicles, combined with the fact that IGF-I increases the percentage of primary follicles after 7 days of culture, indicates that IGF-I is involved in the control of preantral follicle development in goats. Wandji et al. (1998) showed that IGF-I mRNA levels were lower in mouse primary follicles than in large preantral and antral follicles. Moreover, in granulosa cells of mouse antral follicles, IGF-I mRNA was expressed in a gradient, with greater expression in the cumulus oophorus and in the vicinity of the antrum than in the mural compartment. In the



present study, the greatest level of expression of IGF-I mRNA was observed in the granulosa/theca cells from large antral follicles of goats. In humans, it has been demonstrated that in small antral follicles (1-8 mm), the expression of IGF-I mRNA was restricted to theca cells (El-Roeiy et al 1993). In addition, IGF-I mRNA was also detected in granulosa cells of rat antral follicles (Adashi et al., 1997). Otherwise, Armstrong et al. (2000), using *in situ* hybridization, did not detect IGF-I mRNA in granulosa and theca cells in follicles under different stages of development. Immunohistochemical localization of IGF-I shows that the thecal–interstitial cells of humans are the main sites of IGF-I biosynthesis (Hernandez et al., 1992).

The present study shows new evidence that IGF-I promotes goat ovarian follicle survival and development during 7 days of *in vitro* culture. Maintenance of follicular viability is a prerequisite for the culture of preantral follicles. Our results showed that the addition of IGF-I at 50 ng/ml promoted follicle survival in tissue slices cultured for 7 days, confirmed by histological and fluorescence microscopy analysis. This results suggest that IGF-I acts to prevent atresia. In goats, Zhou and Zhang (2005) demonstrated the stimulatory effect of 100 ng/ml of IGF-I during 9 days of culture on the maintenance of follicular viability. This would be consistent with previous studies that have shown that IGF-I is able to suppress apoptotic DNA fragmentation in cultured rat follicles, acting as an antiapoptotic factor (Chun et al., 1994). On the other hand, in our study, MEM<sup>+</sup> alone or with IGF-I at concentrations of 1, 10, 100 or 200 ng/ml decreased follicular viability after 7 days of culture, compared with follicular viability in MEM<sup>+</sup> with 50 ng/ml of IGF-I. We infer that lower concentrations of IGF-I may be not sufficient for promoting the maintenance of goat follicular survival and that greater concentrations may show a detrimental effect on follicular health.

This study shows an increase in follicular activation during *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue for 7 days independently of growth factor addition, compared with fresh control. Similar results were obtained in previous studies in goat (Martins et al., 2005; 2008; Silva et al., 2006; Matos et al., 2007), cow (Wandji et al., 1996; Braw-Tal and Youssefi, 1997) and baboon (Fortune et al., 1998), in which the number of primordial follicles was dramatically reduced with a concomitant increase in the number of developing follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue. Culture of newborn mouse ovaries in serum-containing media shows that the transition from primordial to subsequent stages can occur spontaneously *in vitro* (Eppig and O'Brien, 1996). It is possible that *in vitro* conditions improve follicle development by providing release of stimulatory factors or cessation of the production of inhibitory factors by stromal, granulosa, or pre-thecal cells. Thus, the culture of ovarian

cortical tissue triggered the *in vitro* spontaneous activation of goat primordial follicles. Yang and Fortune (2002) suggested that the highest doses of insulin in ITS (3.12 and 6.25  $\mu\text{g/ml}$ ), a component of our culture medium, best supported the activation and maintenance of health of bovine primordial follicles. Other studies have shown that the IGF-I knockout mouse has normal follicle development, including the primordial to primary transition, up to the late preantral stage (Baker et al., 1996).

To our knowledge, this is the first study to report an increase in the percentage of goat primary follicles after stimulation with IGF-I (at 10 and 50 ng/ml) during 7 days of *in vitro* culture. A counterpoint to this fundamental role of IGF in goat preantral follicle development is the inhibitory effect of exogenous IGF-I on follicular activation and survival of bovine primordial and primary follicles *in vitro* (Fortune, 2004). Our data suggest that a large amount of intermediate follicles is stimulated to progress to later developmental stages when treated with IGF-I. Another possibility is the fact that the primordial follicle pool is indirectly stimulated to grow into intermediate follicles and from intermediate to primary follicles. In addition, it has been reported that paracrine factors secreted by follicular somatic cells regulate many important aspects of follicular development in mammals (cat: Jewgenow and Pitra, 1993; Albertini et al., 2001, rat Eppig et al., 2002; Eppig, 1991; pig and cow: Miyano, 2003). Thus IGF-I may increase the expression of other growth factors and hormone receptors in primary follicles and hence make them more receptive to those paracrine and autocrine factors, increasing their number. Alternatively, IGF-I may have improved survival of the pre-existing primary follicles. Previous studies have outlined the involvement of IGFBPs in the regulation of IGF-I bioavailability (Perks & Waths, 1996; Armstrong et al., 1998, 2002; Yuan et al., 1998; Monget et al., 2002). In our study, preantral follicles cultured in medium with 10 or 50 ng/ml of IGF-I were expected to be exposed to the actions of IGF-I, since at these concentrations, the regulation of IGF-I by its binding proteins (IGFBPs) would be bypassed, and IGF-I would have the potential to act via its receptors.

In the present study, after 7 days of culture, the greatest follicular diameter was observed after culture with 50 ng/ml of IGF-I, compared with fresh control and other concentrations of IGF-I. This effect may be due to an increased rate of mitosis in granulosa cells and an increase in oocyte size. Similarly, Itoh et al. (2002) reported that the addition of 20 ng/ml of IGF-I to the culture medium increases bovine preantral follicular and oocyte diameter *in vitro*. Stimulation of follicular growth may be due primarily to the greater number of granulosa cells. The physiological roles of IGFs have been well characterized in large antral follicles, but fewer studies have shown the effects of IGFs during earlier stages of

follicular development. IGF-I may be involved in the growth and survival of rapidly growing, large preantral follicles and early antral follicles in mice (Wandji, et al., 1998; Adashi et al., 1997). Moreover, Zhao et al., (2001) demonstrated that rat preantral follicles (140–160  $\mu\text{m}$  in diameter) cultured for 6 days in the presence of IGF-I (at concentrations of 1 and 10 ng/ml) led to a larger size while maintaining normal morphology (Zhao et al., 2001). In a recent study, Thomas et al. (2007) showed that follicular diameter of bovines was increased over control levels by the addition of 50 ng/ml of IGF-I during 6 days of culture. These findings are in agreement with the data presented in the current study.

In conclusion, our findings indicate that both mRNA and protein for IGF-I are expressed in different follicular compartments at various stages of follicle development, indicating that IGF-I is involved in the control of folliculogenesis in goats. In support of these data, *in vitro* studies have demonstrated that culture of goat ovarian cortical slices in medium supplemented with 50 ng/ml of IGF-I promotes follicular survival, follicular growth and primordial to primary follicle transition. These results suggest that IGF-I plays an important role in goat preantral follicle development.

#### Declaration of interest and funding

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work. This work was supported by CNPQ (RENORBIO). Fabricio S. Martins is a recipient of a grant from CAPES (Brazil).

#### Acknowledgements

The authors thank José Leandro da Silva Neto for his technical support in classical histology and all the members of the laboratory (LAMOFOPA), especially Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, whose help and enthusiasm contributed to the execution of this study.

#### References

Adashi EY, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, Gargosky SE, Zhou J & Bondy CA 1997 The Mouse Intraovarian Insulin-Like Growth Factor I System: Departures from the Rat Paradigm. *Endocrinology* **138** 3881-3890.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E & Carabastos MJ 2001 Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121** 647–653.

Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA & Webb R 1998 Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* **139** 2146–2154.

Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO & Webb R 2000 Expression of mRNA encoding IGF-I, IGFII and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology* **165** 101–113

Armstrong DG & Webb R 1997 Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction* **2** 139–146.

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR & Efstratiadis A 1996 Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular Endocrinology* **10** 903–918.

Braw-tal R & Yossefi S 1997 Studies in vivo and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reproduction* **109** 165–171.

Chun SY, Billi H, Furuta I, Tsafiriri A & Hsueh AJ 1994 Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory roles of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **135** 1845–1853.

Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A 2005 Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents, *Reproduction* **130**, 147–56.

Duleba Aj, Spaczynski Rz, Olive DI 1998 Insulin and insulinlike growth factor I stimulate the proliferation of human ovarian thecainterstitial cells. *Fertility and Sterility* **69**, 335–340.

Eppig JJ, Wigglesworth K & Pendola FL 2002 The mammalian oocytes orchestrate the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **99** 2890-2894.

El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **77**, 1411–1418.

Eppig JJ, O'Brien MJ 1996 Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, **54** 197-207.

Eppig JJ 1991 Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cell. *Bioassays* **13(11)** 569-574.

Fortune, JE, Kito S, Wandji AS & Srsen V 1998 Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology* **49** 441–449.

Fortune JE 2003 The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* **78** 135-163.

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

Giudice LC 1992 Insulin-like growth factors and ovarian development. *Endocrine Reviews* **13** 641–669.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I & Webb R 2000 Growth and antrum formation of bovine antral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction* **62** 1322–1328.

Hatey F, Langlois I, Mulsant I, Bonnet A, Benne F & Gasser F 1992 Gonadotropins induce accumulation of insulin-like growth factor I mRNA in pig granulosa cells *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology* **86** 205-211.

Hernandez ER, Hurwitz A & Vera A 1992 Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **74**, 419–425.

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.

Jewgenow K & Pitra C 1993 Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology* **39** 527–535.

Leeuwenberg BR, Hurst PR & McNatty KP 1995 Expression of IGF-I messenger-RNA in the ovine ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* **15** 251–258.

Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues AP, Figueiredo JR, Bao SN, Silva JR & Goncalves PB 1999 Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science* **56(3-4)** 223–36.

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.

Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JE Jr, Silva JRV, Celestino, J JH, 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.

Martins FS, Van den Hurk R, Santos RR, Silva JRV, Matos, MHT, Celestino JJH, Rodrigues, APR, Pessoa C, Ferreira FVA & Figueiredo JR 2005 Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in minimal essential médium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction* **2** 106–113.

Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha-Junior CMC, Lima-Verde IB, Lucci CM, Bão SN & Figueiredo JR 2008 Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression

to secondary follicles. *Reproduction Fertility and Development* **20** 916–924.

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

Miyano T 2003 Bringing up small oocyte to eggs in pig and cows. *Theriogenology* **59** 61–72.

Monget P & Bondy C 2000 Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Molecular Cellular Endocrinology* **163** 89–93.

Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C & Monniaux D 2002 Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* **23** 139–154.

Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA & Clayton RN 1989 Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* **1241** 2671–2679.

Perks CM, Denning-Kendall PA, Gilmour RS & Wathes DC 1995 Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology* **136** 5266–5273.

Perks CM, Peters AR & Wathes DC 1999 Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* **116** 157–165.

Perks CM & Wathes DC 1996 Expression of mRNAs for insulin-like growth factor binding proteins-2, -3 and -4 in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* **151** 241–249.

Spicer LJ & Echternkamp SE 1995 The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* **12** 223–245.

Spicer LJ, Hanrahan JP, Zavy MT & Enright WJ 1993 Relationship between ovulation rate and concentrations of insulin-like growth factor-I in various genotypes of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* **97** 403-409.

Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Báo SN, Costa SHF, Santos RR & Figueiredo JR 2000 Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. *Theriogenology* **54** 809–822.

Silva JRV, Van Den Hurk R, Matos MHT, Santos RR, Pessoa C, Moraes MO, Figueiredo JR 2004 Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* **61** 1691–1704.

Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, Van der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR & Van den Hurk R 2006 The activin–follistatin system and *in vitro* early development in goats. *Journal of Endocrinology* **189** 113–125.

Steel RGD, Torrie JH & Dickey DA 1997 Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3<sup>rd</sup> Ed. McGraw-Hill, New York: p 666.

Thomas FH, Campbell BK, Armstrong DG & Telfer EE 2007 Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction* **133** 1121–1128.

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

Van tol HT, Bevers MM 1998 Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development* **51** 3 315-321.

Wandji SA, Wood TL, Crawford J, Levison SW & Hammond JM 1998 Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology* **139** 5205–5214.



Webb R & Armstrong DG 1998 Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science* **53** 95–112.

Woad KJ, Baxter G, Hogg CO, Bramley TA, Webb R & Armstrong DG 2000 Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* **120** 293–302.

Yang MY & Fortune JE 2002 Insulin and insulin-like growth factor I exert opposite effects on the activation of bovine primordial follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction* **66**(1)111.

Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS & Lucy MC 1998 Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domestic Animal Endocrinology* **15**(1) 55–63.

Zhao J, Tavene MAM, Van der Weijden GC, Bevers MM & Van Den Hurk R 2001 Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* **58** 287–296.

Zhou J, Chin E & Bondy C 1991 Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* **129** 3281–3288.

Zhou H & Zhang Y 2005 Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes. *Animal Reproduction Science* **90** 265–272.

## **8 CAPÍTULO 3**

### **Expressão do Receptor do Hormônio do Crescimento (GH-R) em Folículos Ovarianos Caprinos e Influência do GH sobre a Sobrevivência e o Desenvolvimento *in vitro* de Folículos Pré-antrais**

### Resumo Artigo – GH

O objetivo deste estudo foi verificar a expressão da proteína e do RNAm para o receptor do GH (GH-R) em folículos ovarianos caprinos, e investigar os efeitos do GH sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais. Os folículos ovarianos foram submetidos aos procedimentos de isolamento para o estudo da expressão do RNAm para o GH-R e localização do GH-R utilizando análise imunohistoquímica. Fragmentos de córtex ovariano foram cultivados por 7 dias em MEM<sup>+</sup> na presença de diferentes concentrações de GH (1-200 ng/ml). Elevados níveis de expressão de RNAm foram observados nas células da teca e da granulosa de grandes folículos antrais. As análises imunohistoquímica demonstraram a expressão do GH-R em oócitos e células da granulosa de folículos antrais. Elevadas taxas de folículos viáveis e intermediários foram observados após 7 dias de cultivo em MEM<sup>+</sup> adicionado de 10 ng/ml de GH. Concluindo, tanto o RNA mensageiro como as proteínas para o receptor do GH foram expressos em folículos antrais caprinos. Além disso, o GH promove a manutenção da sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos e o desenvolvimento de folículos primordiais.

Palavras-chave: Ativação, Caprinos, Folículos pré-antrais, Cultivo, GH.

## Growth Hormone Receptor (GH-R) Expression in Goat Ovarian Follicles and Growth Hormone (GH) Influence on *in vitro* Development and Survival of Preantral Follicles

F. S. Martins, M.S., M.V.A. Saraiva, M.S., D.M. Magalhães, M.S., A.P. Almeida, M.S., J.J.H. Celestino, M.S., R.M.S. Cunha, PhD, J.R.V. Silva, PhD, C.C. Campello, PhD, J.R. Figueiredo, PhD.

From the Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza 60740-000, CE, Brazil (FSM, MVAS, DMM, APA, JJHC, CCC, JRF) and Biotechnology Nucleus of Sobral (NUBIS)– Federal University of Ceará, Av. Geraldo Rangel, 100/186, Sobral 60041-040, CE, Brazil (RMSC, JRVS)

Address correspondence to: F.S. Martins, 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 Itaperi. Fortaleza-CE, CEP: 60740-000, Brazil. Tel.: +55.85. 3101.9860; Fax: +55.85.3101.9840.

E-mail address (author): F.S. Martins: fabricio@netbandalarga.com.br

E-mail address (co-authors): M.V.A. Saraiva: vivi\_veterinaria@yahoo.com.br; D.M. Magalhães: dmmvet@hotmail.com; A.P. Almeida: anderson\_almeida@click21.com.br; J.J.H. Celestino: juliana\_jales@yahoo.com.br; R.M.S. Cunha: rmaranguape@gmail.com; J.R.V. Silva: roberto\_viana@yahoo.com; C.C. Campello: cccampello@yahoo.com.br; J.R. Figueiredo: jrfig@pq.cnpq.br.

### Abstract

This study aimed to demonstrate the expression of *GH-R* mRNA and protein in goat ovarian follicles, in order to investigate the effects of GH on the survival and development of preantral follicles. Ovaries were processed for the isolation of follicles to study *GH-R* mRNA expression or to localization of GH-R by immunohistochemical analysis. Pieces of ovarian cortex were cultured for 7 days in MEM<sup>+</sup>, with GH at different concentrations (1-200 ng/ml). High expression levels of *GH-R* mRNA were observed in granulosa/theca cells from large antral follicles. Immunohistochemistry demonstrated that the GH-R protein was expressed in the oocytes/granulosa cells of antral follicles. The highest rate of viable follicles and intermediate follicles was observed after 7 days in MEM<sup>+</sup> plus 10 ng/ml GH. In conclusion, *GH-R* mRNA and protein are expressed in antral follicles. Moreover, GH maintains the survival of goat preantral follicles and promotes the development of primordial follicles.

Keywords: Activation, Culture, *In vitro*, Caprine

## Introduction

Folliculogenesis in the mammalian ovary is one of the most intricately regulated development processes in biology. Shortly after birth, a subset of primordial follicles is selected from a resting pool of quiescent follicles to undergo follicular activation and growth. Follicular activation is characterized by oocyte growth and the transition of squamous to cuboidal granulosa cells, which signals the growing pool of follicles and is followed by granulosa cell proliferation.<sup>1,2</sup> In this article, preantral follicles are defined as the group of follicles (primordial, intermediate, primary and secondary) that precede the antral stage.

Ovarian follicular development and growth are controlled by pituitary gonadotrophins, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), and by local factors, such as steroid hormones and growth factors.<sup>3</sup> The possibility that growth hormone (GH) may act in ovarian follicles is supported by the detection of growth hormone receptor (GH-R) immunoreactivity and mRNA encoding GH-R in ovarian tissue in humans<sup>4</sup> and cows.<sup>5</sup> Indeed, GH-R immunoreactivity has also been detected in the granulosa cells, thecal cells and luteal cells of bovine species.<sup>5</sup> GH is known to promote various ovarian activities. Some *in vitro* data suggest that GH plays a role in follicular growth during the early gonadotropin-independent folliculogenesis and could have a direct inhibitory action on follicle apoptosis.<sup>6-8</sup> *In vitro* studies in mice showed a stimulatory effect of GH on preantral follicle development and on follicular cell proliferation in immature mice that was synergistic with IGF-I.<sup>9-11</sup> Ovarian and hepatic IGF-I appear to be involved in some, but not all, of these actions in some species. GH may thus be particularly important in the recruitment of follicles and the initiation of oocyte growth, perhaps by matching nutritional status with the number of growing oocytes.<sup>12</sup> Slot et al<sup>2</sup> demonstrated that, in mice deficient in both GH-R and GH binding protein (GHBP), the number of primordial follicles was elevated, whereas those of primary, secondary and antral follicles were very low. In addition, the reduced number of growing follicles was accompanied by a significant increase in the percentage of atretic follicles. In another *in vitro* study, Zhao et al<sup>13</sup> demonstrated in rats that follicles cultured in GH-containing treatment had significant development and showed a better ultrastructure in comparison with those cultured in treatment without GH. With regard to the oocyte, *in vitro* maturation of bovine oocytes by the culture of cumulus–oocyte complexes (COCs) from small- to medium-sized follicles in treatment that was supplemented with GH accelerated the process of germinal vesicle breakdown (GVB).<sup>14</sup> In addition, GH has been shown to enhance cell proliferation and steroidogenesis of cultured granulosa cells in rat<sup>15</sup> and in cattle<sup>16</sup>,

pointing out an important role for GH in the regulation of follicular growth. Although some GH ovarian actions have been well-analyzed in some mammalian species, little is known about the direct action of GH on the development of caprine preantral follicles and about the gene expression profiles of GH-R.

The current challenges for obtaining follicle development *in vitro* are numerous and include: 1) the optimization of cultured media and environments to match the physiological needs of follicles *in vivo*; 2) the maintenance of cell-cell communication and signaling during culture; and 3) the maintenance of the genetic health and fertility of *in vitro* derived, mature oocytes. In an attempt to better understand folliculogenesis and to improve the development of a culture system for goat preantral follicles, the present study was designed to: 1) evaluate the expression of the GH-R during different stages of follicle development and 2) investigate a possible influence of different concentrations of GH on the survival, activation and growth of goat preantral follicles that have been cultured *in vitro*.

## **Materials and methods**

### **Chemicals**

GH was purchased from Cell Sciences (Canton, MA, USA) and unless mentioned otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

### **Ovaries**

During the breeding season, ovaries (n=40) were recovered from slaughtered cyclic adult mixed-breed goats and transported to the laboratory in a thermos flask within 1 h. Thirty of those ovaries were used to recover cells and tissues for RT-PCR. The remaining 10 ovaries were fixed overnight at room temperature in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), and subsequently dehydrated and embedded in paraffin wax (Histoplast; Shandon Scientific Ltd, Pittsburgh, PA, USA) in preparation for immunohistochemical studies.

## Messenger RNA expression of GH-R in goat follicles

To evaluate mRNA expression, ovaries (n=30) were collected and rinsed in saline solution (0.9% NaCl) containing antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), after which ten of them were used for the isolation of primordial, primary and secondary follicles. The remaining ovaries were used for the collection of COCs, mural granulosa and thecal cells from small and large antral follicles. Primordial, primary and secondary preantral follicles were isolated by the mechanical procedure described previously.<sup>17</sup> After isolation, these follicles were washed several times to remove the stromal cells completely and then were placed by category into separate Eppendorf tubes in groups of ten. This procedure was completed within 2 h, and all samples were stored at -80°C until the RNA was extracted.

From a second group of ovaries (n=20), COCs were aspirated from small (1–3 mm) and large (3–6 mm) antral follicles. From the follicle content, compact COCs were selected as described by van Tol and Bevers.<sup>18</sup> Thereafter, groups of 10 COCs were stored at -80°C until RNA extraction. To collect mural granulosa and theca cells, small (n=10) and large antral follicles (n=10) were dissected from stromal tissue with forceps, as described previously.<sup>18</sup> The follicles were then bisected, and the mural granulosa/theca were collected and stored at -80°C.

Isolation of total RNA was performed using Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brazil). As per the manufacturer's instructions, 1 mL of Trizol solution was added to each frozen sample, and the lysate was centrifuged at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and introduced to a mini column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/ml) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 µl RNase-free water.

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for 5 min at 70°C and chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20 µl made up of 10 µl of sample RNA, 4 µl 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen), 8 units RNaseOUT, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 units random primers (Invitrogen), 10 mM DTT and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 hour at 42°C, for 5 min at 80°C and then stored at -20°C. Minus RT blanks were prepared under the same conditions but without the inclusion of reverse transcriptase.

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of goat cells and tissues.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense	Position	GenBank accession n.
GH-R	TGGAATACTTGGGCTAACAGTGAC	s	35-59	GI:151414695 (2007) <i>Capra hircus</i> GHR
	TCCTTCCTTGAGGAGATCTGGA	as	167-189	
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	s	287-309	GI: 27525390 (2005) <i>Capra hircus</i> GAPDH
	ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	as	440-462	
Beta-Actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	s	187-211	GI: 28628620 (2003) <i>Capra hircus</i> Beta-Actin
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTC	as	386-410	

s: sense; as: antisense

Quantification of *GH-R* mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were carried out using 1 µl cDNA as a template in 7.5 µl of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 µl of ultra-pure water and 0.5 µM of each primer. The primers were designed to perform the amplification of *GH-R* mRNA. *GAPDH* and  $\beta$ -*actin* were used as endogenous controls in order to perform the normalization of gene expression (Table 1).

The thermal cycling profile for the first round of PCR was an initial denaturation and activation of the polymerase for 15 min at 94°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 45 sec at 72°C. The final extension was 10 minutes at 72°C. All reactions were performed in a Mastercycler real time PCR (Eppendorf, Germany).

#### Protein localization of GH-R in goat follicles

The localization of GH-R protein was performed on serial 5-µm sections cut from the ovaries (n=10) of 5 different goats. These sections were mounted on poly-L-lysine-coated slides, dried overnight at 37°C, deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded ethanol series. Endogenous peroxidase was blocked by incubating the deparaffinized sections in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min. The sections were then washed with PBS, and the epitopes were activated by microwaving the sections for 7 min at 900 W in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0). After microwave treatment, the sections were washed in PBS/0.05% Tween (PBS-T) before being incubated for 30 min with 5% normal goat serum in PBS to minimize non-specific binding. The sections were then incubated with polyclonal anti GH-R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) that was diluted 1:50. After this incubation,



sections were washed 3 times with PBS and incubated for 45 min with biotinylated secondary antibody (anti-rabbit IgG from Santa Cruz Biotechnology) that was diluted 1:200 in PBS containing 5% normal goat serum. The sections were then washed 3 times in PBS-T before being incubated for 45 min with an avidin–biotin complex (1:600-Vectastain Elite ABC kits; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The sections were then washed 3 times in PBS and stained with diaminobenzidine (0.05% DAB in Tris/HCl, pH 7.6, and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Sigma tablets) for a maximum of 10 min. The stained sections were rinsed in PBS and water and counterstained for 10 sec in Mayer's hematoxylin. Finally, the sections were washed for 10 min in running tap water, subsequently dehydrated in a graded ethanol series followed by xylene treatment and mounted for histological evaluation. The staining intensity was scored as follows: absent (–), weak (+), moderate (++) or strong (+++).

Controls for non-specific staining were performed by replacing the primary antibody with IgGs from the same species in which the specific antibody was raised, at the same concentration, and by incubation with diaminobenzidine reagent alone to exclude the possibility of non-suppressed endogenous peroxidase activity. For the immunohistochemical analysis, the follicles were classified as later described for the culture.

#### *In vitro* culture of ovarian tissue and morphological evaluation

Ovaries (n=10) from five adult (1–3 years old), non-pregnant, mixed breed goats were collected at a local slaughterhouse. The animals were cyclic and in good body condition. Immediately after the death of the animals, the ovaries were washed in 70% alcohol followed by two washes in 0.9% saline solution. The pair of ovaries from each animal was transported to the laboratory in 20 ml of Minimum Essential Medium (MEM) that was supplemented with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (0.25 µg/ml) within 1 h at 33°C. In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments. Moreover, the medulla, visible growing follicles and corpora lutea were removed. The ovarian cortex of each pair of ovaries was then divided into 13 fragments (approximate size 3 x 3 mm, with 1 mm thickness) using a needle and scalpel under sterile conditions. One fragment was taken randomly and immediately fixed for histological examination (control). The 12 remaining fragments were placed individually in 24-well culture dishes, with each well containing 1 ml of culture medium. They were cultured for 1 and 7 days at 39°C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub>. The medium used was MEM (osmolarity: 300 mOsm/l, pH: 7.2; Sigma) supplemented with ITS (6.25 µg/ml insulin, 6.25 µg/ml transferrin and 6.25 ng/ml selenium), 0.23 mM

pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/ml BSA , which was called MEM<sup>+</sup>. The ovarian cortex fragments were cultured in MEM<sup>+</sup> alone or MEM<sup>+</sup> containing different concentrations of GH (1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml). Each treatment was repeated five times, and the culture media was changed every two days.

#### Morphological analysis and assessment of *in vitro* follicular growth

Immediately after fragmentation, representative pieces of ovarian cortex were immersion-fixed for 12 h in 10% neutral buffered formaldehyde (pH 6.8-7.2) to serve as non-cultured control (fresh control). After 1 or 7 days of culture in each treatment, the pieces of ovarian cortex were fixed as described above, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. The samples were sectioned (7 µm thick), mounted on charged slides and then allowed to dry overnight at 37°C before staining with Periodic Acid Schiff and hematoxylin. Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded, anonymous slides were examined on a microscope (Nikon, NY, USA) under 400X magnification.

The developmental stages of follicles have been defined previously (Silva et al., 2004) as primordial (oocyte surrounded by a few flattened granulosa cells) or developing follicles, which include intermediate (oocyte surrounded by flattened granulosa cells and at least one cuboidal granulosa cell), primary (oocyte surrounded by a complete layer of cuboidal granulosa cells) or secondary (oocyte surrounded by two or more complete layers of cuboidal granulosa cells). Primordial and developing follicles were classified as morphologically normal (follicles containing an intact oocyte and granulosa cells that are well-organized in layers without pyknotic nucleus) and degenerated (oocyte with pyknotic nucleus, retracted cytoplasm or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane).<sup>19</sup>

The percentages of primordial and developing follicles were calculated on day 0 (control) and after 1 or 7 days of culture in each treatment. Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x 5 repetitions = 150 follicles). In addition, follicular and oocyte diameter (n=20 for each treatment) was taken using only normal follicles from day 0 and after culture. The follicle diameter was recorded from edge to edge of the granulosa cell membrane or from the outside edge of the theca cell layer when present. Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded for each, and the average of these two values was reported as the follicle and oocyte diameters, respectively. It is important to note

that only follicles with a visible oocyte nucleus were evaluated in order to avoid double counting.

#### Assessment of preantral follicle viability

A viability study using an experimental protocol similar to that described in the above morphological investigation was performed with the aim of analyzing the effects of caprine ovarian tissue culture on the viability of preantral follicles. Based on the results of morphological analysis, the viability of follicles was further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes. Additional pairs of ovaries (n=4) were cut into 18 fragments, from which six (n=6) were immediately processed for follicle isolation. The remaining fragments were cultured for 7 days, under the same conditions described above, in MEM<sup>+</sup> alone or MEM<sup>+</sup> containing 10 ng/ml of GH.

After culture, goat preantral follicles were isolated from ovarian fragments using the mechanical method described previously by Lucci et al.<sup>17</sup>

Isolated preantral follicles were analyzed using a two-color fluorescence cell viability assay that was based upon the simultaneous determination of live and dead cells by calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively. While the first probe detected the intracellular esterase activity of viable cells, the latter labeled nucleic acids of non-viable cells that had 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 100  $\mu$ L of the suspension containing isolated follicles, followed by an incubation at 37°C for 15 min. After labeling, follicles were washed once by centrifugation at 100 x g for 5 min, resuspended in MEM<sup>+</sup>, mounted on a glass microscope slide in 5  $\mu$ L antifading medium (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Germany) to prevent photobleaching and finally examined using an a DMLB fluorescence microscope (Leica, Solms, Germany). The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered live if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if the chromatin was not labeled with ethidium homodimer (red).

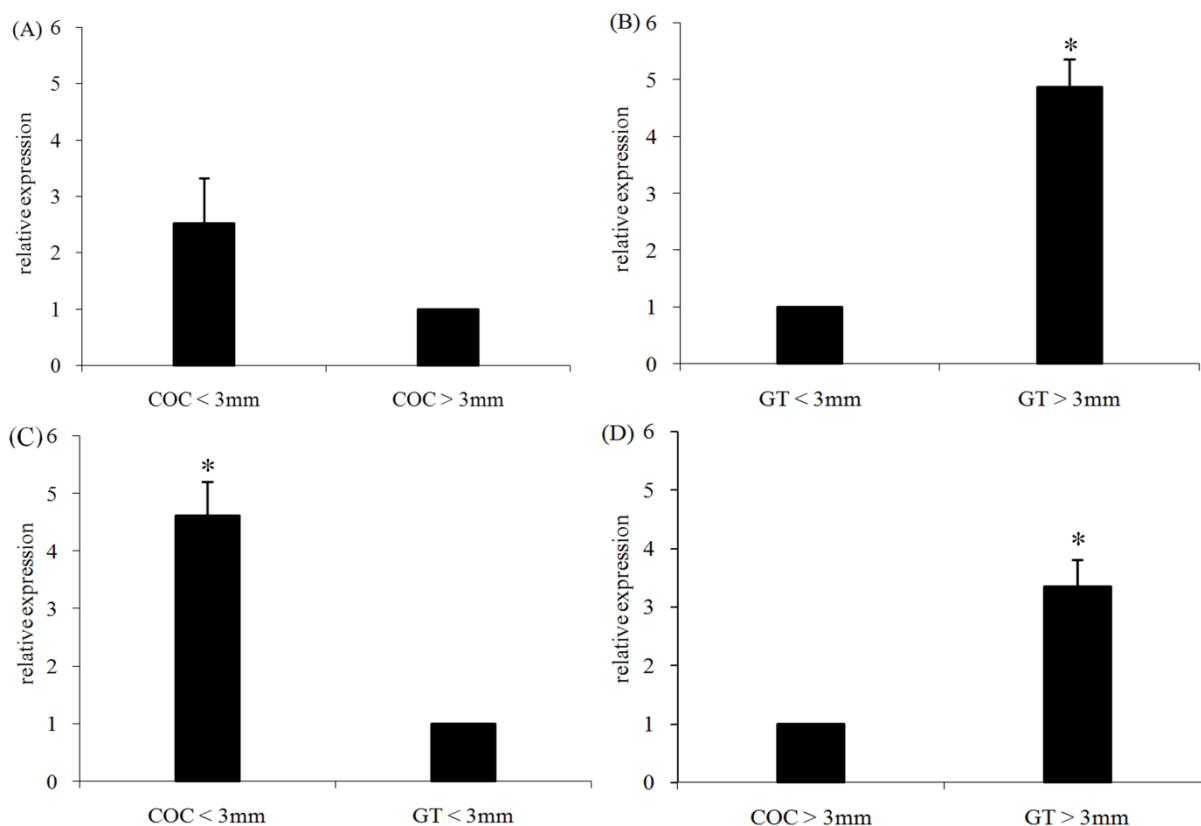
## Statistical analysis

The mRNA expression data in COCs and granulosa/theca cells from small and large antral follicles were analyzed by paired *t* test ( $P < 0.05$ ). For *in vitro* studies, data were analyzed statistically as follows. Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests were applied to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Analysis of variance was then made using the GLM procedure of SAS (1999), and Dunnett's test was applied for comparison of control groups against each treatment tested<sup>20</sup>. The SNK test was used to compare different concentrations of GH and days of culture. Differences amongst groups were considered significant when  $P < 0.05$ , and the results were expressed as means  $\pm$  standard deviation.

## Results

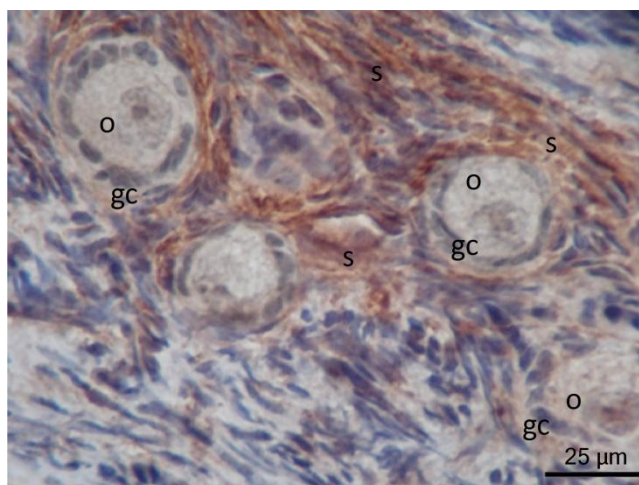
### Messenger RNA and protein expression for GH-R in goat ovarian follicles

Amplification of cDNA from primordial, primary and secondary follicles did not produce any PCR product, indicating that these follicles do not express mRNA for GH-R. In contrast, GH-R mRNA was expressed at similar levels in COCs that were collected from small and large antral follicles ( $P > 0.05$ ; Fig. 1A). In addition, a higher expression of GH-R mRNA was observed in granulosa/theca cells from large antral follicles when compared with small antral follicles ( $P < 0.05$ ; Fig. 1B). When the expression of GH-R was compared between COCs and granulosa/theca cells, real time PCR showed that, for small antral follicles, COCs produce significantly more GH-R mRNA than their respective granulosa/theca cells ( $P < 0.05$ ; Fig. 1C). In large antral follicles, however, an inversion in the production of GH-R mRNA was observed, since granulosa/theca cells expressed relatively more GH-R mRNA than the COCs ( $P < 0.05$ ; Fig. 1D).

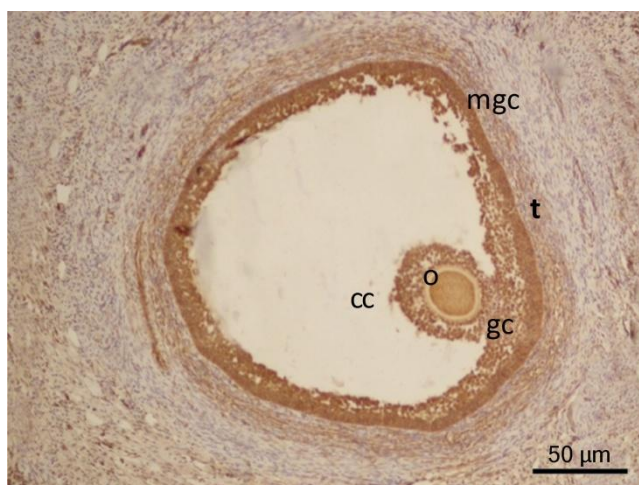


**Figure 1.** Expression of GH-R mRNA in goat ovarian follicles (means  $\pm$  SEM). (A) COCs from small and large antral follicles. (B) Granulosa/theca cells from small and large antral follicles. (C) COCs and granulosa/theca cells from small antral follicles. (D) COCs and granulosa/theca cells from large antral follicles.

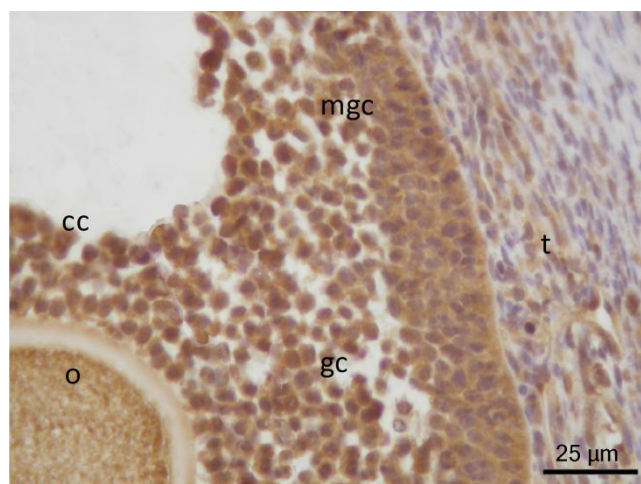
Immunohistochemical studies were performed in order to evaluate the expression of the GH-R protein in follicular compartments. It was confirmed that GH-R is not present in the oocytes nor the granulosa/theca cells of preantral follicles (Fig. 2). However, a strong immunostaining for GH-R was observed in the stromal cells surrounding these follicles, which suggested that GH can control the earliest stages of folliculogenesis indirectly (Fig. 2). On the other hand, a strong immunoreaction for GH-R was observed in the oocytes, cumulus cells and mural granulosa cells of small (Fig. 3) and large (Fig. 4) antral follicles, while the theca cells had a moderate reaction. Interestingly, except in the blood vessels, the stromal tissue around the antral follicles did not stain for GH-R (Fig. 3).



**Figure 2.** GH-R immunoreactivity in goat ovarian stroma tissue around preantral follicles. o: oocyte, gc: granulosa cells, s: stromal cells. Scale bars represent 25  $\mu$ m.



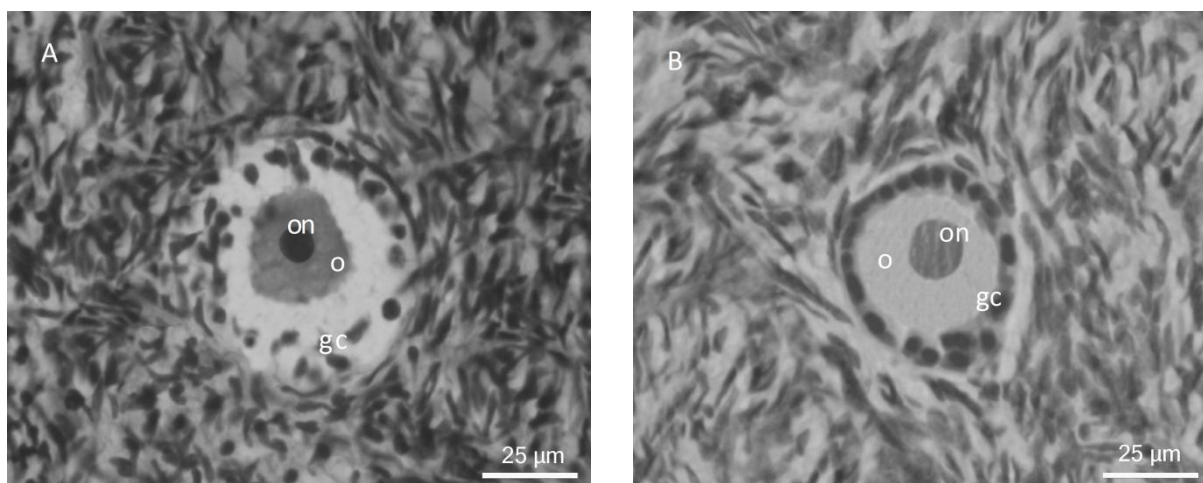
**Figure 3.** GH-R immunoreactivity in goat small antral follicles. o: oocyte, gc: granulosa cells, cc: cumulus cells, mgc: mural granulosa cells, t: theca cells. Scale bars represent 50  $\mu$ m.



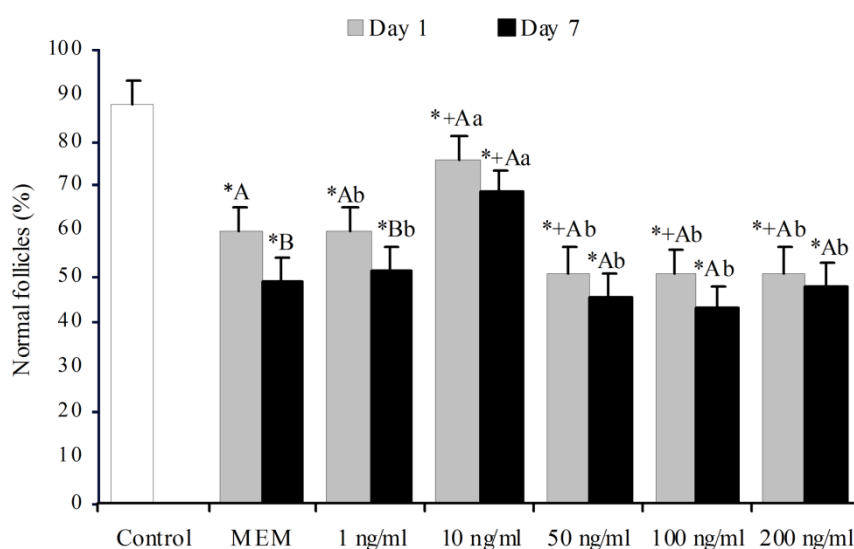
**Figure 4.** GH-R immunoreactivity in goat large antral follicles. o: oocyte, gc: granulosa cells, cc: cumulus cells, mgc: mural granulosa cells, t: theca cells. Scale bars represent 25  $\mu$ m.

#### Effect of GH on *in vitro* survival of preantral follicles

Histological analysis showed that degenerated (Fig. 5A) and normal (Fig. 5B) follicles were found in cultured ovarian cortical pieces. In the degenerated follicles, a shrunken oocyte, a pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells were observed. A total of 1,950 follicles were counted to evaluate follicular morphology, activation and growth. Figure 6 shows the percentage of normal follicles in non-cultured (day 0, fresh control) ovarian cortical pieces and after 1 or 7 days of culture in different media. Ovarian tissue culture, in all media tested, significantly reduced ( $P < 0.05$ ) the percentage of normal follicles when compared to fresh tissue (85.4%). After 1 day of culture, the addition of 50, 100 and 200 ng/ml of GH significantly decreased ( $P < 0.05$ ) the percentage of histologically normal follicles when compared with  $\text{MEM}^+$  alone. In contrast, after 1 and 7 days, the number of normal follicles observed was the highest in the presence of 10 ng/ml GH when compared with the other concentrations that were tested (1, 50, 100 and 200 ng/mL GH), including  $\text{MEM}^+$  ( $P < 0.05$ ). The increase of the culture period from 1 to 7 days significantly reduced ( $P < 0.05$ ) the percentage of intact follicles only in tissues cultured in  $\text{MEM}^+$  and  $\text{MEM}^+$  plus 1 ng/ml of GH.



**Figure 5.** Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid-Schiff-hematoxylin, showing degenerated primary follicles (A) and normal primary follicles (B). o, oocyte; on, oocyte nucleus; gc, granulosa cells. Scale bars represent 25 µm.



**Figure 6.** Percentages of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus 1, 10, 50, 100 or 200 ng/ml GH.

\* : Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) (P<0.05).

+ : Denotes values that differ significantly from MEM<sup>+</sup> (P<0.05).

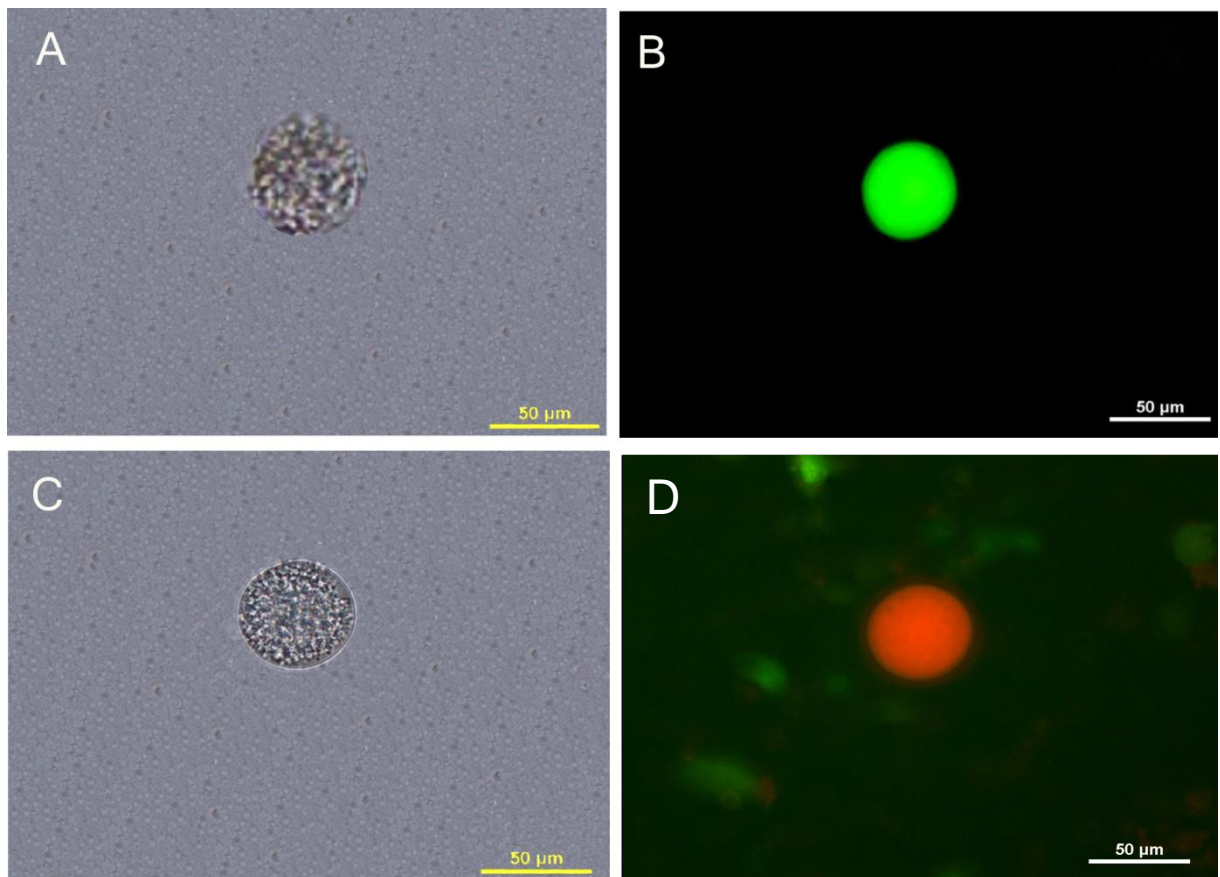
AB: Values with different letters denote significant differences between cultured periods within a given media (P<0.05).

abc: Values with different letter denote significant differences among treatments (P<0.05).



### Viability assessment of follicles after culture

Based on the results of morphological evaluation, goat preantral follicles were isolated from fresh control and from ovarian fragments cultured for 7 days with 10 ng/mL of GH, and a viability trial using these treatments was performed. A fluorescence cell viability assay based on the labeling of live and dead cells by calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively, was employed. Viable and non-viable preantral follicles after *in vitro* culture are shown in Figure 7A-D. The percentage of viable follicles after seven days of culture was similar between MEM<sup>+</sup> (91.05%) and GH (92.4%).

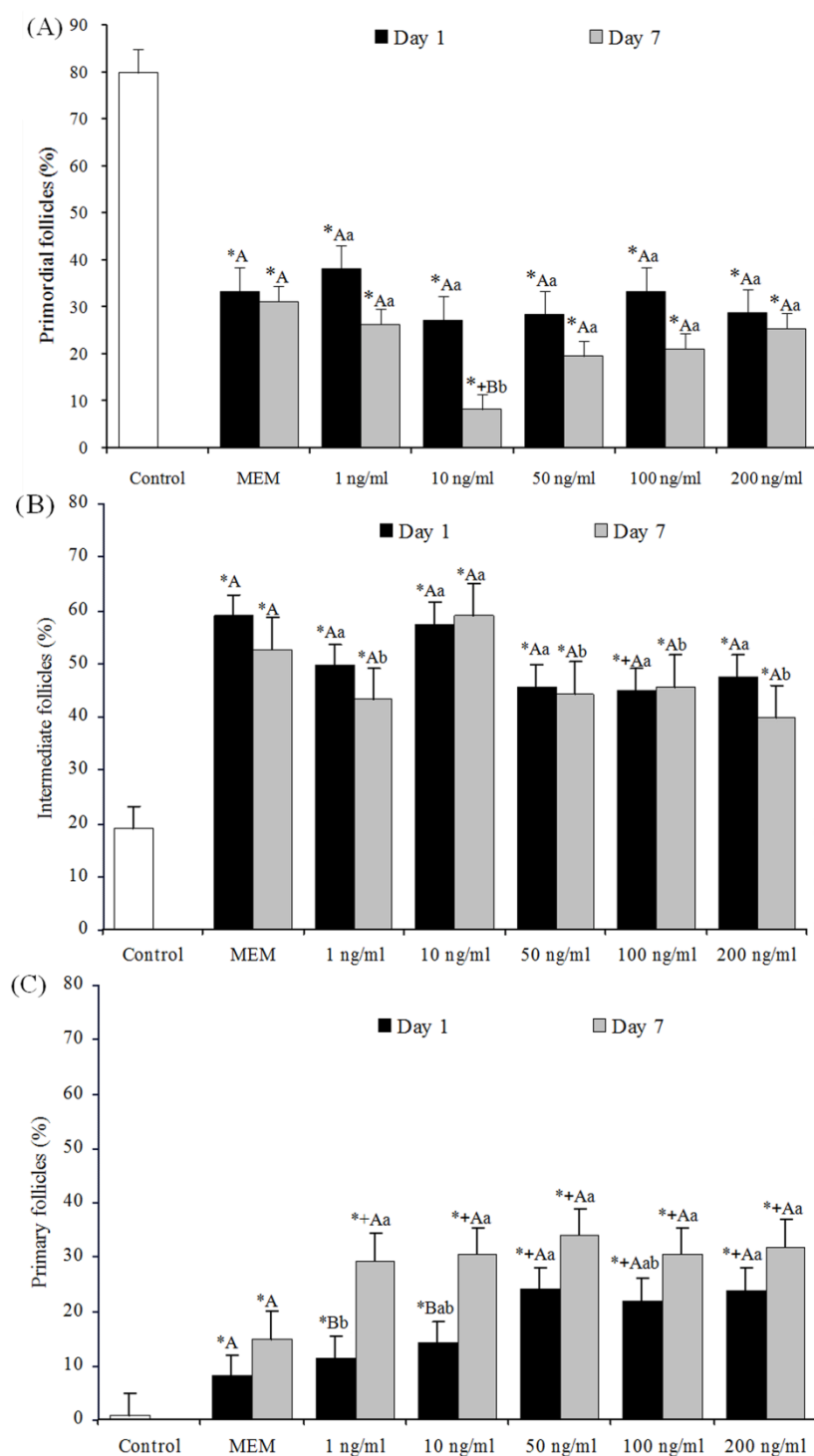


**Figure 7.** Mechanically isolated follicles visible under a fluorescence microscope after fluorescence labeling for follicle viability with calcein-AM and ethidium homodimer-1. Follicles from ovarian tissue that was cultured in MEM<sup>+</sup> containing 10 ng/ml of GH for 7 days (A, B) and MEM<sup>+</sup> alone (C, D), which are visible through by light microscopy (A, C) and fluorescence microscopy (B, D).

### Goat primordial follicle activation and growth during *in vitro* culture

In fresh tissues, the percentages of primordial, intermediate, primary and secondary follicles were 79.7, 18.9, 0.6 and 0.6% respectively. After 1 or 7 days of culture in all media tested, the percentage of primordial follicles (Fig. 8A;  $P < 0.05$ ) was significantly reduced compared to non-cultured tissue. In contrast, there was a significant and concomitant increase in the percentage of intermediate (Fig. 8B;  $P < 0.05$ ) and primary (Fig. 8C;  $P < 0.05$ ) follicles in all treatments tested after 1 or 7 days of culture when compared with fresh control. Furthermore, cortical tissue that was cultured in MEM<sup>+</sup> plus 10 ng/ml of GH for 7 days had the lowest percentage of primordial follicles (Fig. 8A;  $P < 0.05$ ) and the highest percentage of intermediate follicles (Fig. 8B;  $P < 0.05$ ). When compared with MEM<sup>+</sup> alone, all GH concentrations (except 10 ng/ml) promoted the maintenance of the percentage of primordial follicles after 1 or 7 days. The percentage of secondary follicles was not compared due to the insufficient number of follicles for statistic analyses.

With regard to the progression of the culture period from day 1 to 7, a significant decrease in the percentage of primordial follicles was observed only in MEM<sup>+</sup> plus 10 ng/ml of GH (Fig. 8A;  $P < 0.05$ ). In addition, there was a significant increase in the percentage of primary follicles in 1 and 10 ng/ml of GH (Fig. 8C;  $P < 0.05$ ), while the other treatments tested did not increase the percentage of primary follicles.



**Figure 8.** Percentages of primordial (A), intermediate (B) and primary (C) follicles in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM<sup>+</sup> medium and MEM<sup>+</sup> plus different concentrations of GH. \*: Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) (P<0.05). +: Denotes values that differ significantly from MEM<sup>+</sup> (P<0.05). AB: Values with different letters denote significant differences between

cultured periods within a given media ( $P<0.05$ ). abc: Values with different letters denote significant differences among treatments ( $P<0.05$ ).

After 7 days of culture in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> containing 1, 10 and 50 ng/ml of GH, a significant increase in follicle diameter was seen when compared with non-cultured tissue (Table 2;  $P<0.05$ ). With the progression of the time of culture from 1 to 7 days, there was a significant increase in the follicle diameter in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus 10 and 50 ng/ml of GH ( $P<0.05$ ). Nevertheless, MEM<sup>+</sup> plus GH at 10 ng/ml, after 7 days of culture, promoted the highest ( $P<0.05$ ) follicle diameter when compared to the other treatments and MEM<sup>+</sup>.

Table 2. Oocyte and follicle diameter in non-cultured tissues (fresh control) and in tissues cultured for 7 days in MEM<sup>+</sup> (control medium) and MEM<sup>+</sup> supplemented with various concentrations of GH.

	Oocyte diameter ( $\mu\text{m}$ )		Follicle diameter ( $\mu\text{m}$ )	
Non-cultured	$36.4 \pm 3.1$		$45.2 \pm 3.1$	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
MEM <sup>+</sup>	$30.9 \pm 3.9$ * <sup>B</sup>	$39.4 \pm 2.8$ <sup>A</sup>	$45.8 \pm 5.0$ <sup>B</sup>	$53.7 \pm 2.3$ * <sup>A</sup>
GH 1	$31.8 \pm 4.3$ * <sup>Ba</sup>	$38.3 \pm 5.3$ <sup>Aa</sup>	$51.5 \pm 4.6$ * <sup>+Aa</sup>	$54.1 \pm 3.8$ * <sup>Ab</sup>
GH 10	$30.2 \pm 3.3$ * <sup>Ba</sup>	$39.3 \pm 5.0$ <sup>Aa</sup>	$48.6 \pm 3.7$ <sup>Ba</sup>	$60.7 \pm 4.4$ * <sup>+Aa</sup>
GH 50	$29.2 \pm 2.3$ * <sup>Ba</sup>	$36.8 \pm 5.6$ <sup>Aa</sup>	$42.0 \pm 3.6$ <sup>Bb</sup>	$51.7 \pm 2.4$ * <sup>+Ab</sup>
GH 100	$30.9 \pm 4.5$ * <sup>Aa</sup>	$29.8 \pm 5.7$ * <sup>+Ab</sup>	$45.1 \pm 3.3$ <sup>Ab</sup>	$45.9 \pm 3.1$ <sup>+Ac</sup>
GH 200	$31.0 \pm 4.2$ * <sup>Aa</sup>	$29.6 \pm 4.6$ * <sup>+Ab</sup>	$44.6 \pm 2.4$ <sup>Ab</sup>	$45.0 \pm 3.1$ <sup>+Ac</sup>

\* Differs significantly from non-cultured tissue ( $P<0.05$ ).

<sup>+</sup> Differs significantly from MEM<sup>+</sup> ( $P<0.001$ ).

a, b, c – Values within columns with different letters among treatments are significantly different ( $P<0.001$ ).

AB: Values with different letters denote significant differences between cultured periods within a given media ( $P<0.05$ ).

## Discussion

The current study demonstrated, for the first time, that GH-R is expressed in goat ovarian follicles and that GH promotes preantral follicle survival and development during a 7-day culture period. Amplification of cDNA from goat primordial, primary and secondary follicles showed that these follicles do not express *GH-R* mRNA. Similarly, Sharara and Nieman<sup>21</sup> did not detect *GH-R* mRNA in human preantral follicles. For bovines, Lucy et al<sup>22</sup> reported that follicles smaller than 2 mm were negative for GH-R. Conversely, GH-R protein and mRNA were detected in the oocytes and granulosa cells from early developing human follicles.<sup>23</sup> Eckery et al<sup>24</sup> reported that the *GH-R* gene was expressed in the granulosa cells and oocytes of all follicles, from primordial to small antral follicles, in sheep. The observed positive expression for *GH-R* mRNA in human and sheep could be due to the in situ hybridization method that was used. In addition, the presence of mRNA is indicative, but not definitive, proof of a functional receptor.<sup>19</sup> This work shows that *GH-R* mRNA was expressed at similar levels in COCs that were collected from small (<3mm) and large (3-6mm) antral follicles in goats. In addition, a higher expression of *GH-R* mRNA was observed in granulosa/theca cells from large antral follicles when compared with those from small antral follicles. Conversely, Sharara and Nieman<sup>21</sup> could not detect *GH-R* mRNA in theca interna and externa from human ovaries. In bovine antral follicles, Izadyar et al<sup>25</sup> demonstrated the presence of *GH-R* mRNA in granulosa and cumulus cells as well as in the oocyte. Thus, the mechanism by which GH-R is expressed during follicular development appears to be species-specific and to vary within different follicular compartments.

The immunohistochemical analysis showed the localization of the GH-R protein is coincident with the pattern of mRNA expression in goats, since a strong immunoreaction for GH-R was observed in stromal cells and in the oocytes, cumulus cells and mural granulosa cells of both small and large antral follicles, but not in the preantral follicles. These results suggest that GH can control the earliest stages of folliculogenesis indirectly and that the late stages are directly mediated by the presence of the GH receptor. The specificity of GH binding to GH-R has been considered, since GH is known to bind to both the somatogenic and lactogenic receptors in rat<sup>26,27</sup> and to the prolactin receptor in heifers<sup>28</sup>. In the rat ovary, GH-R is detected in the oocyte and granulosa/thecal cells.<sup>29</sup> Kölle et al<sup>5</sup> reported GH-R immunoreactivity in bovine cumulus oophorus cells at all stages of follicular development and in the cytoplasm of oocytes of primordial and primary follicles.

In this study, culturing follicles with 10 ng/ml of GH increased the percentage of both normal and developing follicles (intermediate and primary) compared with other concentrations. Moreover, the viability of preantral follicles that were obtained from ovarian tissue cultured with 10 ng/ml of GH over the course of 7 days was confirmed by fluorescence analysis. The promotion of follicular viability is a prerequisite for the development of preantral follicles. *In vivo* and *in vitro* studies suggest that GH stimulates growth and prevents atresia in small preantral follicles. Slot et al<sup>2</sup> demonstrate that the number of primordial follicles was significantly elevated in GH-R/GHBP-KO mice, while the number of primary, secondary and antral follicles was very low. The reduced number of healthy growing follicles was accompanied by a significant increase in the percentage of atretic follicles. Using human recombinant GH, Liu et al<sup>10</sup> showed that earlier phases of follicular development are controlled by GH, which stimulates secondary follicle formation *in vitro*. Zhao et al<sup>13</sup> found a growth promotion effect of IGF-I on rat preantral follicle development, when bovine GH was added to the culture medium in concentrations of 1, 10 or 100 ng/ml. In murine preantral follicles, Kobayashi et al<sup>11</sup> showed a stimulatory effect of 1.0 mIU/ml bovine GH on the proliferation of granulosa cells. Further *in vitro* studies have shown that GH has a direct inhibitory effect on apoptosis in early follicles in the bovine<sup>6</sup> and in the rat.<sup>7,8</sup> The mechanism by which GH regulates growth in ovarian follicles is not exactly known yet. *In vivo*, GH administration increased the number of small preantral follicles in cattle<sup>30,31</sup> and in horse.<sup>32</sup> It is quite possible that GH may act through (in)direct stimulation of other regulatory factors, such as insulin, which has been shown to play a role in primordial follicle recruitment *in vitro*.<sup>33</sup> Moreover, GH-binding activity was highest in the granulosa cells of preantral follicles when compared with large antral follicles in both porcine and fish ovaries,<sup>34,35</sup> which suggests that GH is important for preantral follicular growth, possibly by increasing ovarian activin production.<sup>10</sup> Furthermore, follicles that have been cultured in GH-containing medium possessed noticeably more gap junctions, which are considered essential for the maintenance of follicle activity and folliculogenesis.<sup>36-40</sup> In another study, *in vivo* administration of bovine recombinant GH increased the number of bovine primary, secondary and antral follicles that express the gap junction subunit of connexin-43.<sup>41</sup>

In conclusion, our findings indicate the gene expression of GH-R in goat ovarian antral follicles, thus suggesting that the action of GH could be mediated by its receptor, which is present in all compartments of antral follicles and in the stroma cells around preantral follicles. Furthermore, under our culture conditions, the addition of 10 ng/ml of GH during 7 days of culture of goat ovarian cortical slices promoted follicular survival, the growth of

primordial follicles and progression to subsequent stages, which suggests that GH may play a role in the recruitment of primordial follicles into the growing pool.

### Acknowledgements

This work was supported by CNPQ (RENORBIO). Fabricio S. Martins is a recipient of a grant from CAPES (Brazil). The authors thank José Leandro da Silva Neto for his technical support in classical histology and all the members of the LAMOFOPA, especially Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, whose help and enthusiasm made this study possible.

### References

1. Roy A, Matzuk MM. Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction*. 2006;131:207–219.
2. Slot KA, Kastelijn J, Bachelot A, Kelly PA, Binart N, Teerds KJ. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction*. 2006;131:525–532.
3. 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. *Anim Reprod Sci*. 2008;106:143–152.
4. Carlsson B, Bergh C, Bentham J, Olsson JH, Norman MR, Billig H, et al. Expression of functional growth hormone receptors in human granulosa cells *Hum Reprod*. 1992;7:1205–1209
5. Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary *Biol Reprod*. 1998;59:836–842
6. Sirotkin AV, Makarevich AV. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase a system. *J Endocrinol*. 1999;163:317–327.
7. Eisenhauer KM, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod*. 1995;53:13–20.

8. Chun SY, Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol.* 1998;39:63–75.
9. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 1997;15:201–204.
10. Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, et al. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology.* 1998;139:2342–2347
11. Kobayashi J, Mizunuma H, Kikuchi N, Liu X, Andoh K, Abe Y, et al. Morphological assessment of the effect of growth hormone on preantral follicles from 11-day-old mice in an *in vitro* culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268:36–41.
12. Hull KL, Harvey S. Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocr.* 2001;168:1–23.
13. Zhao J, van Tol HTA, Taverne MA, van den Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. The effect of growth hormone on rat preantral follicles *in vitro*. *Zygote.* 2000;3:275–283.
14. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev.* 1996;45:372–377.
15. Jia XC, Kalmijn J, Hsueh AJ. Growth hormone enhances folliclestimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells *Endocrinology.* 1986;118:1401–1409.
16. Langhout DJ, Spicer LJ, Geisert RD. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis and protein synthesis. *J Anim Sci.* 1991;69:3321–334.
17. Lucci, CM, Amorim, CA, Rodrigues, AP, Figueiredo, JR, Bao, SN, Silva, JR et al. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci.* 1999;56(3-4): 223–236.
18. van Tol HT, Bevers MM. Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev.* 1998;51(3):315-321.
19. Silva JRV, Figueiredo, JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology.* 2009;In press.



20. Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3rd ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1997.
21. Sharara FI, Nieman LK. Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:670–672.
22. Lucy MC, Collier RJ, Kitchell ML, Dibner JJ, Hauser SD, Krivi GG. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod.* 1993;48:1219–1227.
23. Abir R, Garor R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fert Ster.* 2008;90:1333–1339.
24. Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod.* 1997;57:507–513.
25. Izadyar F, Zhao J, van Tol HTA, Colenbrander B, Bevers MM. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev.* 1999;53:398–407.
26. Ranke, MB, Stanley, CA, Rodbard D, Baker L, Bongiovanni A, Parks JS. Sex Differences in Binding of Human Growth Hormone to Isolated Rat Hepatocytes. *Proc Nat Acad Sci.* 1976;73:847–851.
27. Postel-Vinay MC, Desbuquois B. Interaction of human growth hormone with isolated rat liver cells. *Endocrinology.* 1977;100:209–215.
28. Mihm M, Austin EJ, Good TEM, Ireland JLH, Knight PG, Roche JF, et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod.* 2000;63:811–819.
29. Carlsson B, Nilsson A, Isaksson OGP & Billig H. Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary-regulation and localization. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;95:59–66.
30. Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod.* 1991;45:941–949.

31. Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. *J Endocrinol*. 1993;139:67–75.
32. Cochran RA, Leonardi-Cattolica AA, Sullivan MR, Kincaid LA, Leise BS, Thompson DL, et al. The effects of equine somatotropin (eST) on follicular development and circulating plasma hormone profiles in cyclic mares treated during different stages of the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol*. 1999;16:57–67.
33. Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;192:37–43.
34. Gomez JM, Mourot B, Fostier A, Le Gac F. Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Reprod Fert*. 1999;115:275–285.
35. Quesnel H. Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary. *J Endocrinol*. 1999;163:363–372.
36. Cerda JL, Petrino TR, Wallace RA. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev Biol*. 1993;160, 228–235.
37. Simon, AM, Goodenough, DA, Li E, Paul, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*. 1997;385, 525–529.
38. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, et al. Oocyte control of granulosa cell development in culture: how and why (review). *Hum. Reprod*. 1997;12:127–132.
39. Li R, Mather JP. Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity *in vitro*. *Endocrinology*. 1997;138:4477–80.
40. Granot I, Dekel N. Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcript in rat ovaries. *Mol Reprod Dev*. 1997;47:231–239.
41. Kaiser GG, Kolle S, Boie G, Sinowatz F, Palma GA, Alberio RH. In vivo effect of growth hormone on the expression of connexin-43 in bovine ovarian follicles. *Mol Reprod*. 2006;73:600–606.

## **9 CAPÍTULO 4**

**Associação entre Fator de Crescimento e Diferenciação 9, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I e Hormônio do Crescimento Sobre a Sobrevivência e o Desenvolvimento *In vitro* de Folículos Pré-antrais Caprinos**

## Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do GDF-9, IGF-I e GH em diferentes associações sobre a sobrevivência, a ativação e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecidos do córtex ovariano caprino. Para isso, fragmentos do córtex foram cultivados por 1 e 7 dias em Meio Essencial Mínimo na ausência ou presença de GDF-9, IGF-I e GH isoladamente ou em diferentes associações. Os fragmentos de córtex não-cultivados ou cultivados por 1 e 7 dias foram processados para a análise histológica e microscopia de fluorescência. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o seu estágio de desenvolvimento e a sua integridade morfológica. Após 1 e 7 dias de cultivo, os resultados da análise morfológica mostraram que para todos os meios testados o percentual de folículos morfolologicamente normais foi superior quando comparado ao MEM<sup>+</sup> sozinho, exceto quando os folículos foram cultivados com GDF-9/IGF-I ou GDF-9/GH ( $P > 0,05$ ). Contudo, a análise por microscopia de fluorescência revelou que o percentual de folículos viáveis cultivados por 7 dias foi similar entre o tecido não-cultivado e cultivado em todos os tratamentos testados. Após 7 dias de cultivo, em todos os tratamentos testados, houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do percentual de folículos primordiais e um concomitante aumento do percentual de folículos intermediários e primários quando comparado ao tecido não-cultivado. Além disso, entre os tratamentos cultivados por 7 dias, as maiores taxas de folículos intermediários e primários foram alcançadas em MEM<sup>+</sup> adicionado de IGF/GH e IGF-I respectivamente. Ainda após 7 dias de cultivo, a adição de GDF-9, IGF-I e GH isoladamente ou em diferentes associações promoveu um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do diâmetro folicular quando comparado ao MEM<sup>+</sup> sozinho e ao tecido não-cultivado. Os resultados do presente trabalho mostraram que a utilização de GDF-9, IGF-I ou GH isoladamente ou em diferentes associações promove a manutenção da sobrevivência e a ativação de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, estimulando a transição de folículos primordiais para estádios subsequentes. Contudo, este estudo mostrou que IGF-I/GH e IGF-I são mais eficientes em promover a transição de folículos primordiais para folículos intermediários e de folículos intermediários para folículos primários, respectivamente.

Palavras-chave: GDF-9, IGF-I, GH, Cultivo, Ovário, Ativação, Caprinos.

## Interaction between Growth Differentiation Factor 9, Insulin-Like Growth Factor I and Growth Hormone on *in vitro* Development and Survival of Goat Preantral Follicles

Martins, F.S.<sup>A,C</sup>, Celestino, J.J.H.<sup>A</sup>, Saraiva, M.V.A.<sup>A</sup>, Chaves, R.N.<sup>A</sup>, Rossetto, R.<sup>A</sup>, Silva, C.M.G., Lima-Verde, I.B.<sup>A</sup>,  
Lopes, C.A.P.<sup>A</sup>, Campello, C.C.<sup>A</sup>, Figueiredo, J.R.<sup>A</sup>

<sup>A</sup> Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Veterinary Faculty, State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza 60740-000, CE, Brazil.

<sup>B</sup> Biotechnology Nucleus of Sobral – Federal University of Ceará, Av. Geraldo Rangel, 100/186, Sobral, CE CEP: 60.041-040, Brazil

<sup>C</sup> Corresponding author. Email: fabricio@netbandalarga.com.br

### Abstract

This study aimed to investigate the effects of GDF-9, IGF-I and GH alone or in association on preantral follicles survival, activation and development after 1 and 7 days of *in vitro* culture. Ovarian tissue that was either fresh (non-cultured tissue) or cultured was processed for histological and fluorescent analysis. For all media tested, the percentage of normal follicles was greater when compared to MEM<sup>+</sup> alone, except when ovarian tissue were cultured with GDF-9/IGF-I or GDF-9/GH ( $P < 0.05$ ). The fluorescent analysis showed that the percentage of viable follicles after 7 days of culture was similar between non-cultured tissue and all treatments tested. The percentage of primordial follicles was reduced ( $P < 0.05$ ) and there was a significant and concomitant increase in the percentage of intermediate and primary follicles in all treatments tested after 7 days of culture when compared to non-cultured tissue. After 7 days of culture, the highest rate of intermediate follicles between treatments was observed in IGF-I/GH, and the highest rate of primary follicles was achieved with IGF-I. After 7 days of culture in MEM<sup>+</sup> containing GDF-9, IGF-I and GH alone or in all associations a significant increase in follicular diameter was seen when compared to MEM<sup>+</sup> alone and non-cultured tissue. In conclusion, the GDF-9, IGF-I and GH alone or in associations maintain preantral follicles survival and promotes primordial follicles activation. Nevertheless, this study showed that the IGF-I/GH and IGF-I alone are more efficient to promote the transition from primordial to intermediate follicles and from intermediate to primary follicles, respectively.

**Keywords:** GDF-9, IGF-I, GH, Culture, Ovary, Activation, Ruminant.

## Introduction

To maximize the reproductive potential of ovarian tissue, it is necessary to develop culture strategies that support the activation and sustained *in vitro* growth of primordial follicles since this is the most abundant developmental stage in mammalian ovaries (1). To date, progress in culture systems that can support growth and development of the preantral follicles in domestic species has been slow when compared with mice, for which a complete growth can be achieved resulting in the production of live mice (2).

Although the mechanisms regulating the activation and subsequent growth of primordial follicles remain poorly understood, accumulating evidences indicates that the follicular development is dependent on the presence of oocyte/granulosa cell interactions and the secretion of a range of local factors, e.g., growth differentiation factor 9 (GDF-9), bone morphogenetic proteins (BMP), activin, inhibins, basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor I (IGF-I) and epidermal growth factor (EGF) (3). Growth differentiation factor-9 (GDF-9) has been localized in the oocytes of mice (4,5), rat (6), and human (7) primary follicles. Nilsson and Skinner (8) have shown that GDF-9 promotes the development of primary follicles in neonatal rat ovaries. Further, recent studies have shown that GDF-9 stimulates the *in vitro* growth of preantral follicles and thecal cell differentiation in the rat (5, 9) and primary and early secondary follicle formation in human ovarian slices *in vitro* (10). Recently, our group has evidenced, in goats, that GDF-9 promotes *in vitro* follicular survival, growth and the progression to the secondary follicle stage, maintaining follicular ultrastructure (11). There is a growing body of evidences that insulin-like growth factor-I (IGF-I) play a key role in the development of preantral follicles and in the process of follicular atresia. When added during *in vitro* culture of preantral follicles, IGF-I has been shown to stimulate follicular growth in human (12), bovine (13), rat (14), and mouse (15) in synergy with FSH. In the rat, IGF-I added during *in vitro* preantral follicular culture increased significantly the follicular diameter and DNA content (14). For secondary follicle growth, supplementation of culture medium with IGF-I effectively maintain oocyte survival and stimulate growth of goat follicles cultured *in vitro* (16). The development of preantral follicles has generally been considered to be largely independent of gonadotrophins and pituitary hormones. However, increasing evidences indicates that that growth hormone (GH), in addition to its metabolic effects, is involved in the regulation of ovarian functions, including preantral stage of development (14,17). *In vitro* studies in immature mice showed a

stimulatory effect of GH on preantral follicle development and follicular cell proliferation that is synergistic with IGF-I (15,18,19). GH may thus be particularly important in the recruitment of follicles and initiation of oocyte growth, perhaps by matching nutritional status with the number of growing oocytes (20). Additionally, GH has been shown to enhance cell proliferation and steroidogenesis of cultured granulosa cells in rat (21) and in cattle (22), pointing out an important role of this hormone in the regulation of follicular growth. Early studies assumed that IGF-I was the sole mediator of GH action in the ovary, since IGF-I or GH enhance steroid production to the same extent in rats (23) and GH usually increases follicular-luteal IGF-I in cows (24). Although some GDF-9, GH and IGF-I ovarian actions have been well analyzed in some mammalian species, little is known about their interaction on the development of goat preantral follicles. The present study was designed to investigate an influence by interaction among GDF-9, IGF-I and GH on the survival, activation and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*.

## **Materials and methods**

### **Chemicals**

GDF-9, GH and IGF-I were purchased from Cell Science (Ca-USA) and unless mentioned otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### ***In vitro* culture of ovarian tissue and morphological evaluation**

Ovaries (n=12) from six adult (1 – 3 years old), non-pregnant mixed breed goats were collected at a local slaughterhouse. The animals were cyclic and in good body condition. Immediately after the death of the animals, the ovaries were washed in 70 % alcohol followed by two times in MEM. The pair of ovaries from each animal was transported to the laboratory in 20 ml of Minimum Essential Medium- $\alpha$  (MEM- $\alpha$ ) supplemented with HEPES, penicillin (100  $\mu$ g/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml) within 1 h, at 4°C. In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments. The ovarian cortex of each pair of ovaries was then divided into 17 fragments (approximate size 3 x 3 mm, with 1 mm thickness) using a needle and scalpel under sterile conditions. One fragment was taken randomly and immediately fixed for histological examination (control). The 16 remaining

fragments were placed individually in 24-wells culture dishes, each well containing 1 ml of culture medium. The medium used was MEM- $\alpha$  (osmolarity 300 mOsm/l, pH 7.2 – Gibco) supplemented with ITS (insulin 6.25  $\mu$ g/ml, transferrin 6.25  $\mu$ g/ml, and selenium 6.25 ng/ml), 2 mM glutamine; 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/ml BSA, which was called MEM<sup>+</sup>. The ovarian cortex fragments were cultured for 1 or 7 days at 39 °C in humidified air with 5% CO<sub>2</sub> in MEM<sup>+</sup> alone or MEM<sup>+</sup> plus GDF-9 (200 ng/ml), IGF-I (50 ng/ml) or GH (10 ng/ml) alone or in association as showed in the Table 1. Each treatment was repeated six times and the culture media was changed every 2 days.

Table 1 - Different media tested for the *in vitro* culture of caprine preantral follicles.

Culture medium	Abbreviation
MEM <sup>+</sup>	MEM <sup>+</sup>
MEM <sup>+</sup> plus GDF-9	GDF-9
MEM <sup>+</sup> plus IGF-I	IGF-I
MEM <sup>+</sup> plus GH	GH
MEM <sup>+</sup> plus (GDF-9 + IGF-I)	GDF-9/IGF-I
MEM <sup>+</sup> plus (GDF-9 + GH)	GDF-9/GH
MEM <sup>+</sup> plus (IGF-I + GH)	IGF-I/GH
MEM <sup>+</sup> plus (GDF-9 + IGF-I + GH)	GDF-9/IGF-I/GH

#### Morphological analysis and assessment of *in vitro* follicular growth

Immediately after fragmentation, pieces of ovarian cortex were immersion-fixed for 12 h in 10% neutral buffered formaldehyde (pH 6.8-7.2) to serve as non-cultured control (fresh control). After 1 or 7 days of culture in each medium, the pieces of ovarian cortex were fixed as described above, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. The samples were sectioned (7  $\mu$ m thick) and mounted on charged slides then allowed to dry overnight at 37°C before staining with Periodic Acid Schiff and hematoxylin. Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined on a microscopy (Nikon, Japan) under 400X magnification.



The developmental stages of follicles have been defined previously (Silva et al., 2004) as primordial (oocyte surrounded by a few flattened granulosa cells) or developing follicles, i.e., intermediate (oocyte surrounded by flattened and at least one cuboidal granulosa cell), primary (oocyte surrounded by a complete layer of cuboidal granulosa cells), or secondary (oocyte surrounded by two or more complete layers of cuboidal granulosa cells). Primordial and developing follicles were classified as morphologically normal (follicles containing an intact oocyte and granulosa cells well-organized in layers without pyknotic nucleus) and degenerated follicles (oocyte with pyknotic nucleus, retracted cytoplasm or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane) according to Silva et al. (25).

The percentages of primordial and developing follicles were calculated on day 0 (control) and after 1 or 7 days of culture in each medium. Overall, 180 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x 6 repetitions = 180 follicles). In addition, follicular diameter was taken using only normal follicles from day 0 and after culture. The follicle diameter was recorded from edge to edge of granulosa cell membrane, or from the outside edge of the theca cell layer when present. Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded for each and the average of these two values was reported as follicle and oocyte, respectively. It is important to note that only follicles with a visible oocyte nucleus were evaluated to avoid double counting.

#### Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy

The viability of the follicles cultured in MEM<sup>+</sup> alone or in MEM<sup>+</sup> with different associations of GDF-9, IGF-I and GH was further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes. Additional pairs of ovaries (n=4) were cut into fragments, from which one was immediately processed for follicle isolation (non-cultured tissue). The remaining fragments were *in vitro* cultured and then submitted to isolation and analysis.

Goat preantral follicles were isolated from ovarian fragments using the mechanical method described by Lucci et al. (26). Briefly, with a tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) adjusted to a sectioning interval of 75 µm, samples were cut into small pieces, which were placed in MEM, resuspended 40 times using a large Pasteur pipette (diameter of about 1600 µm), and subsequently resuspended 40 times with a smaller Pasteur pipette (diameter of approximately 600 µm) to dissociate preantral follicles

from stroma. The material that was obtained was passed through 100 µm nylon mesh filters, resulting in a suspension containing preantral follicles smaller than 100 µm in diameter. This procedure was carried out within 10 min at room temperature.

Preantral follicles were analyzed using a two-color fluorescence cell viability assay based on the simultaneous determination of live and dead cells by calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively. While the first probe detected intracellular esterase activity of viable cells, the later labeled nucleic acids of non-viable cells with plasma membrane disruption. The test was performed by adding 4 µM calcein-AM and 2 µM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) to the suspension of isolated follicles, followed by an incubation at 37°C for 15 min. After labeling, follicles were washed once by centrifugation at 100xg for 5 min and resuspension in MEM, mounted on a glass microscope slide in 5 µl antifading medium (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Germany) to prevent photobleaching, and finally examined using an a TI fluorescence microscope (Nikon, Japan) equipped with a custom Nikon DS-U1 colour camera. Digital images were acquired with Laserssharp 2000 software under Windows XP. The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered live if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if chromatin was not labeled with ethidium homodimer (red).

#### Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests were applied to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Analysis of variance was then made using GLM procedure of SAS (1999) and Dunnett's test was applied for comparison of control groups against each treatment tested (27), whilst SNK test was used to compare different treatments and days of culture. Differences amongst groups were considered significant when  $p < 0.05$  and results were expressed as means  $\pm$  standard deviation.

## Results

### Effect of GDF-9, IGF-I and GH on the *in vitro* survival of preantral follicles

Histological analysis showed that normal (Fig. 1A) and degenerated (Fig. 1B) follicles were found in cultured ovarian cortical pieces. In degenerated follicles, shrunken oocyte with a pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells were observed. A total of 1,950 follicles were counted to evaluate follicular morphology, activation and growth.

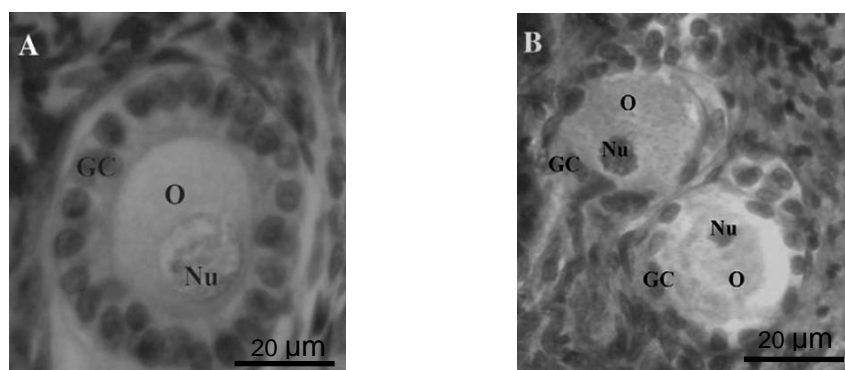


Figure 1. Histological section after staining with periodic acid-Schiff and hematoxylin showing (A) normal follicles and (B) degenerated follicles in non-cultured tissue. Note the cuboidal granulosa cells (GC) layer in the normal primary follicle (Figure 1A). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus (x400).

Figure 2 shows the percentage of normal follicles in non-cultured (day 0, fresh control) ovarian cortical pieces and after 1 or 7 days of culture in different media. After 7 days, the percentage of normal follicles cultured with GDF-9 was similar ( $P>0.05$ ) to non-cultured tissue (82.66%), indicating the importance of this factor for the maintenance of follicular survival.

The percentage of histologically normal follicles in all media tested, after 7 days of culture, was significantly greater ( $P<0.05$ ) when compared to  $\text{MEM}^+$ , except when the ovarian cortex were cultured with GDF/IGF and GDF/GH. Moreover, after 7 days, the number of normal follicles observed with GDF/IGF and GDF/GH showed the lowest percentage, compared with other media tested ( $P<0.05$ ). The increase of the culture period from 1 to 7

days significantly reduced ( $P<0.05$ ) the percentage of intact follicles in all media tested, except in tissues cultured in IGF/GH.

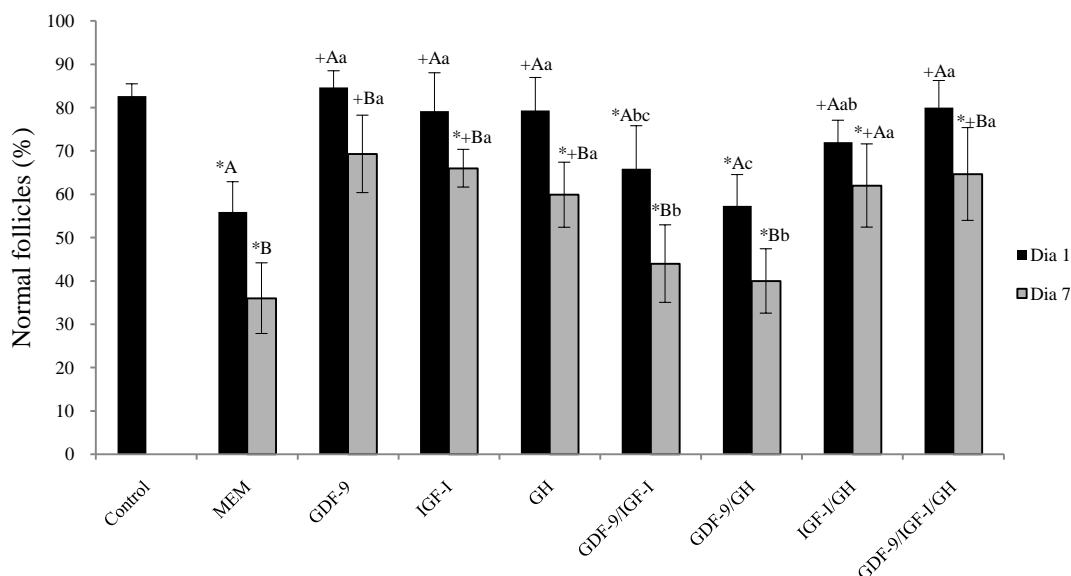


Figure 2. Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 or 7 days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus GDF-9, IGF-I and GH alone or in different associations.

\* : Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) ( $P<0.05$ ).

+ : Denotes values that differ significantly from MEM ( $P<0.05$ ).

AB: Values with different letter denote significant differences between cultured periods within a given media ( $P<0.05$ ).

abc: Values with different letter denote significant differences among treatments ( $P<0.05$ ).

### Viability assessment of follicles after culture

Based on the results of morphological evaluation, goat preantral follicles were isolated from fresh control and ovarian fragments cultured for 7 days with MEM<sup>+</sup> or MEM<sup>+</sup> plus GDF-9, IGF-I and GH alone or combined. A viability trial using isolated follicles from fresh and cultured ovarian fragments from all treatments. A fluorescence cell viability assay based on the labeling of live and dead cells by calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively, was employed. Viable preantral follicles after *in vitro* culture are shown in Figure 3. The percentage of viable follicles after seven days of culture was similar between MEM<sup>+</sup> and all treatments tested (Table 2).

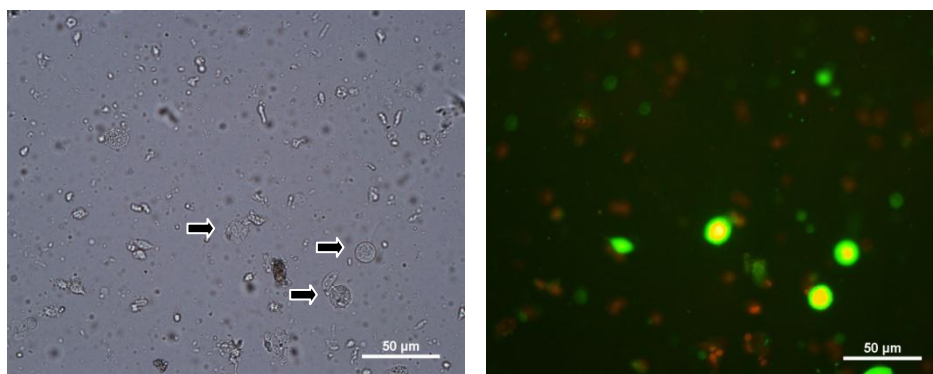


Figure 3. Mechanically isolated follicles visible under an fluorescence microscope after fluorescence staining for follicle viability (calcein-AM and ethidium homodimer-1). Viable preantral follicle (➡) in cultured ovarian tissue in MEM<sup>+</sup> containing GDF-9/IGF-I/GH for 7 days were visible by (A) light microscopy and (B) fluorescence microscopy. Scale bars represent 50 µm.

Table 2. Percentage of viable preantral follicles after 7 days *in vitro* culture stained with calcein-AM.

Culture medium	Percentage
MEM <sup>+</sup>	91.05%
GDF-9	91.03%
IGF-I	93.00%
GH	92.40%
GDF-9/IGF-I	93.06%
GDF-9/GH	92.09%
IGF-I/GH	92.00%
GDF-9/IGF-I/GH	91.09%

#### Goat primordial follicle activation and growth during *in vitro* culture

In fresh tissue, the percentages of primordial, intermediate and primary follicles were 72.7, 21.2, 5.34% respectively. After 1 and 7 days of culture, in all media tested, the percentage of primordial follicles (Fig. 4A,  $P < 0.05$ ) was significantly decreased when compared to non-cultured tissue. When compared to MEM<sup>+</sup> alone, only after 7 days of

culture, all media tested significantly reduced the percentage of primordial follicles (Fig. 4A,  $P < 0.05$ ). Regarding to the progression of the culture period (from day 1 to 7), a significant decrease in the percentage of primordial follicles was observed in all media tested except in  $\text{MEM}^+$  plus GDF-9/GH (Fig. 4A,  $P < 0.05$ ). In contrast, there was a significant and concomitant increase in the percentage of intermediate (Fig. 4B,  $P < 0.05$ ) and primary (Fig. 4C,  $P < 0.05$ ) follicles in all treatments tested after 7 days of culture when compared with non-cultured tissue. There was a significant increase in the percentage of intermediate follicle cultured for 1 day with IGF-I when compared to  $\text{MEM}^+$  (Fig. 4B,  $P < 0.05$ ). After 7 days of culture, the addition of IGF-I/GH to  $\text{MEM}^+$  significantly increased the percentage of intermediate follicles when compared to  $\text{MEM}^+$  alone and others media tested (Fig. 4B,  $P < 0.05$ ). With the progression of culture period, the addition of IGF-I to the culture medium promoted a significant decrease in the percentage of intermediate follicles, while IGF-I/GH increased the rates of intermediate follicles (Fig. 4B,  $P < 0.05$ ). After 1 day of culture, all media increased the percentage of primary follicles when compared with non-cultured tissue, except when GH and GDF-9/IGF-I were used (Fig. 4C,  $P < 0.05$ ). The percentage of primary follicles cultured after 7 days in medium containing IGF-I was similar to GDF-9 ( $P > 0.05$ ) and significantly higher compared to the other treatments (Fig. 3C,  $P < 0.05$ ). With the progression of the culture period from 1 to 7 days, the percentage of primary follicles was significantly increased in all media tested, except in  $\text{MEM}^+$  alone and  $\text{MEM}^+$  plus GDF-9/GH and IGF-I/GH. (Fig. 4C,  $P < 0.05$ ). The percentage of secondary follicles was not compared due to the insufficient number of follicles for statistical analysis.

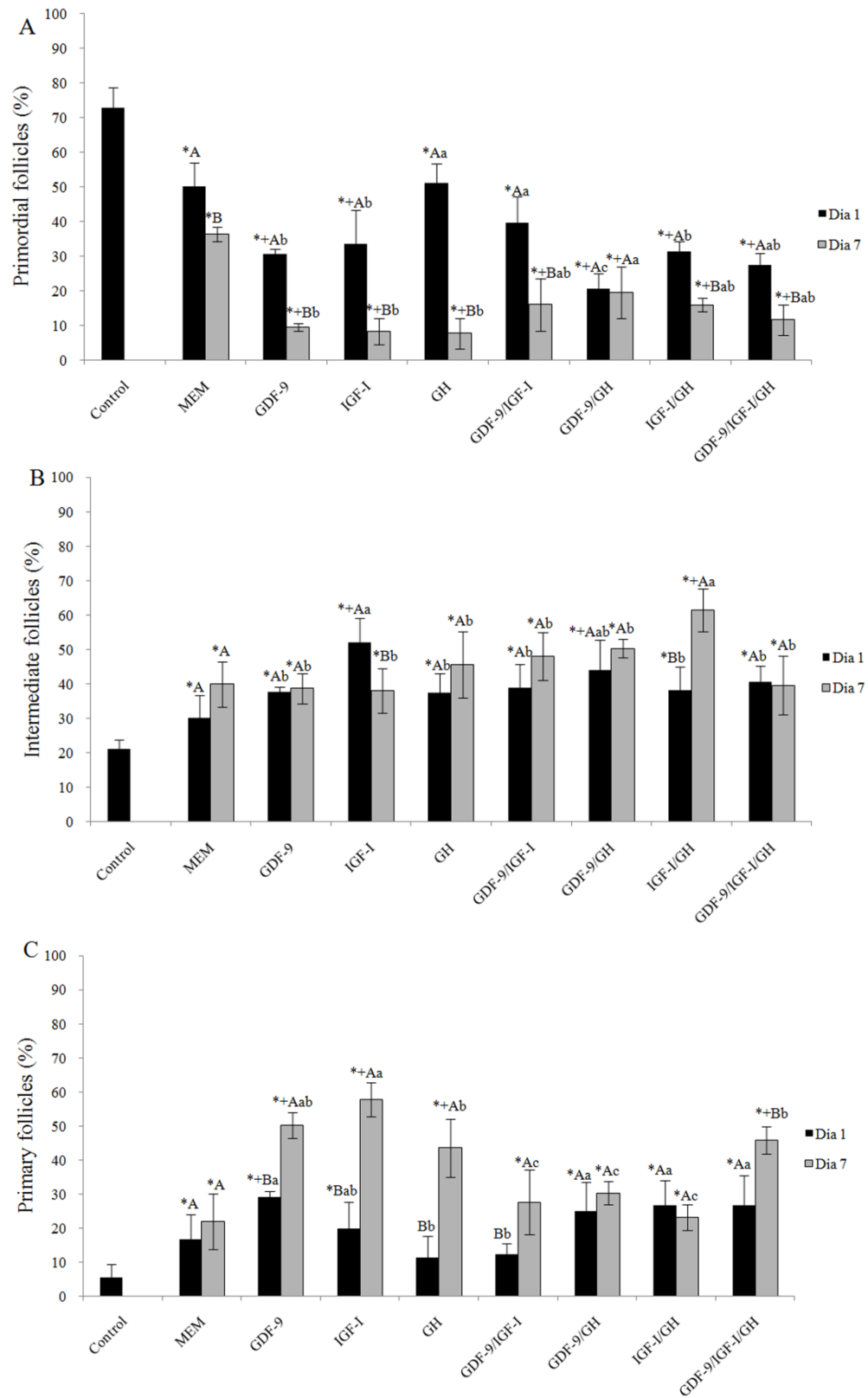


Figure 4. Percentages of primordial (A), intermediate (B) and primary (C) in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> plus GDF-9, IGF-I and GH alone or combined.

\*: Denotes values that differ significantly from non-cultured ovarian cortex (control) ( $P < 0.05$ ).

+: Denotes values that differ significantly from MEM ( $P < 0.05$ ).

AB: Values with different letter denote significant differences between cultured periods within a given media ( $P < 0.05$ ).

abc: Values with different letter denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).

After 1 and 7 days of culture, the addition of GDF-9, IGF-I and GH alone or in different associations to MEM<sup>+</sup>, promoted a significant increase in the follicular diameter in unilaminar follicles, i.e. primordial, intermediate and primary follicles together, when compared to non-cultured tissue and MEM<sup>+</sup> alone (Table 3,  $P < 0.05$ ), without differences among treatments ( $P > 0.05$ ). With the progression of the culture period, a significant increase in the follicular diameter was observed in all treatments tested, except in MEM<sup>+</sup> alone (Table 3,  $P < 0.05$ ).

Table 3. Oocyte and follicle diameter in non-cultured tissues (fresh control) and in tissue cultured for 7 days in MEM<sup>+</sup> (control medium) and MEM<sup>+</sup> supplemented with GDF-9, IGF-I and GH alone or in different associations.

	Oocyte diameter (μm)		Follicle diameter (μm)	
Non-cultured	41.7 ± 1.9		50.1 ± 4.4	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
MEM	40.7 ± 3.5 <sup>A</sup>	43.1 ± 4.6 <sup>A</sup>	54.5 ± 2.8 <sup>A</sup>	55.8 ± 4.2 <sup>A</sup>
GDF	52.1 ± 2.5 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	53.8 ± 4.4 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	61.2 ± 3.0 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	67.1 ± 2.8 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>
IGF	50.7 ± 2.7 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	53.6 ± 4.6 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	62.3 ± 2.3 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	69.6 ± 2.1 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>
GH	55.1 ± 3.5 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	56.8 ± 4.4 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	63.2 ± 3.0 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	68.1 ± 2.0 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>
GDF/IGF	54.1 ± 3.5 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	55.8 ± 3.4 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	61.2 ± 3.2 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	67.1 ± 2.8 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>
GDF/GH	53.1 ± 2.8 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	54.8 ± 2.8 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	60.2 ± 2.8 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	66.1 ± 2.7 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>
IGF/GH	50.1 ± 3.1 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	51.8 ± 4.1 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	62.2 ± 3.1 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	68.1 ± 3.1 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>
GDF/IGF/GH	49.1 ± 2.7 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	53.8 ± 4.8 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>	60.9 ± 3.9 * <sup>+</sup> <sup>B</sup>	66.1 ± 2.6 * <sup>+</sup> <sup>A</sup>

\* Differs significantly from non-cultured tissue ( $P < 0.05$ ).

<sup>+</sup> Differs significantly from MEM ( $P < 0.001$ ).

AB: Values with different letters denote significant differences between cultured periods within a given media ( $P < 0.05$ ).



## Discussion

The present study demonstrated for the first time the effects of GDF-9, IGF-I and GH in different associations on preantral follicles survival, activation and growth during 7 days of culture. Moreover, the viability of preantral follicles that were obtained from cultured ovarian tissue, in all treatments, over the course of 7 days was confirmed by fluorescence microscopy. The concentrations used in this experiment were chosen based on the best results obtained previously by our research group using a dose-dependent curve. In this study we observed a significant effect of the GDF-9, IGF-I and GH alone or combined enhanced the survival of goat preantral follicles, except when GDF-9/IGF-I and GDF-9/GH were used, since there was no synergistic effect between GDF-9 and IGF-I or between GDF-9 and GH improving survival of preantral follicles. Orisaka et al. (28) suggest that GDF-9 promotes follicular survival and growth during the preantral to early antral transition by suppressing granulosa cell apoptosis and follicular atresia. Deletion of the GDF-9 gene in mice blocked folliculogenesis at the primary stage, demonstrating the importance of this growth factor in early follicular development (29). Subsequent studies have shown that treatment with GDF-9 stimulates granulosa cell proliferation in the rat (9), preantral follicle growth in humans (30) and goat (11), cumulus cell expansion in humans (31) and results in a higher proportion of viable human follicles in organ culture, suggesting a possible role for GDF-9 in follicular survival (10). Moreover, the presence of GDF-9 in primary and later stages goat follicles (32) suggests that GDF-9-mediated signalling events may be important in the development of preantral follicles in this species. In the current study, we observed after 1 and 7 days of culture, a greater follicular activation (i.e. the transition from primordial to intermediate follicles) in all tested treatments compared to control. Follicular activation in MEM<sup>+</sup> probably occurred because this medium is enhanced with nutrients, such as amino acids and carbohydrates (33). However, in our culture conditions, an elevated activation was observed after the addition of IGF/GH in the culture medium. Follicular activation was obtained in previous studies in goat (11), cow (34-35) and baboon (36), in which the number of primordial follicles was dramatically reduced with a concomitant increase in the number of developing follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue. Studies have demonstrated that GH stimulates the production of IGF-I and its messenger RNA (mRNA) in porcine granulosa cells and rat ovary (37). Using human recombinant GH, *in vitro* studies with mouse follicles have shown that GH plays an important role in controlling earlier phases of follicular development, because of its stimulatory effect on secondary follicle formation *in vitro* (15). Likewise, Zhao

et al. (14) found a similar growth promoting effect as IGF-I on rat preantral follicle development, when bovine GH was added to the culture medium in concentrations of 1, 10, or 100 ng/mL. Nevertheless, in this study the highest percentage of primary follicles were observed with IGF-I alone. This increase may have resulted from the transition of intermediate to primary follicles. Alternatively, IGF-I may have improved survival of the pre-existing primary follicles. This would be in line with previous studies that have shown that IGF-I is able to suppress apoptotic DNA-fragmentation in culture rat preantral follicles, acting as antiapoptotic factor (38).

In this study, the number of secondary follicles in non-cultured and cultured goat ovarian tissue contained a low (often zero) and variable number of secondary follicles (data not shown), thereby preventing meaningful analysis. A similar conclusion was drawn for the lack of changes in the secondary follicle population in cultured bovine (34) and baboon (36) ovarian cortical tissue. Nilsson, Skinner (8) and Martins et al. (11), showed that GDF-9 may influence primary follicle progression to secondary follicles in rat and goat, respectively. Although there was a highest increase in the percentage of intermediate follicles with IGF-I/GH and primary follicles with IGF-I, differences between treatments on the follicular and oocyte diameters was not observed. It is possible that intermediate or primary follicles were already large, thus the increase in the diameters was not seen but only the changes in granulosa cells morphology from flattened to cuboidal. Studies have showed that oocyte growth is often insufficient or even undetectable and the development of a thecal cell layer at the preantral stage is rarely observed (39). An increasing list of growth factors has been implicated in regulating the primordial to primary follicle transition and the progression of early preantral follicle development. GDF-9, IGF-I and GH has all been demonstrated to be involved in the orderly progression of follicles through the early stages of preantral development.

In summary, GDF-9, IGF-I and GH alone were found to be able to enhance follicular viability, growth and progression of primordial follicles to primary follicles after 7 days of *in vitro* culture. Moreover, the addition of IGF-I/GH are more effective to promote the transition from primordial to intermediate follicles, and the addition of IGF-I alone promoted the highest rates of primary follicles after 7 days of culture. Another set of experiments are necessary to improved understanding about the combined action of the growth factors controlling the orderly progression of follicle development.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ). Fabricio S. Martins is a recipient of a grant from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Brazil). The authors thank José Leandro da Silva Neto for his technical support in classical histology and all the members of the LAMOFOPA, whose help and enthusiasm made this study possible.

## References

1. Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction* 2008; 136: 703-715.
2. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003; 68:1682–1686.
3. Webb R, Garnsworth PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 2004; E63-E74.
4. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131–136.
5. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140: 1236– 1244
6. Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 156, 189–193.
7. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjorberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2744–2755.
8. Nilsson EE, Skinner M.K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 2002; 67: 1018–1024.

9. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJW. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000; 62:370–377.
10. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 316–321
11. Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha-Junior CMC, Lima-Verde IB, Lucci CM, B  o SN, Figueiredo JR. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. *Reprod Fert Dev* 2008; 20: 916–924.
12. 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. *Mol Hum Reprod* 2000, 6:694–698.
13. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine antral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod* 2000; 62:1322–1328.
14. Zhao J, Tavene MAM, Van der Weijden GC, Bevers MM and Van Den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol Reprod Develop* 2001; 58: 287–296.
15. Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 1998; 139:2342–2347.
16. Zhou H, Zhang Y. Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes. *Anim Reprod Sci* 2005; 90: 265–72.
17. Hull KL, Harvey S. GH as a co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. *J Endocrinol*, 2002. 172:1-19.
18. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics* 1997; 15: 201–204.
19. 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. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 36–41.
20. Hull KL, Harvey S. Growth hormone: roles in female reproduction. *J Endocrinol* 2001; 168: 1–23.

21. Jia XC, Kalmijn J, Hsueh AJ. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1986; 118: 1401–1409.
22. Langhout DJ, Spicer LJ, Geisert RD. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis and protein synthesis. *J Anim Sci* 1991; 69: 3321–3334.
23. Hong H, Herington AC. Differentiation between the effects of IGF-I and GH on PMSG-induced progesterone production by rat granulosa cells. *Growth Regulation* 1991; 1: 65–71.
24. Andrade LP, Rhind SM, Wright IA, McMillen SR, Goddard PJ, Bramley TA. Effects of bovine somatotrophin (bST) on ovarian function in post-partum beef cows. *Reproduction, Fertility and Development* 1996; 8: 951–960.
25. Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bão SN, Costa SHF, Santos RR, Figueiredo JR. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Theriogenology* 2000; 54: 809–822.
26. Lucci, CM, Amorim, CA, Rodrigues, AP, Figueiredo, JR, Bao, SN, Silva, JR et al. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci* 1999; 56(3-4): 223–236.
27. Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3rd ed. New York, NY: McGraw-Hill, 1997.
28. Orisaka M, Orisaka SJ, Jin-Yi CJ, Wang Y, Kotsuji F Tsang BK. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2456–2468.
29. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531–535.
30. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 1–5.
31. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1035–1048.
32. Silva JRV, Van Den 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 the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 11–19.

33. van Wezel IL, Rodgers RJ. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biol Reprod* 1996; 55: 1003-1011.
34. Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology* 1996; 45: 817-832.
35. Braw-tal R, Yossefi S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 165-171.
36. Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srsen V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology* 1998; 49: 441-449.
37. Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M, Lund PK. Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 1987; 1: 233-242.
38. Chun SY, Billi H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory roles of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994; 135: 1845-1853.
39. Smits JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro* *Reproduction*, Feb 2002; 123: 185 - 202.

## 10 CONCLUSÕES GERAIS

- A utilização de GDF-9 promoveu a sobrevivência e o crescimento folicular, e quando adicionado na concentração de 200 ng/ml estimulou o desenvolvimento dos folículos até o estágio secundário, assegurando ainda a manutenção da integridade ultra-estrutural folicular durante sete dias de cultivo *in vitro*.
- Tanto o RNA mensageiro como as proteínas para o IGF-I foram expressos nos compartimentos foliculares em todos os estágios de desenvolvimento, o que confirma o envolvimento deste fator de crescimento no processo de desenvolvimento folicular na espécie caprina.
- A utilização de IGF-I na concentração de 50 ng/ml promoveu a manutenção da sobrevivência folicular, o crescimento e a transição de folículos intermediários para primários após sete dias de cultivo *in vitro*.
- Tanto o RNA mensageiro como as proteínas para o receptor do GH foram expressos nos compartimentos foliculares de folículos antrais caprinos, o que ratifica a participação deste hormônio na fase final de desenvolvimento folicular.
- A adição de 10 ng/ml de GH ao meio de cultivo promoveu com sucesso a sobrevivência, a ativação, o crescimento *in vitro* e a transição de folículos primordiais para folículos primários.
- A utilização de GDF-9, IGF-I ou GH em diferentes associações promoveu a manutenção da sobrevivência folicular, a ativação e o crescimento dos folículos primordiais. Entretanto, a utilização de IGF-I/GH e IGF-I foram mais eficientes em estimular a transição de folículos primordiais para folículos intermediários e de folículos intermediários para primários, respectivamente.

## 11 PERSPECTIVAS

A eficiência dos programas de fecundação *in vitro* e transferência de embriões visando o tratamento de infertilidade humana e a multiplicação de animais de alto valor zootécnico a partir de oócitos provenientes dos folículos pré-antrais, depende ainda da completa compreensão dos mecanismos que controlam a foliculogênese inicial. É sabido que o crescimento folicular é regulado por uma complexa interação de fatores metabólicos extra-ovariano e sinalizações endógenas e a elucidação destes sistemas de controle persiste como um dos maiores desafios científicos.

Os resultados deste projeto evidenciaram a expressão do IGF-I, do receptor do GH e dos seus respectivos RNAs mensageiros em folículos ovarianos caprinos bem como a participação do GDF-9, IGF-I e GH na sobrevivência, na ativação, no crescimento e na promoção do desenvolvimento dos folículos cultivados *in situ*.

Os fatores de crescimento (GDF-9 e IGF-I) e o GH utilizados foram promissores no cultivo *in situ* de folículos pré-antrais iniciais caprinos. Entretanto, estudos complementares poderão ser realizados visando à utilização destas substâncias sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados em estádios iniciais ou tardios. Além disso, são numerosas as possibilidades de se estudar a influência de tais substâncias sobre a expressão de outras que estejam envolvidas no controle do desenvolvimento folicular.

Diante das conclusões deste trabalho, as informações obtidas poderão ser utilizadas ainda 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.

Além disso, as condições do sistema de cultivo *in vitro* empregadas neste estudo representam uma exímia alternativa para a indústria farmacêutica avaliar, em caráter experimental, o efeito tóxico ou benéfico de fármacos sobre oócitos oriundos de folículos primordiais, intermediários, primários e secundários, bem como, verificar a inocuidade de nanopartículas como veículos de drogas de interesse na medicina, contribuindo para os avanços da nanotecnologia e dos tratamentos de enfermidades.



## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, J.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N. Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 84, p. 2744-2750, 1999.

ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BEN-RAFAEL, Z. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. *Human Reproduction*, v. 7, p. 603-610, 2001.

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

ABIR, R.; GAROR, R.; FELZ, C.; NITKE, S.; KRISSE, H.; FISCH, B.; Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fertility and Sterility*, v. 90, p. 1333-1339, 2008.

ADASHI, E. Y.; RESNICK C. E.; D'ERCOLE A. J.; SVOBODA M. E.; VAN WYK J. J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine Review*, v. 6, n. 3, p. 400-420, 1985.

ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, v. 9, p. 815-827, 1994.

ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; PAYNE, D.W.; ROSENFELD, R.G.; MATSUMOTO, T.; HUNTER, M. K.; GARGOSKY, S.E.; ZHOU, J.; BONDY, C. A. The Mouse Intraovarian Insulin-Like Growth Factor I System: Departures from the Rat Paradigm. *Endocrinology*, v. 138, p. 3881-3890, 1997.

ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 39, p.13-19, 1998.

AHMED, C. E.; DEES, W. L.; OJEDA, S. R. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*, v. 118, p. 1682-1689, 1986.

ALAK B. M.; SMITH G. D.; WOODRUFF T. K.; STOUFFER R. L.; WOLF, D. P. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization *in vitro* by inhibin A and activin A. *Fertility and Sterility*, v. 66, n.4, p. 646-653, 1996.

ALAK B. M.; COSKUN S.; FRIEDMAN C. I.; KENNARD E. A.; KIM M. H.; SEIFER D. B. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *Fertility and Sterility*, v. 70, n. 6, p. 1126-1130, 1998.

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

AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, JR.; GONÇALVES, P. B. D.; Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Journal of Small Ruminant Reserch*, v. 37, p. 269-277, 2000.

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 Cell*, v. 25, p. 49-72, 1993.

ANDRADE, L.P.; RHIND, S.M.; WRIGHT, I.A.; MCMILLEN, S.R.; GODDARD, P.J.; BRAMLEY, T.A. Effects of bovine somatotrophin (bST) on ovarian function in post-partum beef cows. *Reproduction Fertility and Development*, v. 8, p. 951-960, 1996.

ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, JR.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 64, p. 1104-1113, 2005.

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

APA, R.; LANZONE, A.; MICELI, F.; VACCARI, S.; MACCHIONE, E.; STEFANINI, M.; CANIPARI, R. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cell. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 830-835, 2002.

ARIMURA, A. Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 3, p. 288-294, 1992.

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*, v. 2, p. 139-146, 1997.

ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C.G.; HOGG, C.O.; GLAZYRIN, A.L.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*, v. 139, p. 2146-2154, 1998.

ARMSTRONG, D.G.; GUTIERREZ, C.G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A.L.; MANN, G.E.; WOAD, K.J.; HOGG, C.O.; WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGFII and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 165, p. 101-113, 2000.

ARMSTRONG, D.G.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; WOAD, K.J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction*, v. 123, p. 789-797, 2002.

BACHELOT, A.; MONGET, P.; IMBERT-BOLLORE, P.; COSHIGANO, K.; KOPCHICK, J. J.; KELLY, P. A.; BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology*, v. 143, p. 4104-4112, 2002.

BAKER, J.; HARDY, M.P.; ZHOU, J.; BONDY, C.; LUPU, F.; BELLVE, A.R.; EFSTRATIADIS, A. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular Endocrinology*, v. 10, p. 903-918, 1996.

BARNETT K, R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction*, v. 13, p. 1-19, 2006.

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 130, p. 401-409, 2001.

BAUMAN D. E.; VERNON R. G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of Nutrition*, v. 13, p. 437-461, 1996.

BENNETT, R. A.; OSATHANONDH, R.; YEH, J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 8, p. 3073-3076, 1996.

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

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

BOLAND, N. I.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; GOSDEN, R. G. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 48, p.798-806, 1993.

BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p. 369-374, 1994.

BONDANELLI, M.; AMBROSIO, M. R.; MARGUTTI, A.; FRANCESCHETTI, P.; ZATELLI, M. C.; DEGLI-UBERTI, E. C. Activation of the somatotrophic axis by testosterone in adult men: evidence for a role of hypothalamic growth hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, v. 77, p. 380-387, 2003.

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

BRAW-TAL, R.; MCNATTY, K. P.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; PHILLIPS, D. J.; MCLEOD, B. J.; DAVIS, G. H. Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (FecX1) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 895-907, 1993.

BRAW-TAL, R.; ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17 alpha-hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*, v. 129, p. 453-461, 2005.

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, 2009.

BUKOVSKI, A.; CAUDLE, M. R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, N. B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 4 p. 2-20, 2004.

BURATINI, J. J.; GLAPINSK, V. F.; GIOMETTI, I. C.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptor, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 70, p. 255-261, 2005.

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

BYSKOV, A. G.; FADDY, M. J.; LEMMEN, J. G.; ANDERSEN, C. Y. Eggs forever? *Differentiation*, v. 73, p. 438-46, 2005.

CARLSSON, B.; BERGH, C.; BENTHAM, J.; OLSSON, J.H.; NORMAN, M.R.; BILLIG, H. Expression of functional growth hormone receptors in human granulosa cells. *Human Reproduction*, v. 7, p. 1205–1209, 1992.

CARLSSON, B.; NILSSON, A.; ISAKSSON, O.G.P.; BILLIG, H. Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary-regulation and localization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 95, p. 59-66, 1993.

CARLSSON, B.; LAITINEN, M. P.; SCOTT, J. E.; LOUHIO, H.; VELENTZIS, L.; TUURI, T.; AALTONEN, J.; RITVOS, O.; WINSTON, R. M.; HOVATTA, O. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction*, v. 131, n.4, p. 641-649, 2006.

CARPENTER, G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *Journal of Cell Biology*, v. 146, p. 697-702, 1999.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 60, 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.; BÃO, 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 Science*, v. 16, p. 239-246, 2009.

CERDA, J.L.; PETRINO, T.R.; WALLACE, R.A. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Developmental Biology*, v. 160, p. 228-235, 1993.

CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A.; COSCHIGANO, K. T.; KOPCHICK, J. J. Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. *Endocrinology*, v. 140, p. 1082-1088, 1999.

CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A.; AWONIYI, C. A.; TSAI-MORRIS, C. H.; DUFAU, M. L.; RUSSELL, L. D.; KOPCHICK, J. J. Testicular endocrine function in growth hormone receptor gene disrupted mice. *Endocrinology*, v. 142, p. 3443-3450, 2001.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The Consequences of Altered Somatotrophic System on Reproduction. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 17-27, 2004.

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic Analysis of the Mammalian TGF- $\beta$  Superfamily. *Endocrinology Review*, v. 23, p. 787-823, 2002.

CHUN, S.Y.; BILLI, H.; FURUTA, I.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A.J. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory roles of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, v. 135, p. 1845-1853, 1994.

CHUN, S.Y.; HSUEH, A.J. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 39, p. 63-75, 1998.

CLARK, P. A.; ROGOL, A. D. Growth hormones and sex steroid interactions at puberty. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, v. 25, p. 665-681, 1996.

COCHRAN, R.A.; LEONARDI-CATTOLICA, A.A.; SULLIVAN, M.R.; KINCAID, L.A.; LEISE, B.S.; THOMPSON, D.L. The effects of equine somatotropin (eST) on follicular development and circulating plasma hormone profiles in cyclic mares treated during different stages of the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 16, p. 57-67, 1999.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Human Reproduction*, v. 12, p. 59-768, 1997.

CORTVRINDT, R. G.; HU, Y.; LIU, J.; SMITZ, J. E. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. *Fertility and Sterility*, v. 70, p. 1114-1125, 1998.

COSTOYA, J. A.; FINIDORI, J.; MOUTOUSSAMY, S.; SEÑARIS, R.; DEVESA, J.; ARCE, V. M. Activation of Growth Hormone Receptor Delivers an Antiapoptotic Signal: Evidence for a Role of Akt in This Pathway. *Endocrinology*, v. 140, p. 5937- 5943, 1999.

DANFORTH, D. R.; ARBOGAST, L. K.; GHOSH, S.; DICKERMAN, A.; ROFAGHA, R.; FRIEDMAN, C. I. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Preantral Follicle Growth in the Rat Ovary. *Biology of Reproduction*, v. 68, p.1736-1741, 2001.

DANILOVICH, N. A.; BARTKE, A.; WINTERS, T. A. Ovarian Follicle Apoptosis in Bovine Growth Hormone Transgenic Mice. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 103, 2000.

DAUGHADAY, W. H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. *Endocrine Reviews*, v.10, p. 68-92, 1989.

DELEMARRE-VAN, D. E.; WAAL, H. A.; VAN COEVERDEN, S.C.; ROTTEVEEL, J. Hormonal determinants of pubertal growth. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, v. 14, n. 6, p.1521-1526, 2001.

DEMEESTERE, I.; GERVY, C.; CENTNER, J.; DEVREKER, F.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Effect of Insulin-Like Growth Factor-I During Preantral Follicular Culture on Steroidogenesis, *In vitro* Oocyte Maturation, and Embryo Development in Mice. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 1664-1669, 2004.

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

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, p. 587-598, 2000.

DIAZ, F. J.; O'BRIEN, M. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Developmental Biology*, v. 299, p. 91-104, 2006.

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

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v. 383, p. 531-535, 1996.

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*, v. 146, p. 2798-2806, 2005.

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biology of Reproduction*, v. 76, p.848-857, 2007.

DUBE, J. L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K. M.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. The bone morphogenic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*, v. 12, p. 1809-1817, 1998.

DULEBA, A.J.; SPACZYNSKI, R.Z.; OLIVE, D.L. Insulin and insulinlike growth factor I stimulate the proliferation of human ovarian thecainterstitial cells. *Fertility and Sterility*, v. 69, p. 335-340, 1998.

DUFOUR, J.; CAHILL, L.P.; MAULEON, P. Short and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on populations follicular in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 7, p. 301-309, 1979.

ECKERY, D.C.; MOELLER, C.L.; NETT, T.M.; SAWYER, H.R. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 507-513, 1997.

EDWARDS, R. G.; FOWLER, R.E.; GORE-LANGTON, R.E.; GOSDEN, R.G.; JONES, E.C.; READHEAD, C.; STEPTOE, P.C. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 51, p. 237-263, 1977.

EISENHAUER, K.M.; CHUN, S.Y.; BILLIG H, HSUEH AJ. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 13-20, 1995.

ELVIN, J.A.; CLARK, A.T.; WANG, P.; WOLFMAN, N.M.; MATZUK, M.M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*, v. 13, p. 1035-1048, 1999.

ELVIN, J.A.; YAN, C.; MATZUK, M.M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 159, p. 1-5, 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, p. 268-276, 1989.

EPPIG, J.J. Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cell. *Bioassays*, v. 13, n.11, p. 569-574, 1991.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, 54:197-207, 1996.



EPPIG, J.J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, F.L.; WATANABE, S. Oocyte control of granulosa cell development in culture: how and why (review). *Human Reproduction*, v. 12, p. 127–132, 1997.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829–838, 2001.

EPPIG, J.J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L. The mammalian oocytes orchestrate the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 99, p. 2890–2894, 2002.

EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J. 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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 77, p. 1411–1418, 1993.

ERICKSON, G. F.; WANG, C.; HSUEH, A. J. W. FSH induction of functional LH receptors in granulosa cell cultured in a chemically defined medium. *Nature*, v. 279, p. 336–338, 1979.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars and Reproductive Endocrinology*, v.4, p. 233–254, 1986.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproduction Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 9, 2003.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, v. 43, n. 4, p. 503–512, 1996.

FARBER, J. L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Laboratory Investigation*, v. 47, p. 114–123, 1982.

FATEHI, A. N.; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A. J.; VAN TOL, H. T.; MONTEIRO, R. M.; ROELEN, B. A.; BEVERS, M. M. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v. 63, n. 3, p. 872–889, 2005.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; ECTORS, F. J.; BECKERS, J. F. Preservation of Oocyte and Granulosa Cell Morphology in Bovine Preantral Follicles Cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v. 41, p. 1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S.C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. *Theriogenology*, v. 5, p. 845-858, 1995.

FINCH, P. W.; RUBIN, J. S.; MIKI, T.; RON, D.; AAROSON, S. A. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, v. 245, p. 752-755, 1989.

FINDLAY, J. K.; DRUMMOND, A. E. Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 10, p. 183-188, 1999.

FINDLAY, J. K.; DRUMMOND, A. E.; DYSON, M. L.; BAILLIE, A. J.; ROBERTSON, D. M.; ETHIER, J. F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 191, p. 35-43, 2002.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. Goiânia; Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Goiânia. Anais: Palestras, 2005, p. 111-113.

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

FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S. A.; SRSEN, V. Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. *Theriogenology*, v. 49, p. 441-449, 1998.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The Primordial to Primary Follicle Transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, p. 53-60, 2000.

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

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

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M. Mutations in na oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, v. 25, p. 279-283, 2000.

GARNETT, K.; WANG, J.; ROY, S. K. Spatiotemporal expression of EGF receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1593-1604, 2002.

GIUDICE, L. C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Review*, v. 13, n. 4, p. 641-69, 1992.

GLISTER, C.; KEMP, C. F.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, v. 127, p. 239-254, 2004.

GOMEZ, J.M.; MOUROT, B.; FOSTIER, A.; LE GAC, F. Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, p. 275-285, 1999.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biology of Reproduction*, v. 45, p. 941-949, 1991.

GONG, J.G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. *Journal of Endocrinology*, v. 139, p. 67-75, 1993.

GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 110, p. 91, 1997.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: Raven Press, 1994, p. 4349.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates-facts and hypothesis. *Endocrine Review*, v. 17, 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, p. 33-41, 2000.

GRANOT, I.; DEKEL, N. Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcript in rat ovaries. *Molecular Reproduction and Development*, v. 47, p. 231–239, 1997.

GUI, L. M.; JOYCE, I. M. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biology of Reproduction*, v. 72, p. 95-199, 2005.

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

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

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, p. 900-909, 2004.

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

HATEY, F.; LANGLOIS, I.; MULSANT, I.; BONNET, A.; BENNE, F.; GASSER, F. Gonadotropins induce accumulation of insulin-like growth factor I mRNA in pig granulosa cells *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 86, p. 205-211, 1992.

HAY, M. F.; CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Structural Changes Occurring During Atresia in Sheep Ovarian Follicles. *Cell and Tissue Research*, v. 169, p. 515-529, 1976.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early follicles. *Endocrinology*, v. 140, p. 1236-1244, 1999.

HEINDEL, J. J.; SNEEDEN, J.; POWELL, C. J.; DAVIS, B. Novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, regulates the function of rat granulosa cells *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 523-530, 1996.

HERNANDEZ, E.R.; HURWITZ, A.; VERA, A. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 74, p. 419-425, 1992.

HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 12, p. 252-257, 2001.

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

HIRSHFIELD, A. N. Hirshfield, Size–frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biology of Reproduction*, v. 38, p. 1181-1188, 1988.

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

HONG, H.; HERINGTON, A.C. Differentiation between the effects of IGF-I and GH on PMSG-induced progesterone production by rat granulosa cells. *Growth Regulation*; v. 1, p. 65–71, 1991.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, 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, p. 1032-1036, 1997.

HOYER, P. E.; BYSKOV, A. G.; MOLLGARD, K. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 234, n. 1-2, p. 1-10, 2005.

HREISSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. L. W.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 87, p. 316-321, 2002.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiological Reviews*, v. 80, p. 593-614, 2000.

HUHTANIEMI, I.; AHTIAINEN, P.; PAKERAINEN, T.; RULLI, S. B.; ZHANG, F.; POUTANEN, M. Genetically modified mouse models in studies of luteinising hormone action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 252, n.1-2, p. 126-135, 2006.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. *Journal of Endocrinology*, v. 168, p. 1-23, 2001.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BEKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary Quartely*, v. 2, n. 16, p. 78-80, 1994.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BEKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 44, p. 217-226, 1995.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; Bekers, J. F.; Bevers, M. M.; Vanderstichele, H.; Van Den Hurk, R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A *in vitro*. *Theriogenology*, v. 48, p. 133-142, 1997.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, v. 296, p. 514-521, 2006.

HUTCHINSON, L. A.; FINDLAY, J. K.; HERINGTON, A. C. Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 55, n. 1, p. 61-69, 1988.

HYNES, M.A.; VAN WYK, J.J.; BROOKS, P.J.; D'ERCOLE, A.J.; JANSEN, M.; LUND, P.K. Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 messenger ribonucleic acids. *Molecular Endocrinology*, v. 1, p. 233-242, 1987.

INGRAM. Atresia. In: ZUCKERMAN, S. (Ed.), *The Ovary*. New York: Academic Press, 1962, p. 247-273.

ITOH, M.; IGARASHI, M.; YAMADA, K.; HASEGAWA, Y.; SEKI, M.; ETO, Y.; SHIBAI, H. Activin A stimulates meiotic maturation of the rat oocyte *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 166, n. 3, p. 1479-1484, 1990.

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

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 45, p. 372-377, 1996.

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1484-1489, 1997.

IZADYAR, F.; HAGE, W. G.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 49, p. 444-453, 1998.

IZADYAR, F.; ZHAO, J.; VAN TOL, H.T.A.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 398-407, 1999.

JAATINEN, R.; LATINEN, M.P.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEMIO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homologue GDF-9B. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 156, p. 189-193, 1999.

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

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v. 45, p. 889-895, 1996.

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.

JIA, X.C.; KALMIJN, J.; HSUEH, A.J. Growth hormone enhances folliclestimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 118, p. 1401-1409, 1986.

JIN, X.; HAN, C. S.; YU, F. Q.; WEI, P.; HU, Z. Y.; LIU, Y. X. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Molecular Reproduction and Development*, v. 70, p. 82-90, 2005.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 185-201, 2003.

JOHNSON, A. L.; LI, Z.; GIBNEY, J. A.; MALAMED, S. Vasoactive intestinal peptideinduced expression of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage and 17-

hydroxylase enzyme activity in hen granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 327-333, 1994.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H. J.; ADAMS, G. B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K. S.; TILLY, J. C.; CORTES, M. L.; FORKERT, R. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v. 122, p. 303-315, 2004.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Review*, v.16, p. 3, 1995.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Developmental Biology*, v. 214, p. 342-353, 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, O.; MCNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1777-1789, 2002

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in the ovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 144-161, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia e seus métodos de estudo. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 1, p. 2-22.

KAISER, G.G.; KOLLE, S.; BOIE, G.; SINOWATZ, F.; PALMA, G.A.; ALBERIO, R.H. In vivo effect of growth hormone on the expression of connexin-43 in bovine ovarian follicles. *Molecular Reproduction*, v. 73, p. 600–606, 2006.

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, p. 37–43, 2002.

KEZELE, P. R.; AGUE, J. M.; NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Alterations in the Ovarian Transcriptome During Primordial Follicle Assembly and Development. *Biology of Reproduction*, v. 72, p. 241-255, 2005

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

KLEINBERG, D. L. Role of IGF-I in normal mammary development. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 47, p. 201-208, 1998.

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.

KÖLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental Changes in the Expression of the Growth Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid and Protein in the Bovine Ovary. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 836, 1998.

KOOS, R. D. Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 1426-1435, 1995.

KREUZER, H.; MASSEY, A. Engenharia genética e biotecnologia. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, 434p.

KUMAR, T.R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, v.15, p. 201–204, 1997.

LACKEY, B. R.; GRAY, S. L.; HENRICKS, D. M. The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. *Cytokine Growth*, v. 10, p. 201-217, 1999.

LAITINEN, M.; VUJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; KETOLA, I.; AALTONEN, J.; LEHTONEN, E.; HEIKINHEIMO, M.; RITVOS, O. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development*, 78:135-140, 1998.

LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J.; GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis and protein synthesis. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 3321-3334, 1991.

LEE, J.; PARK, H. J.; CHOI, H. S.; KWON, H. B.; ARIMURA, A.; LEE, B. J.; CHOI, W. S.; CHUN, S. Y. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

(PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology*, v. 140, p. 818-826, 1999.

LEE, W. S.; OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 994-999, 2001.

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

LEEUWENBERG, B. R.; HURST, P. R.; MCNATTY, K. P. Expression of IGF-I messenger-RNA in the ovine ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 15, p. 251-258, 1995.

LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS, C. T. J. R. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology Review*, v. 16, p. 143-163, 1995.

LEVI-SETTI, P. E.; CAVAGANA, M.; BAGGIANI, A.; ZANONNI, E.; COLOMBO, G. V.; LIPRANDI, V. FSH and LH together in ovarian stimulation. *Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 115, p. 34-39, 2004.

LEVY, D. P.; NAVARRO, J. M.; GLENN, L. S.; DAVIS, O. K.; ROSENWAKS, Z. Debate: The role of LH in ovarian stimulated exogenous LH: Let's design the future. *Human Reproduction*, v. 15, p. 2258-2265, 2000.

LI, R.; MATHER, J. P. Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity *in vitro*. *Endocrinology*, v. 138 p. 4477-4480, 1997.

LI, R.; PHILLIPS, D. M.; MATHER, J. P. Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. *Endocrinology*, v. 136, p. 849-856, 1995.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v. 139, p. 2342-2347, 1998.

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. 139, p. 2480-2485, 1999.

LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJÖBERG, 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, p. 694-698, 2000.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; BAO, S.N.; SILVA, J.R.; GONÇALVES, P.B. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science*, v. 56, n. 3-4, p. 223-236, 1999a.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÃO, 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 in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C. M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUCY, M.C.; COLLIER, R.J.; KITCHELL, M.L.; DIBNER, J.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 1219-1227, 1993.

MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of EGF and IGF-1 on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 1967-1975, 2004.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. *Reproduction*, v. 123, p. 23-30, 2002.

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. 2, p. 106-113, 2005.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.H.; SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; ROCHA-JUNIOR, C.M.C.; LIMA-VERDE, I.B.; LUCCI, C.M.; BÃO, 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*, v. 20, p. 916-924, 2008.

MASSAGUÉ, J. TGF $\beta$  signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, v. 67, p. 753-791, 1998.

MASSAGUÉ, J. How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nature Review*, v. 1, p 169-178, 2000.

MASSAGUÉ, J.; CHEN, Y.G. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes and Development*, v. 14, p. 627-644, 2000.

MATOS, M.H.T.; VAN DEN HURK, R.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A.; SANTOS, K.D.B.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Efeito do fator de crescimento fibroblástico-2 nsobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, n.1, p. 265, 2006.

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

MCCAFFERY, F.H.; LEASK, R.; RILEY, S.C.; TELFER, E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 267-273, 2000.

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

MCGRATH, S.A., ESQUELA, A.F.; LEE, S.J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, v. 9, p. 131-136, 1995.

MCNATTY, K.P., JUENGEL, J.L., WILSON, T. GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reproduction Fertility and Development*, v. 13, p. 549-555, 2001.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 5, 3444-3449, 1993.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.M.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 811-819, 2000.

MIRO, F.; HILLIER, S.G. Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 75, n. 6, p. 1556-1561, 1992.

MIYANO, T. Bringing up small oocyte to eggs in pig and cows. *Theriogenology*, v. 59, p. 61-72, 2003.

MOHSENI-ZADEH, S.; BINOUX, M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. *Endocrinology*, v. 138, p. 5645-5648, 1997.

MONGET, P.; MONNIAUX, D.; DURAND, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, v. 125, p. 2486-2493, 1989.

MONGET, P.; BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, p. 89-93, 2000.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSSEN, J.M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, n.1-2, p. 139-154, 2002.

MONTGOMERY, G.W.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H.; MCNATTY, K.P. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction*, v. 121, p. 843-852, 2001.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. In MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. (ed.), *Embriologia Clínica*, 480p., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p. 13-38.

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

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. *Developmental Biology*, v. 213, p. 1-17, 1999.

NILSSON, E.E.; PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 175, p. 123-130, 2001.

NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1018-1024, 2002.

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

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. 214, p. 19-25, 2004.

NUTTINCK, F.; COLLETTE, L.; MASSIP, A.; DESSY, F. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 45, p. 1235-1245, 1996.

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

O'SHEA, J.D.; HAY, M.F.; CRAN, D.G. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p. 183-187, 1978.

O'SHAUGHNESSY, P.J.; MCLELLAND, D.; MCBRIDE, M.W. Regulation of Luteinizing Hormone Receptor and Follicle-Stimulating Hormone-Receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovarian. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 602-608, 1997.

OJEDA, S.R.; DISSEN, G.A.; ROMERO, C. Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. In: FUJIMOTO, S.; ADASHI, E.Y.; HSUEH, A.J.W.; STRAUSS, J.F. (Eds.), *Frontiers in Endocrinology. Ovarian Function Research: Present and Future*, Rome: Serono Symposia Publications, 1999, v. 21, p. 171-179.

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.

OLIVER, J.E.; AITMAN, T.J.; POWELL, J.F.; WILSON, C.A.; CLAYTON, R.N. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology*, v. 124, p. 2671-2679, 1989.

ORISAKA, M., ORISAKA, S. J.; JIN-YI, C. J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; ANDTSANG, B. K. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology*, v. 20, p. 2456-2468, 2006.

OTANI, N.; MINAMI, S.; YAMOTO, M.; SHIKONE, T.; OTANI, H.; NISHIYAMA, R.; OTANI, T.; NAKANO, R. The vascular endothelial growth factor/*fms*-like tyrosine kinase

system in the human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 84, p. 3845–3851, 1999.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.H.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 39523-39528, 2000.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 11387-11392, 2001.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 8060-8065, 2002.

PAN, B.; SENGOKU, K.; TAKUMA, N.; GOISH, K.; HORIKAWA, M.; TAMATE, K.; ISHIKAWA, M. Differential expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 214, p. 1-8, 2004.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v. 303, p. 682-684, 2004.

PARROT, 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, p. 2240-2245, 1998.

PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v. 140, p. 262-271, 1999.

PEDRO, K.G. Neuropeptides in the skin. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 4, p. 483-498, 2003.

PERKINS, G.A.; FREY, T.G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*, v. 31, p. 97-111, 2000.

PERKS, C.M.; DENNING-KENDALL, P.A.; GILMOUR, R.S.; WATHES, D.C. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 136, p. 5266–5273, 1995.

PERKS, C.M.; DENNING-KENDALL, P.A.; GILMOUR, R.S.; WATHES, D.C. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, v. 136, p. 5266–5273, 1995.

PERKS, C.M.; WATHES, D.C. Expression of mRNAs for insulin-like growth factor binding proteins-2, -3 and -4 in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, v. 151, p. 241–249, 1996.

PERKS, C.M.; PETERS, A.R.; WATHES, D.C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 116 157–165, 1999.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, p. 703-715, 2008, POSTEL-VINAY, M.C.; DESBUQUOIS, B. Interaction of human growth hormone with isolated rat liver cells. *Endocrinology*, v. 100, p. 209-215, 1977

QUESNEL, H. Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary. *Journal of Endocrinology*, v. 163, p. 363-372, 1999.

QUINTANA, R.; KOPCOW, L.; SUELDO, C.; MARCONI, G.; RUEDA, N.G.; BARAÑAO, R. I. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertility and Sterility*, v. 82, n. 3, p. 1101-1105, 2004.

QVIST, R.; BLACKWELL, L.F.; BOURNE, H.; BROWN, J.B. Development of Mouse Ovarian Follicles from Primary to Ovulatory Stages *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 89, p. 169-180, 1990.

RABINOVICI, J.; JAFFE, R.B. Development and Regulation of Growth and Differentiated Function in Human and Subhuman Primate Fetal Gonads. *Endocrine Reviews*, v. 11, n. 4: 532-557, 1990.

RABINOVICI, J.; SPENCER, S.J.; DOLDI, N.; GOLDSMITH, P.C.; SCHWALL, R.; JAFFE, R.B. Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *Journal of Clinical Investigation*, v. 89, p. 1528-1536, 1992.

RAJARAM, S.; BAYLINK, D.J.; MOHAN, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocrine Reviews*, v.18, p. 801-831, 1997.



RANKE, M.B.; STANLEY, C.A.; RODBARD, D.; BAKER, L.; BONGIOVANNI, A.; PARKS, J.S. Sex Differences in Binding of Human Growth Hormone to Isolated Rat Hepatocytes. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America*, v. 73, p.847-851, 1976.

RANKIN, T.L.; O'BRIEN, M, LEE, E.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.; DEAN, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, v. 128, p. 1119-1126, 2001.

REDMER, D.; REYNOLDS, L. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, v. 1, p. 182-192, 1996.

REEKA, N.; BERG, F.D.; BRUCKER, C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Human Reproduction*, v. 13, p. 2199-2205, 1998.

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Review*, v. 15, p.725-751, 1994.

RICHARDS, J.S. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 234, p. 75-79, 2005.

RIESE, D.J.; STERN, D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioassays*, v. 2, p. 41-48, 1998.

ROBERTS, R.D.; ELLIS, R.C.L. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 1387-1392, 1999.

ROBINSON, L.L.; GASKELL, T.L.; SAUNDERS, P.T.; ANDERSON, R.A. Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. *Molecular Human Reproduction*, v. 7, n. 9, 845-52, 2001.

ROY, A.; MATZUK, M.M. Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction*, v. 131, p. 207-219, 2006.

ROY, S.K. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 552-557, 1993.

ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 103-114, 1989.

ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology*, v. 126, p. 1309-1317, 1990.

ROY, S.K.; KOLE, A.R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: *in vitro* effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF beta on receptor expression in human preantral follicles. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, p. 207-214, 1998.

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

SADATSUKI, M.; TSUTSUMI, O.; YAMADA, R.; MURAMATSU, M.; TAKETANI, Y. Local regulatory effects of activin A and follistatin on meiotic maturation of rat oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 196, n. 1, p. 388-395, 1993.

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

SAKATA, S.; SAKAMAKI, K.; WATANABE, K.; NAKAMURA, N.; TOYOKUNI, S.; NISHIMUNE, Y.; MORI, C.; YONEHARA, S. 2003. Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice. *Cell Death and Differentiation*, v. 10, n. 6, p. 676-686, 2003.

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

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants, *Rec. Vét.*, v. 167, p. 205-218, 1991.

SHARARA, F.I.; NIEMAN, L.K. Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 79, p. 670-672, 1994.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 53, p. 59-72, 2000.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J.S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 6, p. 1352-1365, 2006.

SHIMASAKI, S.; ZACHOW, R.J.; LI, D.; KIM, H.; IEMURA, S.; UENO, N.; SAMPATH, K.; CHANG, R.J.; ERICKSON, G.F. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 96, p. 7282-7287, 1999.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R.K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G.F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Review*, v. 25, p. 72-101, 2004.

SHIMIZU, T. Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n. 1, p. 23-32, 2006.

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, p. 143-152, 2008.

SHINTANI, Y.; DYSON, M.; DRUMMOND, A.E.; FINDLAY, J.K. Regulation of follistatin production by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*, v. 138, n. 6, p. 2544-51, 1997.

SHUKOVSKI, L.; DYSON, M.; FINDLAY, J.K. The effects of follistatin, activin and inhibin on steroidogenesis by bovine thecal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 97, n. 1-2, p. 19-27, 1993.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; BÁO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Theriogenology*, v. 54, p. 809-822, 2000.

SILVA, J.R.; FERREIRA, M.A.; COSTA, S.H.; SANTOS, R.R.; CARVALHO, F.C.; RODRIGUES, A.P.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research*, v. 43, p. 203-209, 2002.

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

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

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T.A.; ROELEN, B.A.J.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone

morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Molecular Reproduction and Development*, v. 70, p. 11-19, 2005.

SILVA, J.R.V.; THARASANIT, 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, p. 113-125, 2006a.

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

SILVA, J.R.V. Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. 2005. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, 2005. Silva 2008.

SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. In press, 2009a.

SILVA, C.M.G.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L.R.; PINTO, L.C.; CHAVES, R.N.; ARAUJO, V.R.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Animal Reproduction Science*. In press, 2009b.

SIMON, A.M.; GOODENOUGH, D.A.; LI, E.; PAUL, D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, v. 385, p. 525-529, 1997.

SINGH, B.; RUTLEDGE, J.M.; ARMSTRONG, D.T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 40, p. 391-399, 1995a.

SINGH, B.; KENNEDY, T.G.; TEKPETEY, F.R.; ARMSTRONG, D.T. Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 113, p. 137-143, 1995b.

SIROTKIN, A.V.; MAKAREVICH, A.V. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *Journal of Endocrinology*, v. 163, p. 317-327, 1999.

SIROTKIN, A.V.; MAKAREVICH, A.V. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. *Animal Reproduction Science*, v. 70, n.1-2, p. 111-126, 2002.

SKINNER, M.K.; COFFEY, R.J. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- $\alpha$  by theca cells. *Endocrinology*, v.123, p. 2632-2638, 1988.

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

SLOT, K.A.; KASTELIJN, J.; BACHELOT, A.; KELLY, P.A.; BINART, N.; TEERDS, K.J. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reproduction*. v. 131, p. 525-532, 2006.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; HU, Y.; VANDERSTICHELE, H. Effects of recombinant activin A on *in vitro* culture of mouse preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 50, n. 3, p. 294-304, 1998.

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

SO-YOUNG, S.; JIN-YOUNG, L.; EUNYOUNG, L.; JONGYEOB, C.; BYUNG-KOO, Y.; DUKSOO, B.; DOOSEOK, C. Protective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. *The European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 125, p. 233-238, 2006.

SPICER, L.J.; HANRAHAN, J.P.; ZAVY, M.T.; ENRIGHT, W.J. Relationship between ovulation rate and concentrations of insulin-like growth factor-I in various genotypes of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 97, p. 403-409, 1993.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 12, p. 223-245, 1995.

SPICER, L.J.; AAD, P.Y.; ALLEN, D.T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A.H.; HSUEH, A.J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. *Biology of Reproduction*, v. 78, p. 243-253, 2008.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1997, p. 666. ISBN: 0070610282

STOOP, H.; HONECKER, F.; COOLS, M.; DE KRIJGER, R.; BOKEMEYER, C.; LOOIJENGA, L.H. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Human Reproduction*, v. 20, n. 6, p. 1466-76, 2005.

TASSEL, R.; KENNEDY, J.P. Early follicular development and atretic changes in ovary of the Lamb-fine struture and histochemistry. *Australian Journal of Biological Sciences*, v. 33, p. 675-678, 1980.

TEKPETEY, F.R.; SINGH, B.; BARBE, G.; ARMSTRONG, D.T. Localisation of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor-alpha stimulation of luteal cell steroidogenesis *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 110, p. 95-102, 1995.

TELFER, E.E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v. 45, p. 101-110, 1996.

THOMAS, F.H.; ETHIER, J.F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B.C. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, v. 146, p. 941-949, 2005.

THOMAS, F.H.; CAMPBELL, B.K.; ARMSTRONG, D.G.; TELFER, E.E. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development *in vitro*. *Reproduction*, v. 133, p. 1121-1128, 2007.

THOMAS, M.J.; KIKUCHI, K.; BICHELL, D.P.; ROTWEIN, P. Rapid activation of rat insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone reveals no alterations in deoxyribonucleic acid- protein interactions within the major promoter. *Endocrinology*, v. 135, p. 1584-1592, 1994.

TILLY, J.L.; BILLIG, H.; KOWALSKI, K.I.; HSUEH, A.J. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor supress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine-kinase-depedent mechanism. *Molecular Endocrinology*, v. 6, p. 1942-50, 1992.

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

TOLEDO, S.P.A.; BRUNNER, H.G.; KRAAIJ, R. An inactivating mutation of the Luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46, XX female. *Journal and Clinic Endocrinology and Metabolism*. v. 81, p. 3850-3854, 1996.

TOOGOOD, A.A.; SHALET, S.M. Ageing and growth hormone status. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*. v. 12, p. 281-296, 1998.

TSAFIRI, A.; BRAW, R.H. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, v. 6, p. 226-265, 1984.

VALVE, E.; PENTTILA, T.; PARANKO, J.; HÄRKÖNEN, P. FGF-8 is expressed during specific phases of reodent oocyte and spermatogonium development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 232, p. 173-177, 1997.

VAN DEN HURK, R.; SPEK, E.R.; HAGE, W.J.; FAIR, T.; RALPH, J.H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolate preantral follicles. *Human Reproduction*, v. 4, p. 833-841, 1998.

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

VAN TOL, H.T.; BEVERS, M.M. Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 51, n. 3, p.315-321, 1998.

VAN WEZEL, I.L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W.D.; RODGERS, R.J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growyh factor in bovine ovarian follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 115, p. 133-140, 1995.

VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization ofbovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

VERNON, R.K.; SPICER, L.J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced streroidogenesis by bovine granulosa cells. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 2696-2702, 1994.

VITT, U.A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A.J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 370-377, 2000.

WALDEYER, W. Eierstock und Ei. Ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane. In: WALDEYER, W., *Halbleineneinband*. 1. ed., Leipzig: Wilhelm Engelmann, Taf., 1870, v. 3, p. 174.

WANDJI, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M. Differential response to gonodotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 46, p. 1034-1041, 1992.

WANDJI, S.A.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. *Theriogenology*, v. 45, p. 817-832, 1996.

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

WANDJI, S.A.; WOOD, T.L.; CRAWFORD, J.; LEVISON, S.W.; HAMMOND, J.M. Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology*, v. 139, p. 5205–5214, 1998.

WANG, J.; ROY, S.K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 577–585, 2004.

WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press, 1988, p. 69-101.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, v. 53, p. 95–112, 1998.

WEBB, R.; GARNSWORTH, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, p.63-74, 2004.

WEISS, J.; AXELROD, L.; WHITCOMB, R.W.; HARRIS, P.E.; CROWLEY, W.F.; JAMESON, J.L. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *England Journal Mededic*, v.326, p. 179-183, 1992.

WOAD, K.J.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, p. 293-302, 2000.

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries, *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p. 190-200, 1997.

WU, J.; NAYUDU, P.L.; KIESEL, P.S.; MICHELMANN, H.W. Luteinizing Hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 320-327, 2000.



YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; TSURUTA, Y.; NANBU, K.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; HAMID, A. 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, p. 371–381, 1997.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. Insulin and insulin-like growth factor I exert opposite effects on the activation of bovine primordial follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 1, p. 111, 2002.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 2, p. 127–37, 2001.

YEO, C.X.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G.; LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Human Reproduction*, v. 23, p. 67–73. 2008.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H.E.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 10678–10683, 2006.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.S.; LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 15, n. 1, p. 55–63, 1998.

ZAMA, A.M.; HUDSON, F.P.; BEDELL, M.A. Analysis of Hypomorphic Kitl<sup>Sl</sup> Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 639–647, 2005.

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

ZHAO, J.; DORLAND, M.; TAVERNE, M.A.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; BEVERS, M.M.; AND VAN DEN HURK, R. *In vitro* culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Molecular Reproduction and Development*, v. 55, p. 65–74, 2000.

ZHAO, J.; TAVENE, M.A.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, p. 287–296, 2001a.

ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.M.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and

localization of activin A and activin receptor II. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 967-977, 2001b.

ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.; VAN DEWEIJDEN, 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 pre-antral follicles. *Zygote*, v. 10, p. 85–94, 2002.

ZHONG, Y.; KASSON, B.G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3, 5-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v. 135, p. 207–213, 1994.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 90, n. 3-4, p. 265-272, 2005.

ZHOU, J.; CHIN, E.; BONDY, C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology*, v. 129, p. 3281–3288, 1991.

ZHOU, J.; ADESANYA, O.O.; VATZIAS, G.; HAMMOND, J.M.; BONDY, C.M.; Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology*, v. 137, p. 4893, 1996.

## **APÊNDICE**

**Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.32, n.1, p.36-49.**

**Regulação da Foliculogênese Inicial em Mamíferos**

*(Regulation of Early Folliculogenesis in Mammalian)*

Fabricio Sousa *Martins*<sup>1</sup>, José Roberto Viana *Silva*<sup>1</sup>, Ana Paula Ribeiro *Rodrigues*<sup>1</sup>, José Ricardo de *Figueiredo*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais  
LAMOFOPA - Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000, Fortaleza, Ceará.

Correspondência: fabriciosm@fortalnet.com.br

**RESUMO**

A foliculogênese ovariana é caracterizada pelo processo de formação, crescimento e maturação folicular iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório. A presente revisão mostra a importância de hormônios e fatores de crescimento na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos visando o estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro*.

**Palavras-chave:** Hormônios, fatores de crescimento, cultivo *in vitro*, folículos pré-antrais.

**ABSTRACT**

Ovarian folliculogenesis is constituted through follicular formation, growth and maturation that begin with primordial follicle source to antral follicles. The present review shows the importance of hormones and growth factors that control the earliest stages of folliculogenesis in order to develop an *in vitro* culture systems that support the initiation and progress of follicular growth.

**Key word:** *in vitro* culture, preantral follicles, hormones, growth factors, mammals.

## INTRODUÇÃO

O ovário dos mamíferos é constituído, ao nascimento, por milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o *pool* de reserva dos folículos ovarianos. Entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação, visto que a maioria morre por um processo fisiológico designado atresia folicular (Marström *et al*, 2002). A ativação, ou seja, a saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência para a fase de crescimento é a primeira e essencial etapa, onde os folículos primordiais deixam o estágio de repouso e iniciam seu crescimento. Os mecanismos precisos que controlam o início e a progressão do crescimento folicular estão ainda sendo investigados. Em espécies mamíferas, o contínuo crescimento folicular é controlado tanto por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como fatores de crescimento que agem, estes últimos, direta ou indiretamente, de forma autócrina ou parácrina.

Neste contexto, uma melhor identificação e compreensão das diferentes substâncias envolvidas na promoção do desenvolvimento folicular e no curso da atresia são aspectos importantes para subsidiar o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente para que ocorra a ativação folicular *in vitro*, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais (Demeestere *et al*, 2005). Por conseguinte, poderá ser uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diversos estádios de desenvolvimento, para as biotécnicas de produção *in vitro* de embriões e clonagem (Telfer, 1996).

No decorrer desta revisão, serão abordados aspectos como oogênese, foliculogênese, classificação e caracterização dos folículos ovarianos, população e atresia folicular e importância de hormônios e fatores de crescimento na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos.

### Oogênese

Conforme descrito por Rüsse (1983), a oogênese em ruminantes consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do oócito haplóide fecundado. A oogênese inicia-se antes do nascimento, mas somente alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (Wassarman, 1988). No embrião, as células germinativas primordiais localizadas na parede do saco vitelínico migram para as gônadas em desenvolvimento, perdem suas características de

motilidade e sofrem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas transformando-se em oogônias (Sadeu *et al.*, 2006). Dois tipos de células germinativas com funções diferentes resultam da última divisão mitótica das CGP. Uma inicia, imediatamente, outra divisão mitótica e dá origem a uma linha de células oogoniais, enquanto a outra permanece em intérfase e divide-se periodicamente, originando novas CGP que se diferenciarão posteriormente em oogônias. Uma vez formadas, as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos (Hirshfield, 1991). No estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica ou vesícula germinativa, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (Moore & Persaud, 1994). Na puberdade, imediatamente antes da ovulação, com o pico dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), os oócitos que terminaram seu crescimento retomam a meiose e o núcleo passa do estágio de vesícula germinativa para diacinese (Moore & Persaud, 1994). Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário (Betteridge *et al.*, 1989). Inicia-se a seguir a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (Gordon, 1994). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então, completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado (Moore & Persaud, 1994).

### **Foliculogênese**

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (Van den Hurk & Zhao, 2005). A foliculogênese ocorre simultaneamente a oogênese, quando o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies. Em outras palavras, a foliculogênese inicia após e termina antes da oogênese e pode ser dividida em duas fases: 1) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; 2) fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários.

## **Classificação e caracterização estrutural dos folículos ovarianos**

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (Saumande, 1991). De acordo com os aspectos morfológicos, os folículos podem ser divididos em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, primários e secundários e 2) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de De Graaf ou pré-ovulatório (Hulshof *et al.*, 1994).

### **Crescimento folicular**

O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da passagem dos folículos do *pool* de reserva, ou folículos quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e pré-ovulatório; Russe, 1983). O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa. Neste processo, os folículos primordiais gradualmente adquirem células da granulosa de formato cúbico, tornam-se folículos de transição, caracterizados pela presença de células da granulosa com ambos formatos pavimentoso e cúbico, e em seguida, folículos primários, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico (Gougeon & Busso, 2000). Além da mudança da forma das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente (Hirshfield, 1991). Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais, bem como os mecanismos envolvidos na variação do período de início do crescimento folicular são ainda enigmáticos e representam uma das maiores questões relacionadas com a biologia ovariana (Fortune *et al.*, 2000).

Uma característica notável dos folículos primários é a presença de uma zona pelúcida, formada por glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), que circunda o oócito (Rankin *et al.*, 2001). Os folículos são denominados secundários quando apresentam duas a três camadas de células da granulosa e células da teca em torno da membrana basal (Barnett *et al.*, 2006). Neste estágio, as células da granulosa apresentam 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 (Kidder e Mhaw, 2002).

A próxima fase da foliculogênese, em que os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, é caracterizada pela organização das células da granulosa em várias camadas com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de

células granulosa, denominada antro. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (Barnett *et al.*, 2006).

### **População folicular**

A quantidade total de folículos presente no ovário de um mamífero é determinada logo no período embrionário em primatas e ruminantes (Betteridge *et al.*, 1989) ou em breve período após o nascimento em roedores (Hirshfield, 1991). Contudo, recentes trabalhos têm demonstrado mecanismos envolvidos na formação, após o nascimento, de novas células germinativas e folículos na mulher (Bukovsky *et al.*, 2004) e camundonga adultas (Johnson *et al.*, 2004). O número de folículos pré-antrais por ovário varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (Shaw *et al.*, 2000); 33.000 na ovelha (Amorim *et al.*, 2000); 35.000 na cabra (Lucci *et al.*, 1999) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986).

### **Atresia folicular**

O número de folículos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno. Estima-se que aproximadamente 99,9% sofrem um processo degenerativo ou apoptótico conhecido por atresia, fazendo com que o ovário seja um órgão de baixíssima produtividade (Johnson, 2003).

Ainda na década de 80, foi postulado que a atresia ocorre por um processo de morte celular programada conhecido por apoptose (Tsafiri & Braw, 1984). Recentemente, um grande número de evidências tem demonstrado que a apoptose, realmente, é o mecanismo bioquímico responsável pela atresia folicular (Markstrom *et al.*, 2002) e é um programa de suicídio celular ativo encontrado em todos os organismos multicelulares, ocorrendo em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a um estímulo fisiológico. A alteração típica observada é a condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear. Independentemente da condensação da cromatina, endonucleases dependentes de cálcio e magnésio são ativadas, resultando na clivagem do DNA entre as unidades nucleossomais, a cada 180-200 pares de bases, e formação de corpos apoptóticos (Tilly, 1996).



Durante a atresia, muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa de folículos atrésicos. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária (Morita e Tilly, 1999). Nestes folículos, alterações nas células da granulosa são raramente observadas. À medida que o folículo se desenvolve, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa.

A progressão da apoptose em folículos ovarianos é dependente de uma regulação cooperativa de diferentes fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, e é possível que nenhum destes fatores, isoladamente, seja essencial para o controle do crescimento folicular ou atresia. É mais provável que o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose decidirá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (Hsu e Hsueh, 2000). Duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: família das caspases e a família Bcl-2 (Markstrom *et al.*, 2002). As caspases são consideradas as executoras principais do caminho apoptótico e atuam ativando DNAses, que são endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal. A DNase e sua unidade inibitória são constantemente expressas nas células. A clivagem, mediada por caspases, da subunidade inibitória resulta na liberação e ativação das endonucleases que cliva o DNA a cada 180-200 pares de bases nitrogenadas. A família Bcl-2 compreende tanto membros anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> e membros pró-apoptóticos, incluindo Bax, Bid, Bik, BOD e Bcl-X<sub>S</sub> (Markstrom *et al.*, 2002).

### **Importância do FSH, LH e GH no controle da foliculogênese**

A regulação da proliferação celular, diferenciação, e atresia relacionadas com a foliculogênese é resultado de uma complexa interação entre fatores locais e endócrinos (Silva *et al.*, 2006). Nesse contexto observa-se uma grande importância de gonadotrofinas e somatotrofinas no que se refere ao crescimento dos folículos ovarianos (Levi-Setti *et al.*, 2004). A seguir serão relatados os efeitos do FSH, LH e GH.

### **Hormônio Folículo Estimulante (FSH)**

O hormônio gonadotrófico FSH é crucial para a manutenção da função ovariana. A atuação do FSH é mais direcionada às células da granulosa e resulta em uma variedade de

reações, tais como a estimulação da proliferação celular, síntese de esteróides e expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Hormônio Luteinizante (LH). Sabe-se que as gonadotrofinas são necessárias para o desenvolvimento de folículos antrais, entretanto, ainda não está claro se o FSH afeta a proliferação de pequenos folículos pré-antrais.

A expressão de receptores de FSH nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais bovinos, bem como em oócitos de folículos primordiais de animais de laboratório, reforçam a idéia da ação do FSH sobre o crescimento dos folículos pré-antrais (Roy, 1993, Wandji *et al.*, 1992). Durante o cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70  $\mu$ m) bovinos, o FSH promoveu um aumento do diâmetro folicular (Hulshof *et al.*, 1995). Após seis dias de cultivo na presença de FSH, folículos primários e secundários (60-179  $\mu$ m), isolados enzimaticamente de ovários de fetos bovinos, aumentaram o diâmetro, a sobrevivência folicular, bem como a secreção de progesterona e estradiol (Wandji *et al.*, 1996). Gutierrez *et al.* (2000) isolaram folículos secundários bovinos e, após cultivo de 28 dias, observaram que o FSH promoveu o crescimento folicular e aumentou as taxas de formação de antro. Em suínos, o FSH está envolvido na proliferação e diferenciação de células da granulosa de folículos pré-antrais (Hirao *et al.*, 1994).

Em hamsters, pequenos folículos pré-antrais mostraram ser dependentes de FSH, pois esse hormônio reduziu significativamente a percentagem de folículos atrésicos (Roy e Greenwald, 1989). Liu *et al.* (1999) observaram que o FSH promoveu o crescimento de folículos pré-antrais (95–120  $\mu$ m) isolados de ovários de camundongas adultas. Nesta mesma espécie, o FSH aumentou a sobrevivência e proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a secreção de estradiol e inibina em folículos isolados (95-142  $\mu$ m) (Cortvrindt *et al.*, 1997).

### **Hormônio Luteinizante (LH)**

O hormônio luteinizante (LH) é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior, junto com o FSH, sendo um regulador primário da função ovariana. O LH pode apresentar múltiplos papéis sobre o desenvolvimento folicular, porém grande parte dos estudos têm focado sua ação em folículos em estádios mais avançados de desenvolvimento, durante a fase pré-ovulatória (Wu *et al.*, 2000). Embora receptores não-funcionais de LH tenham sido detectadas em gônadas de roedores mesmo antes da formação folicular, o primeiro receptor

funcional para LH (LHR) foi detectado em ovários de camundongas 5 dias após o nascimento (O'Shaughnessy *et al.*, 1997). Isto coincide com o período de diferenciação morfológica das células intersticiais da teca de folículos primários em crescimento e com a capacidade de expressão da esteroidogênese basal. O FSH e LH utilizados isoladamente têm demonstrado suportar o crescimento folicular *in vitro* (Cortvrindt *et al.*, 1998). Wu *et al.*, (2000), realizando experimentos com camundongos, mostraram que o LH é necessário para o desenvolvimento *in vitro* de pequenos folículos pré-antrais. Outro estudo relatou que 70% dos folículos pré-antrais alcançaram o estágio de metáfase II quando o cultivo foi realizado por 13 dias em meio contendo FSH e LH juntos (Cortvrindt *et al.*, 1998). Recentemente, Braw-Tal e Roth (2005), demonstraram a presença de receptores para LH na teca interna de folículos pré-antrais em estádios mais avançados e tais receptores estão diretamente relacionados à viabilidade folicular, sendo sua presença progressivamente reduzida com a atresia.

### **Hormônio do Crescimento (GH)**

O GH é um hormônio somatotrófico secretado pelo lobo anterior da hipófise na circulação e liga-se a receptores nos tecidos alvo com o objetivo de estimular o crescimento (Herrington & Carter-Su, 2001). Experimentos *in vivo* têm revelado que este hormônio atua promovendo o desenvolvimento de folículos ovarianos de bovinos (Gong *et al.*, 1991), aumentando as concentrações periféricas de insulina e/ou IGF-1 em novilhas (Gong *et al.*, 1997) e reduzindo os níveis de apoptose em folículos pré-ovulatórios de roedores (Danilovich *et al.*, 2000). Além disso, o GH age sobre as células da granulosa de ratas acelerando o processo de diferenciação das células foliculares em células luteínicas (Hutchinson, 1988).

Outros trabalhos com folículos pré-antrais de camundongas medindo 100-105  $\mu\text{m}$  mostraram que o GH, na concentração de 1 mUI/mL, aumentou o diâmetro folicular durante 4 dias de cultivo (Liu *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2001). Kobayashi *et al.* (2000), utilizando essa mesma concentração em seus experimentos com camundongas, mostraram que o GH promoveu a produção de estradiol, a secreção de inibina em cultivo e a proliferação das células da granulosa e da teca. Já em bovinos, a utilização de 100 ng/mL de GH adicionado de insulina aumentou a síntese de progesterona e a proliferação das células da granulosa cultivadas por 4 dias (Langhout *et al.*, 1991).

Eckery *et al.* (1997) demonstraram que o RNAm para o receptor do GH é abundante no oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e pequenos antrais de ovelhas. Em ovários bovinos, o RNAm já foi localizado no oócito de folículos primordiais e primários e

começa a ser expresso em células da granulosa de folículos primários permanecendo durante o estágio secundário (Kolle *et al.*, 1998).

### **Importância dos fatores de crescimento no controle da foliculogênese**

É sabido que o crescimento dos folículos presentes no ovário mamífero pode ser regulado por gonadotrofinas, somatotrofinas e por fatores intra-ovarianos. Inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos. A seguir serão descritos os efeitos do Fator de Crescimento de Diferenciação-9 (GDF-9), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), Kit Ligand (KL), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Proteína Morfogenética do Osso-15 (BMP-15), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator de Crescimento Keratinócito (KGF), Neurotrofinas, Peptídeo Intestina Vasoativo (VIP) e Ativina.

### **Fator de Crescimento de Diferenciação-9 (GDF-9)**

O GDF-9 é uma proteína homodimérica secretada pelo oócito, pertencente à família de fatores de crescimento transformantes – TGF- $\beta$  (Chang *et al.*, 2002). Esta substância atua promovendo o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca de ratas (Nilson e Skinner, 2002), estimulando a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos (Hreisson *et al.*, 2002). Além disso, exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais murinos (Hayashi *et al.*, 1999). Dong *et al.* (1996) mostraram que na ausência do GDF-9, não ocorre a formação de folículos secundários, levando conseqüentemente à degeneração dos oócitos inclusos em folículos primários. Hreisson *et al.* (2002) demonstraram que o GDF-9 na concentração de 200 ng/mL promove a sobrevivência e a progressão dos folículos ao estágio secundário após 7 dias de cultivo. Wang e Roy (2004) propuseram que, o GDF-9 pode influenciar a expressão de fatores de crescimento folicular como o KL e que, durante 9 dias de cultivo, 10 ng/mL de GDF-9 estimula o crescimento de folículos primordiais e que ainda em altas doses (200 ng/mL) ocorre o aumento da proporção de folículos secundários de hamster. O RNAm para o GDF-9 tem sido localizado em oócito de ovários bovinos, ovinos (Bodensteiner *et al.*, 1999), caprinos (Silva *et al.*, 2004b) e humanos (Aaltonen *et al.*, 1999). A sua expressão em oócitos de folículos primordiais de ovelhas e cabras levantou a

possibilidade de que o GDF-9 é essencial para a ativação de folículos primordiais e o seu subsequente desenvolvimento. Recentemente, Silva *et al.* (2004b) demonstraram que o GDF-9 e os seus receptores estão expressos em todos os tipos de folículos ovarianos na espécie caprina.

### **Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1)**

O sistema IGF é composto de diferentes elementos, ou seja, IGF-1 e IGF-2, dois tipos de receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e seis proteínas de ligação (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, e -6). O IGFR-1 funciona como receptor para os dois tipos de IGF enquanto que o IGFR-2 tem maior afinidade para IGF-2 (Jones e Clemmons, 1995). As IGFBP estão presentes nos fluidos biológicos e atuam inibindo ou potencializando a ação dos dois tipos de IGF nas células alvo (Monget *et al.*, 2002). Os níveis de IGFBP-2, -4 e -5 em ruminantes, dramaticamente diminuem e aumentam durante o crescimento folicular na fase terminal e atresia, respectivamente. Em particular, a expressão do RNAm da IGFBP-2 diminui durante o crescimento folicular em ovários de ovinos, bovinos e suínos e a expressão de RNAm da IGFBP-5 aumenta em células da granulosa de folículos atresícos de bovinos e ovinos. Há fortes evidências sugerindo que a alteração nos níveis de IGFBP é consequência de um aumento da degradação proteolítica das IGFBPs pela proteína plasmática associada à gestação (PAPP-A). A expressão do RNAm para o PAPP-A é restrita ao compartimento das células da granulosa e é positivamente correlacionada com a expressão de aromatase e receptores de LH. (Monget *et al.*, 2002). Em ovários de suínos e roedores, o IGF-1 tem sido localizado nas células da granulosa de folículos antrais saudáveis enquanto que o IGF-2 foi encontrado nas células da granulosa de folículos saudáveis e atresícos (Zhou *et al.*, 1996). Ambos receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (Monget *et al.*, 1989). O IGF-1, adicionado durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, estimulou o crescimento folicular em humanos (Louhio *et al.*, 2000), bovinos (Gutierrez *et al.*, 2000), ratos (Zhao *et al.*, 2001) e camundongos (Liu *et al.*, 1998) em sinergia com o FSH. Experimentos de Zhou e Zhang (2005) mostraram que o IGF-1 na concentração de 100 mg/L proporcionou o crescimento e a viabilidade de oócitos inclusos em folículos pré-antrais caprinos. Em suínos, a utilização de 50 ng/mL de IGF-1 resultou o crescimento folicular, estimulou a proliferação das células da granulosa e previniu a apoptose de folículos pré-antrais cultivados por 4 dias na presença de soro. Em camundongos, o IGF-1 (10, 50 e 100 ng/mL) aumentou a esteroidogênese de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por 6, 10 e 12

dias (Demeestere *et al.*, 2004). Em ratos, o IGF-1 aumentou significativamente o diâmetro folicular e o conteúdo do DNA. A análise desses folículos através da microscopia eletrônica de transmissão mostrou retículo endoplasmático bem desenvolvido e mitocôndrias intactas nas células da granulosa. Além disso, foi observado que as microvilosidades entre o oócito e as células da granulosa e as junções gap entre as células foliculares também aumentaram quando estes folículos foram cultivados na presença de IGF-1, sugerindo que este fator de crescimento promove a manutenção da integridade funcional dos folículos (Zhao *et al.*, 2001).

### **Kit ligand (KL)**

O KL, também denominado fator de células tronco (SCF) ou fator de crescimento multipotente, é um fator de crescimento que exerce influência nas células alvo através de sua ligação ao receptor tirosina-quinase, conhecido com c-kit. Numerosos trabalhos têm mostrado que em ovários de roedoras o KL e c-kit são importantes para a migração, proliferação e sobrevivência de células germinativas primordiais (Zama *et al.*, 2005), ativação de folículos primordiais (Parrott e Skinner, 1999), crescimento e sobrevivência do oócito (Jin *et al.*, 2005) e proliferação das células da granulosa (Otsuka e Shimasaki, 2002). Já foi relatado que os oócitos em todos os estádios de desenvolvimento expressam RNAm para o c-kit e sua proteína (Doneda *et al.*, 2002). Similarmente as células da granulosa de folículos em todos os estádios de desenvolvimento expressam RNAm para o KL e sua proteína, embora a expressão seja muito baixa em células da granulosa de folículos primordiais (Doneda *et al.*, 2002). O KL é derivado das células da granulosa e o c-kit é expresso pelo oócito e células da teca, sendo este fato um excelente exemplo de como as interações parácrinas entre o oócito e as células somáticas controlam muitos aspectos da formação e desenvolvimento folicular. A utilização do KL no cultivo *in vitro* de ovários de ratas recém nascidas, por 5 ou 14 dias, aumentou a percentagem de folículos em crescimento, quando comparado ao meio controle (Parrott e Skinner, 1999), sugerindo um papel do KL na ativação de folículos primordiais.

### **Fator de Crescimento Epidermal (EGF)**

O EGF é pertencente à família EGF, a qual consiste de no mínimo 8 membros (Riesse e Stern, 1998). A proteína EGF tem sido demonstrada no oócito e células da granulosa de folículos nos estádios iniciais e avançados (humano: Bennett *et al.*, 1996, hamster: Roy e Greenwald, 1990; suíno: Singh *et al.*, 1995a), enquanto que o RNAm do EGF já foi descrito somente no oócito e células da granulosa de folículos antrais suínos (Singh *et al.*, 1995a). A

ação do EGF é mediada por um receptor de membrana, ErbB1, o qual é pertencente à superfamília ErbB (Riese e Stern, 1998). O receptor EGF (EGF-R) é uma glicoproteína transmembranária (Carpenter, 1999) e está localizado na membrana celular das células da granulosa em todos os estádios de desenvolvimento folicular, células intersticiais circundando pequenos folículos pré-antrais, células da teca e oócito de todos os estádios foliculares. A expressão da proteína para o receptor do EGF e o RNA mensageiro é regulada positivamente pelas gonadotrofinas e pelos esteróides (Garnett *et al.*, 2002) e têm sido localizada em oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais e também nas células luteais de porcas (Singh *et al.*, 1995b) e ratas (Tekpetey *et al.*, 1995). O EGF e seu receptor são expressos nos folículos ovarianos caprinos em todos os estádios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo e na superfície do epitélio ovariano (Silva *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que o EGF promove a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais (Morbeck *et al.*, 1993), o aumento do diâmetro de folículos pré-antrais bovinos (Gutierrez *et al.*, 2000), hamsters (ROY, 1993), camundongos (Boland e Gosden, 1994) e humanos (Roy e Kole, 1998), induz a transição de folículos suínos do estágio primário para secundário (Morbeck *et al.*, 1993), reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* e promove a ativação de folículos primordiais ovinos e manutenção da viabilidade por até 6 dias de cultivo (Andrade *et al.*, 2005). Quando testado em diferentes concentrações e em diferentes espécies, o EGF (10 ng/mL) adicionado ao meio de cultivo de folículos pré-antrais suínos, inibiu a apoptose das células da granulosa e levou a um aumento da formação de antro (Mao *et al.*, 2004). Já quando testado para caprinos, o EGF (50 ng/mL) mostrou um efeito estimulatório na viabilidade oocitária (Zhou e Zhang, 2005) e numa concentração mais elevada (100 ng/mL), um efeito benéfico no crescimento de oócitos de folículos primários (Silva *et al.*, 2004a). Outros fatores pertencentes à família EGF também agem sobre o desenvolvimento folicular, como: TGF- $\alpha$ , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina e epiregulina. O TGF- $\alpha$ , cuja a expressão já foi demonstrada nas células foliculares em todos os estádios (Reeka *et al.*, 1998), promove a proliferação da células da granulosa e da teca em bovinos (Skinner e Coffey, 1988) e modula a expressão de receptores para o FSH (Findlay e Drumond, 1999). O HB-EGF já foi demonstrado em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais e é considerado um fator mitogênico destas células (Pan *et al.*, 2004). A anfiregulina, betacelulina e epiregulina já foram demonstradas em células da granulosa de folículos em estágio terminal estimulando a expansão das células do cúmulus e a maturação oocitária (Park *et al.*, 2004).

### **Proteína morfogenética do osso – 15 (BMP-15)**

A BMP-15, também conhecida como fator de crescimento de diferenciação-9B (GDF-9B) é um dos membros da superfamília do TGF $\beta$ . Já foram identificados três tipos de receptores BMPs: receptores BMP tipo IA, tipo IB e II. Em algumas espécies já estudadas, como roedores, ovinos e em humanos, o BMP-15 mostrou estar expresso principalmente no oócito de folículos primários avançados (Findlay *et al.*, 2002). Já para a espécie caprina, a proteína BMP-15 foi encontrada nos oócitos de todos os tipos de folículos e células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais, mas não em folículos primordiais. Os RNAs para BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II foram detectados nos folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e células da granulosa de folículos antrais (Silva *et al.*, 2004b).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que ele promove a proliferação das células da granulosa e estimula o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores, ou seja, é um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (Fortune, 2003, Otsuka *et al.*, 2000, Nilsson e Skinner, 2002). Em células da granulosa de ratas, foi mostrado que o BMP-15 recombinante estimulou a proliferação independente do FSH, mas diminuiu os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona sem afetar a produção de estradiol (Otsuka *et al.*, 2000). O BMP-15 é capaz de inibir a expressão do receptor de FSH (Otsuka *et al.*, 2001) e estimular a expressão do Kit ligand (KL) nas células da granulosa de ratas (Otsuka e Shimasaki, 2002), além de estimular a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do cumulus de camundongas (Yoshino *et al.*, 2006). O BMP-15 tem um papel essencial nos estádios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário) promovendo proliferação das células da granulosa (Dong *et al.*, 1996).

Outras BMPs também exercem atividades sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos. Lee *et al.*, (2001) revelaram que a BMP-7 exerce influência sobre o desenvolvimento folicular inicial. Já em outros estudos, a BMP-4 promoveu a transição de folículos primordiais para primário e mostrou ser essencial para a sobrevivência do oócito. A BMP-4 é produzida pelas células da teca em desenvolvimento e atuam sobre as células da granulosa promovendo também a manutenção da integridade do oócito (Nilsson e Skinner, 2003).



### **Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF)**

O FGF também exerce influência sobre o desenvolvimento dos folículos ovarianos, sendo o FGF-2 (FGF básico) o fator investigado de forma mais extensiva. Em ovários bovinos, o FGF-2 foi localizado nos oócitos de folículos primordiais e primários e em células da granulosa e da teca de folículos pré-antrais em crescimento e antrais (Van Wezel *et al.*, 1995). Estudos mostraram que os receptores para FGF-2 estão principalmente localizados na camada das células da granulosa (Wandji *et al.*, 1992). O FGF-2 é importante na regulação de várias funções ovarianas, tais como: mitose (Roberts e Ellis, 1999), esteroidogênese (Vernon & Spicer, 1994), diferenciação (Anderson e Lee, 1993) e apoptose (Tilly *et al.*, 1992) das células da granulosa. Em gatas, a adição de 10 ng/mL de FGF-2 ao meio de cultivo aumentou a proliferação das células da granulosa de pequenos folículos pré-antrais (40 – 90  $\mu$ m) (Jewgenow, 1996). O FGF-2 também se mostrou eficiente na ativação e crescimento de folículos primordiais e primários de ratas (Nilsson *et al.*, 2001). Recentemente, estes mesmos autores mostraram que o FGF-2 e o KL são necessários para promover a ativação de folículos primordiais de ratas (Nilsson *et al.*, 2004). Nuttinck *et al.* (1996) relataram que, em 48 h de cultivo, o FGF-2 (10, 50 ou 100 ng/mL) aumenta a multiplicação das células da granulosa em pequenos folículos pré-antrais bovinos na ausência de FSH, atenuando a degeneração oocitária causada por esse hormônio. Em contraste, após 6 dias de cultivo *in vitro*, o FSH (100 ng/mL) e FGF-2 (50 ng/mL) apresentaram efeitos similares, ambos aumentando o diâmetro folicular e a multiplicação das células da granulosa bovinas (Wandji *et al.*, 1996). Já em caprinos, Mattos *et al.* (2006) mostraram que a utilização de 50 ng/mL durante 5 dias de cultivo promoveu o aumento do diâmetro oocitário e folicular.

Outro membro desta família potencialmente interessante é o FGF-8. Em ovários de camundongas, a expressão gênica deste fator mostrou-se restrita ao oócito (Valve *et al.*, 1997), sugerindo a sua participação na sinalização às células foliculares a partir do oócito. Recentemente, a expressão gênica do FGF-8 e receptores tipo FGFR-3c e 4 foi detectada em *pools* de folículos primordiais, primários e secundários obtidos a partir de ovários fetais de bovinos (Buratini *et al.*, 2005).

### **Fator de Crescimento Keratinócito (KGF)**

O KGF, considerado também um fator de crescimento fibroblástico (FGF-7), é uma proteína de 28 kDa produzida pelas células mesenquimais que estimula as mitoses das células

epiteliais (Finch *et al.*, 1989) que atuam através de seus receptores do tipo FGFR-2. Estudos prévios têm documentado que o KGF é produzido pelas células da teca de folículos antrais e influencia o crescimento das células da granulosa (Parrot e Skinner, 1998). Outros trabalhos demonstraram que este fator estimula a transição de folículos de folículos primordiais para primário, pois quando os ovários de ratas de 4 dias de idade foram cultivados na presença de 50 ng/mL houve um aumento na transição dos folículos primordiais para estágio subsequente (Skinner, 2005).

### **Neurotrofinas**

Existem fortes evidências de que neurotrofinas como fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e neurotrofinas 3 e 4 exercem funções nos estádios iniciais do desenvolvimento folicular. Os RNAsm que codificam esses fatores e seus receptores (p75 NGFR, trkA e trkB) estão presentes durante a formação e crescimento de folículos pré-antrais (Ojeda *et al.*, 2000). Uma deficiência de neurotrofinas 3 e 4 e BDNF promoveu redução significativa do número de folículos pré-antrais (Ojeda *et al.*, 1999). Entre as neurotrofinas, o Peptídeo Intestinal Vaso Ativo (VIP), abordado a seguir, é também um iniciador potencial do crescimento folicular.

O VIP, um neuropeptídeo encontrado primeiramente no duodeno de suínos (Hulshof *et al.*, 1994), contém 28 aminoácidos e é membro da mesma família à qual também pertencem a secretina, o glucagon, a gastrina e o Polipeptídeo Ativador da Adenilato-ciclase Pituitária (PACAP) (Pedro, 2003). O VIP age em suas células alvo através de três tipos diferentes de receptor: PAC<sub>1</sub>-R, VPAC<sub>1</sub>-R e VPAC<sub>2</sub>-R) e tem sido encontrado em vários órgãos e tecidos periféricos como o pulmão, testículos, adrenais e ovário (Arimura, 1992). Além disso, o VIP já foi identificado em fibras nervosas de folículos ovarianos de roedores (Ahmed *et al.*, 1986), bovinos (Hulshof, 1994) e aves (Johnson *et al.*, 1994). Estudos têm demonstrado que o VIP está envolvido na regulação da esteroidogênese (Zhong e Kasson, 1994), promove o acúmulo de AMPc (Heindel *et al.*, 1996), estimula a produção do ativador do plasminogênio (Apa *et al.*, 2002) e a maturação oocitária (Apa *et al.*, 1997) e promove a sobrevivência das células da granulosa por inibir a apoptose (Lee *et al.*, 1999).

### **Ativina**

A ativina é composta de duas sub-unidades de inibina- $\beta$ , a  $\beta_A$  e/ou  $\beta_B$ , que combinam-

se para formar a ativina A, B ou AB (Fortune, 2003). Em ovários de ratas (Zhao *et al.*, 2001) e bovinos (Hulshof *et al.*, 1997), a ativina A e seus receptores tipo II (ActRII) foram demonstrados tanto no oócito como nas células da granulosa de folículos primordiais. Em ovários de humanos, a ativina A foi localizada imunohistoquimicamente nas camadas das células da granulosa de folículos primários e secundários, bem como nas células da granulosa e do cópulo de folículos terciários (Rabinovici *et al.*, 1992) e as três sub-unidades de inibina foram detectadas em folículos primários e secundários de macacas Rhesus (Rabinovici *et al.*, 1992). Em ovários ovinos, as sub-unidades  $\beta_A$  e  $\beta_B$  foram localizadas nas células da granulosa e no oócito de folículos pré-antrais. Trabalhos de Silva *et al.*, (2006) mostraram que a ativina-A é capaz de promover a manutenção da viabilidade folicular e estimular o crescimento de folículos inclusos em tecido ovariano de caprinos bem como de folículos primários isolados.

Outras pesquisas demonstraram que a ativina estimulou o crescimento de folículos pré-antrais de bovinos (Hulshof *et al.*, 1997) e de camundongos quando associado ao FSH (Liu *et al.*, 1998). Além disso, Li *et al.* (1995) revelaram que esta substância aumentou o número de células da granulosa demonstrado pela incorporação de timidina [ $^3\text{H}$ ] em folículos pré-antrais de ratas de 14 dias de idade.

### **Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)**

O VEGF é um dos fatores responsáveis pela angiogênese folicular, pois ele atua estimulando a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (Redmer e Reynolds, 1996). Em folículos ovarianos, o VEGF é produzido pelas células da teca e células da granulosa (Yamamoto *et al.*, 1997), e seus receptores, Flk-1 e Flk-1 /KDR, também são expressos nesses mesmos locais. Tem-se verificado que gonadotrofinas estimulam a produção de VEGF pelas células da granulosa de folículos ovarianos de ratas (Koos *et al.*, 1995). Além de promover angiogênese, alguns estudos verificaram que o VEGF tem um efeito mitogênico direto nas células da granulosa e age no crescimento folicular de ovários de ratas (Otani *et al.*, 1999). Pesquisas mostraram que a administração de 500 ng de VEGF, diretamente em ovários de ratas, aumentou significativamente, após 48 horas, a proporção de folículos primários e secundários pequenos (Danforth *et al.*, 2001). Verificou-se também que a injeção direta de 2  $\mu\text{g/mL}$  em ovários de camundongas aumenta o crescimento vascular, promove o desenvolvimento folicular e diminui a apoptose no folículo (Quintana *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que o cultivo *in vitro*, durante 24 horas em 50ng/ mL antes da criopreservação somente de células da granulosa de ratas, reduz os danos destas células, inibindo a apoptose

(So-Young *et al.*, 2006). Observou-se que, durante a transição de folículos primordiais para folículos primários em ovários de ratas, houve alteração na expressão de genes que codificam RNA-m para VEGF, utilizando a técnica de microarray, e aumento da expressão da própria proteína, confirmado pela técnica de PCR (Kezele *et al.*, 2005).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão de literatura evidenciou-se a participação de vários fatores protéicos que podem atuar isoladamente ou combinados e até mesmo modular o efeito de hormônios sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos. O crescimento folicular é regulado por uma complexa interação de fatores metabólicos extra-ovariano e sinalizações endógenas. A elucidação destes sistemas de controle consiste em um dos maiores desafios científicos para maior compreensão dos processos envolvidos na foliculogênese ovariana e, conseqüentemente, para o fornecimento de oócitos viáveis e maduros que poderão ser destinados a diferentes biotécnicas da reprodução animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaltonen, J, Laitinen, MP, Vuojolainen, K, Jaatinen, R, Horelli-Kuitunen, N. *et al.* Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. C. Endocr. Met.*, 84:2744-2750, 1999.
- Ahmed, CE, Dees, WL, Ojeda, SR. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*, 118:1682–1689, 1986.
- Amorim, CA, Rodrigues, APR., Lucci, CM, Figueiredo, JR, Gonçalves, PBD. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *J. Small Rum. Res.*, 37:269-277, 2000.
- Andrade, ER, Seneda, MM, Alfieri, AA, Oliveira, JA, Bracarense, APFRL, Figueiredo, JR, Toniolli, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, 64:1104-1113, 2005.
- Apa, R, Lanzone, A, Mastrandrea, M, Miceli, F, Macchione, E, Fulghesu, AM, Caruso, A, Canipari, R. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and denuded rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 57:1074–1079, 1997.

- Apa, R, Lanzone, A, Miceli, F, Vaccari, S, Macchione, E, Stefanini, M, Canipari, R Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cell. *Biol. Reprod.*, 66:830-835, 2002.
- Arimura, A. Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Trends Endocrinol. Metab.*, 3:288–294, 1992.
- Barnett, KR., Schilling, CCR, Greenfeld, CR, Tomic, D, Flaws, JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum. Reprod.*, 10:1-19, 2006.
- Bennett, RA, Osathanondh, R, Yeh, J. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 8: 3073–3076, 1996.
- Betteridge, KJ, Smith, C, Stubbings, RB, Xu, KP, King, WA. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 38:87-98, 1989.
- Bodensteiner, KJ, Clay, CM, Moeller, CL, Sawyer, HR. Molecular cloning of the ovine GDF-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.*, 60:381-386, 1999.
- Boland, NI, Gosden, RG. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.* 101:369–374, 1994.
- Braw-Tal, R, Roth, Z. Gene expression for LH receptor, 17  $\alpha$ -hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*, 129:453-461, 2005.
- Bukovski, A., Caudle, MR, Svetlikova, M, Upadhyaya, NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 4:2-20, 2004.
- Buratini, JJ, Glapinsk, VF, Giometti, IC, Teixeira, AB, Costa, IB. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptor, fibroblast growth factor receptor (FGFR) -3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 70:255-261, 2005.
- Butcher, L, Illmann, SL. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. *Reprod. Fert. Develop.*, 8:535-9, 1996.
- Carpenter, G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biol*, 146:697–702, 1999.
- Carroll, J, Whittingham, DG, Wood, MJ, Telfer, E, Gosden, RG. Extra ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fert.*, 90:321-327, 1990.

- Cecconi, S, Barboni, B, Coccia, M, Mattioli, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod.*, 60:594-601, 1999.
- Chang, H, Brown, CW, Matzuk, MM. Genetic Analysis of the Mammalian TGF- $\beta$  Superfamily. *Endocr. Rev.*, 23:787 – 823, 2002.
- Cortvrindt, R. Smitz, J. Van Steirteghem, AC. Assesment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Human Reprod.*, 12:59-768, 1997.
- Cortvrindt, RG, Hu, Y, Liu, J, Smitz, JE. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. *Fert. Ster.*, 70:1114-1125, 1998.
- Danilovich, NA, Bartke, A, Winters, TA. Ovarian Follicle Apoptosis in Bovine Growth Hormone Transgenic Mice. *Biol. Reprod.*, 62:103, 2000.
- Demeestere, I, Gervy, C, Centner, J, Devreker, F, Englert, Y, Delbaere, A. Effect of Insulin-Like Growth Factor-I During Preantral Follicular Culture on Steroidogenesis, *In vitro* Oocyte Maturation, and Embryo Development in Mice. *Biol. Reprod.*, 70:1664 – 1669, 2004.
- Demeestere, I, Centner, J, Gervy, Y, Delbaere, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, 130:147-156, 2005.
- Doneda. L, Klinger, FG, Larizza, L, De Felici, M. KL/KIT co-expression in mouse fetal oocytes. *Int. J. Dev. Biol.*, 46:1015-1021, 2002.
- Dong, J. Albertini, DF, Nishimori, K, Kumar, TR, Lu, N, Matzuk, MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383:531-535, 1996.
- Eckery, DC, Moeller, CL, Nett, TM, Sawyer, HR. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin- like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 57:507, 1997.
- Eppig, JJ, O'brien, MJ. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biol. Reprod.*, 54:197-207, 1996.
- Erickson, GF. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Sem. Reprod. Endocri.*, 4:233-254, 1986.
- Figueiredo JR, Gonçalves PBD, RodrigueS APR, De Bem AR. *In vitro* development of isolated bovine preantral follicles. *Arq. Fac. UFRGS*, 25:93-107, 1997.
- Finch, PW, Rubin, JS, Miki, T, Ron, D, Aarosan, SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, 245, 752-755, 1989.
- Findlay, JK, Drummond, AE, Dyson, ML, Baillie, AJ, Robertson, DM, Ethier, JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta

- superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191:35-43, 2002.
- Fortune, JE, Kito, S, Wandji, SA, Srsen, V. Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. *Theriogenology*, 49:441-449, 1998.
- Fortune, JE, Cushman, RA, Wahl, CM, Kito, S. The Primordial to Primary Follicle Transition. *Mol. Cell. Endoc.*, 163:53-60, 2000.
- Fortune, JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 78: 135-163, 2003.
- Garnett, K, Wang, J, Roy, SK. Spatiotemporal expression of EGF receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol. Reprod.*, 67: 1593–1604, 2002.
- Gong, JG., Bramley, T, Webb, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biol. Reprod.*, 45:941-949, 1991.
- Gong, JG, Baxter, G, Bramley, TA, Webb, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J. Reprod. Fertil.*, 110:91, 1997.
- Gordon, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: *Raven Press*, p. 4349, 1994.
- Gougeon, A, Busso, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cel. Endoc.*, 163:33-41, 2000.
- Gutierrez, CG, Ralph, JH, Telfer, EE, Wilmut, I, Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 62:1322-1328, 2000.
- Hayashi, M, Mcgee, EA, Min, G, Klein, C, Rose, UM, Van Duin, M, Hsueh, AJW. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early follicles. *Endocrinology*, 140:1236-1244, 1999.
- Heindel, JJ, Sneed, J, Powell, CJ, Davis, B. Novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, regulates the function of rat granulosa cells *in vitro*. *Biol. Reprod.* 54:523–530, 1996.
- Hirao, Y, Nagai, T, Kubo, M, Miyano, T, Kato, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 100:333-339, 1994.
- Hirshfield, AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124:43-101, 1991.

- Hreissan, JG, Scott, JE, Rasmussen, C, Swahn, ML, Hsueh, ALW, Hovatta, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87:316-321, 2002.
- Huamin, Z, Yong, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, 54:641-650, 2000.
- Herrington, J, Carter-Su, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Tren. Endocri. Metabolism.*, 12:252-257, 2001.
- Hsu, SY, Hsueh, AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol. Rev.*, 80:593-614, 2000.
- Hulshof, SCJ, Figueiredo, JR, Bekers, JF, Bevers, MM, Van den hurk, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary Quartely*, 2(16):78-80, 1994.
- Hulshof, SCJ, Figueiredo, JR, Bekers, JF, Bevers, MM, Van der donk, JA. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 44:217-226, 1995.
- Hulshof, SCJ, Figueiredo, JR, Bekers, JF, Bevers, MM, Vanderstichele, H, Van Den Hurk, R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A *in vitro*. *Theriogenology*, 48:133-142, 1997.
- Hutchinson, LA, Findlay, JK, Herington, AC. Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Mol. Cell Endoc.*, 55(1):61-9, 1988.
- Jewgenow, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*, 45:889-895, 1996.
- Jewgenow, K, Stolte, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reprod. Domest. Anim.*, 44:183-93, 1996.
- Jin, X, Han, CS, Yu, FQ, Wei, P, Hu, ZY, Liu, YX. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol. Reprod. Dev.*, 70:82-90, 2005.
- Jones, JI, Clemmons, DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endoc. Rev.*, 16:3, 1995.
- Johnson, AL, Li, Z, Gibney, JA, Malamed, S. Vasoactive intestinal peptide-induced expression of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage and 17-hydroxylase enzyme activity in hen granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 51:327–333, 1994.



- Johnson, AL. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 78:185–201, 2003.
- Johnson, J, Bagley, J, Skaznik-Wikiel, M, Lee, HJ, Adams, GB, Niikura, Y, Tschudy, KS, Tilly, JC, Cortes, ML, Forkert, R. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 122:303-315, 2004
- Kidder, GM, Mhawi, AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123:613, 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. *Biol. Reprod.*, 65(1):66-71, 2001.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(1):36-41, 2000.
- Kölle, S, Sinowatz, F, Boie, G, Lincoln, D. Developmental Changes in the Expression of the Growth Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid and Protein in the Bovine Ovary. *Biol. Reprod.*, 59:836, 1998.
- Langhout, DJ, Spicer, LJ, Geisert, RD. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J. Anim. Sci.*, 69:3321-3334, 1991.
- Lee, J, Park, HJ, Choi, HS, Kwon, HB, Arimura, A, LEE, BJ, CHOI, WS, CHUN, SY. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology*, 140:818–826, 1999.
- Lee, WS, Otsuka, F, Moore, RK, Shimasaki, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* 65:994-999, 2001.
- Levi-Setti, PE, Cavagana, M, Baggiani, A, Zanonni, E, Colombo, GV, Liprandi, V. FSH and LH together in ovarian stimulation. *J. of Obst. Gynecol. Reprod. Biol.*, 115:34-39, 2004.
- Li, R, Phillips, DM, Mather, JP. Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. *Endocrinology*, 136:849-856, 1995.
- Liu, X, Andoh, K, Yokota, H, Kobayashi, J, Abe, Y, Yamada, K, Mizunuma, H, Ibuki, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, 139:2342-2347, 1998.

- 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*, 139:2480-2485, 1999.
- Louhio, H, Hovatta, O, Sjöberg, J, Tuuri, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol. Hum. Reprod.*, 6:694-698, 2000.
- 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.*, 56:39-49, 1999.
- Mao, J, Smith, MF, Rucker, EB, Wu, GM, Mccauley, TC, Cantley, TC, Prather, RS, Didion, BA, Day, BN. Effect of EGF and IGF-1 on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 82:1967-1975, 2004.
- Markström, E, Svensson, EC, SHAO, R, SVANBERG, B, BILLIG, H. *Reproduction*, 123:23-30, 2002.
- Matos, MHT, Van Den Hurk, R., Lima-Verde, IB, Luque, MCA, Santos, KDB, Martins, FS, Bão, SN, Lucci, CM, Figueiredo, JR. Efeito do fator de crescimento fibroblástico-2 nsobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34(1): 265, 2006.
- Mcgee, EA, Hsueh, AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.*, 21:200-214, 2000.
- Monget, P, Monniaux, D, Durand, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, 125:2486-2493, 1989.
- Monget, P, Fabre, S, Mulsant, P, Lecerf, F, Elsen, JM, Mazerbourg, S, Pisselet, C, Monniaux, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 23(1-2):139-54, 2002.
- Moore, KL, Persaud, TV. Início do desenvolvimento humano. In Moore, KL, Persaud, TVN. *Emb.. Clín.* Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> ed., 13-38, 1994.
- Morbeck, DE, Flowers, WL, Britt, JH. Response of Porcine Granulosa Cells Isolated from Primary and Secondary Follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and EGF *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 99:577-584, 1993.
- Morita, Y, Tilly, JL. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. *Develop. Biol.*, 213:1-17, 1999.

- Nilsson, E, Parrot, JA, Skinner, MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 175:123-130, 2001.
- Nilsson, EE, Skinner, MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.*, 67:1018-1024, 2002.
- Nilsson, EE, Skinner, MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol. Reprod.*, 69:1265-1272, 2003.
- Nilsson, EE, Skinner, MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endoc.*, 214:19-25, 2004.
- Nuttinck, F, Collette, L, Massip, A, DESSY, F. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 45:1235-1245, 1996.
- Ojeda, SR, Disson, GA, Romero, C. Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. *Frontiers in Endocrinology. Ovarian Function Research. Present and Future*, 21:171-179, 1999.
- Ojeda, SR, Romero, C, Tapia, V, Disson, GA. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol. Cell Endocrinol.*, 163(1-2):67-71, 2000.
- O'shaughnessy, PJ, Mclelland, D, McBride, MW. Regulation of Luteinizing Hormone Receptor and Follicle-Stimulating Hormone-Receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovarian. *Biology of Reproduction*, 57:602-608, 1997.
- Otsuka, F, Shimasaki, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:8060-8065, 2002.
- Otsuka, F, Yamamoto, S, ERICKSON, GF, SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J. Biol. Chem.*, 276:11387-11392, 2001.
- Otsuka, F, Yao, Z, Lee, T-H, Yamamoto, S, Erickson, GF, Shimasaki, S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.*, 275:39523-39528, 2000.
- Pedro, KG. Neuropeptides in the skin. *An. Bras. Dermatol.* 4:483-498, 2003.

- Parrot, JA, Skinner, MK. 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, 2240-2245, 1998.
- Parrot, JA, Skinner, MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 140:262-71, 1999.
- Rabinovici, J, Spencer, SJ, Doldi, N, Goldsmith, PC, Schwall, R, Jaffe, RB, Avtivin-A as an intraovarian modulator: actions, localization, and regulation of the intact dimmer in human ovarian cells. *J. Clin. Invest.* 89: 1528-1536.
- Rankin, TL, O'Brien, M, Lee, E, Wigglesworth, K, Eppig, J, Dean, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, 128:1119-1126, 2001.
- Riese, DJ, Stern, DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioassays*, 2:41-48, 1998.
- Roberts, RD, Ellis, RCL. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 61: 1387-92, 1999.
- Roy, SK. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biology of Reproduction.*, 48:552-557, 1993.
- Roy, SK, Greenwald, GS. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J. Reprod. Fert.*, 87:103-114, 1989.
- Roy, SK, Greenwald, GS. Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology*, 126:1309-1317, 1990.
- Roy, SK, Treacy, BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fert. Steril.*, 59:783-790, 1993.
- Roy, SK, Kole, AR. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: *in vitro* effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF beta on receptor expression in human preantral follicles. *Mol. Hum. Reprod.*, 4:207-214, 1998.
- Rüsse, I. Oogenesis in **cattle** and sheep. *Bibl. Anat.*, 24:77-92, 1983.
- Sadeu, JC, Cortvrindt, R, Ron-El, R, Kastertein, E, Smitz, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. *Fert. Ster.*, 85(1):1130-1141, 2006.
- Saumande, J. La folliculogénèse chez les ruminants, *Rec. Vét.*, 167:205-218, 1991.

- Shaw, JM, Oranratnachai, A, Trounson, AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59–72, 2000.
- Singh, B, Rutledge, JM, Armstrong, DT. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:391–399, 1995a.
- Singh, B, Kennedy, TG, Tekpetey, FR, Armstrong, DT. Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. *Mol. Cell Endocrinology*, 113:137–143, 1995b.
- Silva, JRV, Van Den Hurk, R, Matos, MHT, Santos, RR, Pessoa, C, MORAES, MO, Figueiredo, JR. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, 61:1691–1704, 2004a.
- Silva, JRV, Van Den 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 the Ovaries of Goats. *Mol. Reprod. Dev.*, 70:11-19, 2004b.
- Silva, JRV. Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. *Phd Thesis*. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 142, 2005.
- Silva, JRV, Van Den Hurk, R, Figueiredo, JR. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*, 14:107-117, 2006.
- 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. Endocrin.* 189: 113-125, 2006.
- Skinner, MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update*, 11: 461-471, 2005.
- Telfer, EE. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Their.*, 45:101-110, 1996.
- Tekpetey, FR, Singh, B, Barbe, G, Armstrong, DT. Localisation of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor-alpha stimulation of luteal cell steroidogenesis *in vitro*. *Mol. Cell Endocr.*, 110:95–102, 1995.
- Tilly, JL, Billig, H, Kowalski, KI, Hsueh, AJ. 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. Endocrin.*, 6:1942-50, 1992.
- Tilly, JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.*, 1:162-172, 1996.

- Tsafiri, A, Braw, RH. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, 6:226-265, 1984.
- Valve, E, Penttila, T, Paranko, J, Härkönen, P. FGF-8 is expressed during specific phases of reodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, 232:173-177, 1997.
- Van Den Hurk, R, Zhao, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-1751, 2005.
- Van Wezel, IL, Umapathysivam, K, Tilley, WD, Rodgers, RJ. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growyuh factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrin.*, 115:133-140, 1995.
- Vernon, RK, Spicer, LJ. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced streroidogenesis by bovine granulosa cells. *J. Anim. Sci.*, 72:2696-702, 1994.
- Wandji, S, Fortier, MA, Sirard, M. Differential response to gonodotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol. Reprod.*, 46:1034-1041, 1992.
- Wandji, SA, Eppig, JJ, Fortune, JE. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. *Theriogenology*, 45:817-832, 1996.
- Wang, J, Roy, SK. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, 70:577-585, 2004.
- Wassarman, PM. The mammalian ovum. In: Knobil, E. & Neill, J. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 69-101, 1988.
- Wu, J, Nayudu, PL, Kiesel, PS, Michelmann, HW. Luteinizing Hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 63:320-327, 2000.
- Wu, J, Benjamin, RE, Carrell, DT. *IN VITRO* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol. Reprod.*, 64:375-381, 2001.
- Yoshino, O, McMahan, HE, Shimasaki, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103:10678-10683, 2006.
- ZAMA, AM, HUDSON, FP, BEDELL, MA. Analysis of Hypomorphic KitlS1 Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells. *Biol. Reprod.*, 73-639-647, 2005.

- Zhao, J, Taverne, MAM, Van Der Weijden, BC, Bevers, MM, Van den hurk, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol. Reprod.*, 65:967-977, 2001.
- Zhong, Y, Kasson, BG. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3, 5-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 135:207–213, 1994.
- Zhou, J, Adesanya, OO, Vatzias, G. Hammond, JM, Bondy, CM. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology*, 137:4893, 1996.
- Zhou, H, Zhang, Y. Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine preantral follicle oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 90(3-4):265-272, 2005.