

Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala¹

Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and in vitro embryo production in large scale

José Ricardo de *Figueiredo*, Juliana Jales de *Hollanda Celestino*, Ana Paula Ribeiro *Rodrigues*, José Roberto Viana *Silva*

UECE-FAVET-PPGCV-LAMOFOPA, Fortaleza, CE, Brasil

Correspondência: jrfig@pesquisador.cnpq.br

Resumo

Em animais domésticos, a escassez de informações sobre os fatores que regulam as diferentes etapas da foliculogênese, bem como das condições necessárias para o crescimento e maturação oocitária *in vitro* são as principais causas que limitam a produção *in vitro* de embriões, usando folículos pré-antrais como doadores de oócitos. Esta revisão destaca a importância da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) para entender a foliculogênese ovariana e aumentar a produção de embriões *in vitro*.

Palavras chave: folículo, oócito, embrião, cultivo, ovário

Abstract

In domestic animal, the limited knowledge on the regulation of different steps of folliculogenesis as well as on the required conditions for oocytes to undergo proper growth and maturation in vitro are major causes of the failure in producing embryos in vitro, using preantral follicles as oocyte donors. This review highlights the importance of the biotechnique of manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles (MOEPF) to understand ovarian folliculogenesis and to increase embryo production in vitro.

Keywords: follicle, oocyte, embryo, culture, ovary

Introdução

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Neste sentido, especialmente no tocante a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial, fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões vêm sendo utilizadas com sucesso. Outras biotécnicas estão em fase de desenvolvimento e são objetos de intensas pesquisas, atualmente. Nesse grupo, pode-se incluir a clonagem e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

Para a maximização do potencial reprodutivo, especialmente de fêmeas domésticas, é importante estudar a foliculogênese a fim de se compreender os mecanismos e fatores envolvidos nesse evento. Desta forma, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), que visa a recuperação de um grande número de oócitos inclusos nos folículos pré-antrais (FOPA) e cultivo *in vitro* até sua completa maturação, é uma ferramenta importante para estudar a foliculogênese, testando e avaliando o efeito de diferentes substâncias (gonadotrofinas, fatores intra-ovarianos) no cultivo *in vitro*. Além disso, tal biotécnica é uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em FOPA em diversos estádios de desenvolvimento, para as biotécnicas de fecundação *in vitro* e clonagem (Telfer, 1996), contribuindo assim para a produção *in vitro* de embriões em larga escala.

Visando facilitar a compreensão da importância desta biotécnica para a foliculogênese e produção de embriões *in vitro*, bem como, demonstrar como ela se inserirá no futuro, no contexto da reprodução animal, este artigo fará uma breve abordagem sobre os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), enfatizando a classificação e destino no interior dos ovários. Em seguida será discutida a importância do estudo da população de FOPA isolados *in vitro*, as principais técnicas de isolamento, a etapa de conservação (resfriamento ou congelamento) de FOPA, sistemas de cultivo *in vitro* de FOPA, importância da MOIFOPA para a compreensão da foliculogênese e para produção de embriões em larga escala. Finalmente, serão discutidas as perspectivas de utilização da biotécnica de MOIFOPA na reprodução de animais domésticos, silvestres e em perigo de extinção.

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

Folículos ovarianos: definição, tipos e destino

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: *a*) folículos pré-antrais ou não cavitários e *b*) folículos antrais ou cavitários. Os FOPA representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos. Na categoria de folículos pré-antrais são incluídos os folículos primordiais, intermediários, primários e secundários.

O ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Entretanto, a grande maioria destes folículos (99,9%) não chega até à ovulação, mas ao contrário, é eliminada por meio de um processo conhecido por atresia folicular.

Manipulação de Oócitos Inclusos em FOPA – MOIFOPA

Conceito

A MOIFOPA é uma biotécnica que consiste 1) no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, 2) na conservação visando a estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período e 3) no cultivo folicular que tem como finalidade promover o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em FOPA. A seguir será descrito a importância da MOIFOPA.

Importância

Apesar do desenvolvimento de folículos antrais, notadamente em bovinos, ter sido amplamente descrito, informações concernentes à fisiologia dos folículos pré-antrais são escassas. É sabido de estudos histológicos, que os folículos primordiais são ativados e transformam-se, sucessivamente, em folículos intermediários, primários e secundários. Entretanto, não são conhecidos com exatidão os fatores que promovem ou inibem a ativação dos folículos primordiais, bem como aqueles implicados no controle do crescimento de folículos primários e secundários. Em resumo, comparada à fase antral, a fase pré-antral compreende um período obscuro e pouco conhecido da foliculogênese sendo, portanto, um vasto campo para investigações científicas.

Tendo em vista que as biotécnicas ligadas à reprodução têm como finalidade geral o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos, será considerada agora a eficácia do ovário como uma “máquina” produtora e liberadora de óvulos. O ovário mamífero contém milhares de oócitos, inclusos em sua maioria (cerca de 90%) nos folículos pré-antrais. Apesar deste enorme capital oocitário, uma ínfima proporção destes oócitos (cerca de 0,1%) será ovulada e, conseqüentemente, poderá ter alguma possibilidade de ser fecundado. Conforme o exposto acima, considerando-se o fato de que a quase totalidade dos oócitos será eliminada pelo processo de atresia, caso eles permaneçam no interior dos ovários, a biotécnica de MOIFOPA se fundamenta em dois objetivos principais, a saber: 1) resgatar ou isolar os FOPA a partir dos ovários antes que eles se tornem atrésicos, 2) cultivar os FOPA e, conseqüentemente, os oócitos imaturos neles inclusos, até o estágio de maturação, prevenindo-os da atresia e 3) proporcionar a produção de embriões em larga escala.

A biotécnica de MOIFOPA é de grande importância tanto para a pesquisa fundamental ou básica, quanto para a reprodução animal. No tocante à pesquisa fundamental, esta biotécnica poderá contribuir para elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese na fase pré-antral. Nesse caso, os FOPA isolados do ambiente ovariano, bem como da influência endócrina, nutricional e sanitária comum no organismo animal, poderão ser cultivados *in vitro* em presença de diferentes substâncias conhecidas (matriz extracelular, hormônios, fatores de crescimento, carboidratos, aminoácidos, etc.), cujo efeito individual ou associado poderá ser avaliado e controlado em diversos experimentos. Os resultados oriundos desses experimentos permitirão a elucidação dos mecanismos envolvidos tanto na ativação dos folículos primordiais, quanto no crescimento de folículos primários e secundários.

Referente à reprodução animal, no futuro, o isolamento de milhares de FOPA a partir de um único ovário e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação, poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em via de extinção. Este objetivo será alcançado através do fornecimento de um grande número de oócitos oriundos de um mesmo animal, que seriam crescidos e maturados *in vitro*, e utilizados posteriormente nas biotécnicas de FIV e clonagem. O fornecimento de uma população homogênea de oócitos oriundos de um mesmo animal proporcionado pela biotécnica de MOIFOPA contribuirá também para a padronização de técnicas, como a clonagem, FIV e transgênese, uma vez que serão utilizados uma população de oócitos em um mesmo estágio de desenvolvimento e de mesma origem. Uma outra conseqüência imediata desta nova biotécnica é a congelamento de FOPA isolados ou *in situ* (no interior de tecido ovariano) a qual poderia ter uma importância capital na constituição de bancos de germoplasma animal que visaria a conservação de oócitos de animais de alto valor zootécnico e/ou em perigo de extinção *Isolamento de FOPA*.

No laboratório, a utilização de FOPA para criopreservação e/ou cultivo *in vitro* no âmbito das pesquisas fundamental e aplicada (futuro) é precedida do emprego de métodos eficazes que permitam o isolamento de um grande número de FOPA a partir dos ovários. Para o isolamento de FOPA podem ser utilizados métodos mecânicos e/ou enzimáticos. Na literatura, os primeiros registros de estudos de FOPA isolados, respectivamente, em animais de laboratório (Grob, 1964; camundongo) e domésticos (Figueiredo *et al.*, 2002; bovinos) ocorreram nas décadas de 60 e 90 utilizando-se procedimentos enzimáticos e mecânicos, respectivamente. O princípio dos métodos de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc.) utilizando-se para isto, instrumentos mecânicos associados ou não aos químicos ou enzimáticos. Nos procedimentos mecânicos, os equipamentos mais comumente utilizados são o *tissue chopper*, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes. Referente aos procedimentos enzimáticos, as enzimas proteolíticas mais utilizadas são a colagenase, tripsina e pronase, sendo a primeira empregada na maioria dos trabalhos.

Métodos enzimáticos de isolamento de folículos pré-antrais foram descritos não apenas em animais de laboratório (camundongo, rato, hamster, coelho), mas também em suínos, gatos, fetos bovinos, ovinos e humanos. Em contraste aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos têm sido mais comumente usados para o isolamento de folículos pré-antrais de ovários bovinos, caprinos, ovinos e felinos. Os resultados obtidos de diferentes trabalhos demonstram que independente do tipo de procedimento (mecânico ou enzimático) podem ser isolados milhares de folículos pré-antrais por ovário. Diante do exposto, conclui-se que, devido à grande eficiência dos métodos disponíveis, a obtenção de um grande número de oócitos inclusos em folículos pré-antrais isolados não constitui um empecilho para o desenvolvimento da biotécnica de MOIFOPA. Para maiores detalhes sobre isolamento ver Figueiredo *et al.*, 2002.

Conservação (resfriamento ou congelamento) de FOPA

Conforme observado, é possível recuperar milhares de FOPA a partir de um único ovário por meio de técnicas de isolamento folicular. No entanto, torna-se difícil a manutenção da qualidade folicular após remoção e transporte dos ovários, uma vez que geralmente os animais doadores de ovários se encontram distantes dos laboratórios de reprodução. Além disso, após isolados do ambiente ovariano, torna-se impossível a manipulação de um grande número destes folículos momentos após, ou mesmo, no mesmo dia em que são extraídos do ovário sem ter a sua viabilidade comprometida antes do cultivo *in vitro*. Por esta razão, torna-se fundamental o desenvolvimento de protocolos de conservação (resfriamento e/ou congelamento), nos quais os FOPA poderiam ser mantidos a temperaturas entre 4 e 20 °C (resfriamento) ou - 196 °C (congelamento), no interior do tecido ovariano.

Especificamente com relação à congelamento de tecido ovariano, ela pode oferecer benefícios significativos para a reprodução de mulheres e animais, bem como a produção de animais científica, genética e economicamente importantes, por meio da utilização do material genético que poderá ser preservado em bancos de germoplasma após a morte dos mesmos. A etapa de conservação pode ser essencial para o sucesso da biotécnica de MOIFOPA que tem como objetivo isolar e cultivar, até a sua maturação completa, um grande número de FOPA *in vitro*. Devido às dificuldades observadas no cultivo *in vitro* de FOPA isolados do tecido ovariano (Abir *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2006b) ou mesmo *in situ* (Santos *et al.*, 2006b), a congelamento de fragmentos ovarianos permitiria a sua conservação até que fossem desenvolvidos protocolos eficientes de cultivo *in vitro*. Neste sentido, o tecido ovariano de cabras (Rodrigues *et al.*, 2004a,b), ovelhas (Amorim *et al.*, 2003 a,b; Santos *et al.*, 2006a) e vacas (Lucci *et al.*, 2004) tem sido congelado na presença de diferentes agentes crioprotetores, os quais têm por finalidade proteger as células contra as crioinjúrias.

Sistemas de cultivo in vitro de FOPA

In vivo, vários componentes produzidos endócrina e localmente podem estimular a neovascularização ou inervação dos pequenos folículos, os quais proporcionam nutrientes, citocinas, hormônios e substâncias neuropeptidérgicas. Esses fatores parecem ser necessários para a sobrevivência dos folículos e início do crescimento folicular (van den Hurk e Zhao, 2005). Os fatores que regulam o crescimento de folículos pré-antrais de ruminantes ainda são pouco compreendidos. Estudos realizados *in vitro* têm demonstrado que o crescimento folicular é afetado por muitos fatores, os quais raramente atuam independentemente (Williams, 1990).

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 e 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). Entretanto, neste tipo de modelo, observa-se que a grande maioria dos folículos progride para o estágio de folículo primário, mantendo-se viável por até 20 dias (Wandji *et al.*, 1997), ao passo que poucos progridem para o estágio de folículo secundário.

Os folículos primários e secundários podem ser isolados e cultivados individualmente. Desta forma, métodos mecânicos têm sido desenvolvidos para isolar um grande número de folículos intactos de ovários de cabras (Lucci *et al.*, 1999), ovelhas (Cecconi *et al.*, 1999), vacas (Figueiredo *et al.*, 1993), ratas (Zhao, 2000) e camundongas (Lenie *et al.*, 2004). Uma vez isolados, os folículos podem ser cultivados na sua forma intacta, para o estudo dos efeitos *in vitro* de hormônios e fatores de crescimento nos folículos primários ou secundários (Silva, 2005). Os principais sistemas realizam o cultivo dos folículos diretamente sobre o suporte de plástico, sobre uma matriz de colágeno ou inclusos em gotas de colágeno (Demeestere *et al.*, 2005).

Importância da MOIFOPA para compreensão da foliculogênese

Nos últimos anos, a biotécnica de MOIFOPA tem contribuído de forma decisiva para a compreensão dos fatores que controlam a foliculogênese. Vários estudos com cultivo *in vitro* de FOPA demonstraram hormônios, fatores de crescimento e peptídeos que estão envolvidos no controle do desenvolvimento, dentre os quais podemos destacar: o hormônio folículo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2), kit ligand (KL), fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), ativina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP).

O hormônio gonadotrófico FSH é um crítico regulador da função ovariana, estando envolvido na estimulação da proliferação celular, síntese de esteróides e expressão de receptores para EGF e hormônio luteinizante (LH). Recentemente, Matos *et al.* (2007a) demonstraram que 50 ng/ml de FSH promove crescimento de folículos primordiais e garante a manutenção da viabilidade folicular. Durante cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70 μ 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 μ 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.

Com relação aos fatores de crescimento, o GDF-9 é um fator que estimula o crescimento de folículos primários, por meio da proliferação de células da granulosa e da teca, promovendo assim a transição folicular do estágio de primário para secundário (ratas: Nilson e Skinner, 2002, humanos: Hreinsson *et al.*, 2002). Wang e Roy (2004) demonstrou que o 10ng/mL de GDF-9 influencia a expressão de KL e estimula o crescimento de folículos primordiais, sendo que em altas doses (200 ng/mL) aumenta a proporção de folículos secundários de hamster. 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.

Outro fator importante é o IGF-1, pois quando adicionado ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, estimula o crescimento folicular em sinergia com o FSH (humanos: Louhio *et al.*, 2000, bovinos: Gutierrez *et al.*, 2000, ratas: Zhao *et al.*, 2001, camundongos: Liu *et al.*, 1998). Experimentos de Zhou e Zhang (2005) mostraram que o IGF-1 na concentração de 100 mg/L promove o crescimento e a viabilidade de oócitos inclusos em folículos pré-antrais caprinos. Em suínos, a utilização de 50 ng/mL de IGF-1 resulta em crescimento folicular, aumento da proliferação de células da granulosa e prevenção de apoptose em folículos pré-antrais cultivados por 4 dias na presença de soro. Em camundongos, o IGF-1, em diferentes concentrações (10, 50 e 100 ng/mL) aumenta a esteroidogênese de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por 12 dias (Demeestere *et al.*, 2004).

Já o KL, que também conhecido como fator stem cell, e o seu receptor c-kit, são importantes para a migração, proliferação e sobrevivência de células germinativas primordiais (Zama *et al.*, 2005). Além disso, durante o cultivo *in vitro*, o KL estimula a ativação de folículos primordiais (Parrott e Skinner, 1999), crescimento e sobrevivência do oócito (Jin *et al.*, 2005), proliferação das células da granulosa (Otsuka e Shimasaki, 2002), manutenção da competência meiótica (Ismail *et al.*, 1997), recrutamento de células da teca e regulação da esteroidogênese (Hutt *et al.*, 2006). Em caprinos, a proteína e RNAm para o KL foram expressos nas células da granulosa em todos os estádios de desenvolvimento folicular, bem como no corpo lúteo, superfície do epitélio ovariano e tecido medular (Silva *et al.*, 2006a). A utilização do KL no cultivo *in vitro* de ovários de ratas recém nascidas, por 5 ou 14 dias, aumenta a porcentagem de folículos em crescimento (Parrott e Skinner, 1999), sugerindo um papel do KL na ativação de folículos primordiais.

O EGF é um outro importante fator que regula a fisiologia ovariana (Jewgenow, 1996), incluindo

proliferação celular, diferenciação e esteroidogênese (Saha *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* mostraram que o EGF promove a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais (suínos: Morbeck *et al.*, 1993; roedores e humanos: Gospdarowicz e Bialecki, 1979), 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 em 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 o EGF (100 ng/mL), um efeito benéfico no crescimento de oócitos de folículos primários (Silva *et al.*, 2004b). Em folículos antrais, o EGF tem mostrado estimular a maturação do oócito *in vitro* de diferentes espécies animais (Guler *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Prochazka *et al.*, 2003) e humanos (Goud *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro*, com as BMPs, mostraram que a BMP-4 promove a manutenção da viabilidade, bem como a ativação e crescimento de folículos primordiais de ratas (Nilsson e Skinner, 2003). Já a BMP-7 promove a ativação e crescimento de folículos primordiais, bem como aumenta a expressão de receptores para FSH durante o cultivo de ovários de camundongos (Lee *et al.*, 2004). Durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa de rata, foi observado que a BMP-7 modula a ação do FSH, no sentido de aumentar a produção de estradiol e inibir a síntese de progesterona (Shimasaki *et al.*, 1999). Já com relação à BMP-15, 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 (Vitt *et al.*, 2000; Fortune, 2003; Nilsson *et al.*, 2002). A BMP-15 tem um papel essencial nos estádios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário), promovendo proliferação das células da granulosa e prevenindo diferenciação (Dong *et al.*, 1996; Vitt *et al.*, 2000). A ativina, que pertence a mesma família das BMPs, estimula 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 em mitose. Quando testada em caprinos, a ativina (10 ou 100 ng/mL) estimulou a ativação, crescimento e aumentou a porcentagem de folículos morfologicamente normais (Silva *et al.*, 2006b).

O fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) é um importante regulador de várias funções ovarianas, tais como: mitose (Roberts e Ellis, 1999), esteroidogênese (Vernon e 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 µm) (Jewgenow, 1996). O FGF-2 também se mostrou eficiente na ativação e crescimento de folículos primordiais e primários de ratas (Nilsson *et al.*, 2001). 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). Quando testado em caprinos, o FGF-2 (50 ng/mL) promoveu um aumento significativo dos folículos em desenvolvimento e manutenção da viabilidade folicular durante 5 dias de cultivo (Matos *et al.*, 2007b). No tocante ao KGF, também conhecido como fator de crescimento fibroblástico 7 (FGF-7), algumas pesquisas demonstraram que este fator estimula 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). Já o VEGF, que é um dos fatores responsáveis pela angiogênese folicular, atua estimulando a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (Redmer e Reynolds, 1996). Estudos demonstraram que quando adicionado ao meio de cultivo *in vitro*, na concentração de 50ng/ mL, atua inibindo a apoptose em células da granulosa (Shin *et al.*, 2006). Já em bovinos, o VEGF (10 ng/mL) estimula a transição de folículos primários para folículos secundários após 10 dias de cultivo (Yang e Fortune, 2007).

No que se refere ao VIP, ele é considerado um neuropeptídeo que 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).

Conforme pode ser observado, a utilização da biotécnica de MOIFOPA contribui de forma decisiva para a compreensão da foliculogênese, mostrando que o crescimento folicular é regulado por hormônios, fatores intra-ovarianos e peptídeos.

A influência de diferentes hormônios, fatores de crescimento e outros peptídeos sobre a ativação e

crescimento *in vitro* de FOPA é ilustrado na Tab. 1.

Tabela 1. Influência de hormônios e fatores de crescimento sobre a ativação e crescimento *in vitro* de FOPA.

Estágio folicular	Efeito positivo	Efeito negativo
<u>Primordial</u>	IGF-1 e 2 (p) GDF-9 (r) Insulina (r, b, p) <i>Kit Ligand</i> (r) FGF-2 (r) LIF (r) KGF (r) BMP-4 (r) BMP-7 (r) BMP-15 (r)	IGF-1 (b) AMH (r)
↓		
<u>Primário</u>	FSH (r, p) GDF-9 (r, p, o) BMP-15 (o) FGF-2 (b) VEGF (b) Estradiol (b) EGF (r) TGF-β (r) Ativina (r) Andrógenos (p, b)	AMH (b) Estradiol (r)
↓		
<u>Secundário</u>	FSH (r, p, b) GDF-9 (r, p, o) BMP-15 (o) FGF-2 (b) IGF-1 (r, b) KGF (r) LH (r) GH (r) Estradiol (b) EGF (r, b) TGF-β (r) Ativina (r, b) Andrógenos (p)	FSH (r, b) IGF-1 (b) TGF-β (b) Ativina (r) AMH (r)
↓		
<u>Terciário</u>		

(r) roedores, (b) bovinos, (p) primatas (o) ovinos

Fonte: adaptado de Fortune (2003)

Importância da MOIFOPA para a produção de embriões em larga escala

Conforme já mostrado, a MOIFOPA é uma biotécnica capaz de recuperar milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário através do isolamento. Tais folículos são fonte de oócitos que podem ser destinados para a produção *in vitro* de embriões. Os estudos *in vitro* têm mostrado resultados bastante satisfatórios com animais de laboratório. Eppig e O'Brien (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Mais recentemente, esta mesma equipe aperfeiçoando o protocolo utilizado anteriormente, relatou a produção de embriões e o nascimento de 59 camundongos saudáveis a partir de folículos pré-antrais cultivados, maturados e fecundados *in vitro* (O'Brien *et al.*, 2003). Com relação aos estudos com espécies domésticas, os resultados mais satisfatórios foram com suínos onde chegou-se até o estágio de blastocisto após cultivo de folículos secundários, maturação e fecundação *in vitro* (Wu *et al.*, 2001). Anteriormente, Hirao *et al.* (1994) obtiveram a ovulação *in vitro* a partir de folículos pré-antrais isolados que cresceram e maturaram *in vitro*. No caso das outras espécies mamíferas, como por exemplo: bovinos, caprinos e ovinos, foi obtido a formação de antro a partir de folículos secundários isolados e cultivados *in vitro* (Gutierrez *et al.*, 2000; Cecconi *et al.*, 1999; Huamin e Yong, 2000). Diversas pesquisas com estas espécies estão atualmente priorizando o desenvolvimento de meios de cultivo eficientes que promovam a maturação de milhares de oócitos oriundos dos folículos pré-antrais, o que possibilitaria a produção em larga

escala de embriões de animais de alta produtividade.

Considerações finais e perspectivas

Conforme mostrado, a biotécnica de MOIFOPA tem contribuído para a compreensão da foliculogênese, abrindo assim novas perspectivas para a produção em larga escala de embriões de animais geneticamente superiores. Folículos pré-antrais isolados de ovários de seres humanos, animais domésticos, silvestres e de laboratório podem ser cultivados *in vitro* em meios especiais permitindo um aumento da taxa de desenvolvimento folicular *in vitro*. Além disso, foram elucidadas as funções que vários hormônios e fatores de crescimento exercem durante o desenvolvimento folicular.

Atualmente, a biotécnica de MOIFOPA vem sendo utilizada para a produção em larga de embriões de animais de laboratório, não sendo possível ainda à produção de embriões de animais domésticos. Entretanto, o rápido avanço da ciência, associado às facilidades crescentes de trocas de informações entre laboratórios do mundo inteiro, poderão resultar, em um futuro breve, no desenvolvimento de sistema de cultivo que permitam um excelente crescimento folicular com a preservação da viabilidade folicular. Isso possibilitará a utilização de oócitos oriundos da numerosa população de folículos pré-antrais isolados e crescidos *in vitro*, em programas de fecundação *in vitro*, clonagem e transferência de embriões, contribuindo à longo prazo para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico e mesmo aqueles em via de extinção. À curto prazo, paralelamente ao estudo de crescimento folicular *in vitro*, uma alternativa é de desenvolver procedimentos de isolamento e congelação de folículos pré-antrais *in vitro* visando-se à utilização futura em sistemas de cultivo que apresentem condições ótimas para o completo desenvolvimento folicular *in vitro*. Futuramente, com a utilização, na prática, da biotécnica de MOIFOPA, será factível o restabelecimento de populações de animais ameaçados de extinção a partir de pequenos números de fêmeas.

Referências

- Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, Refael ZB.** Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24h. *Hum Reprod*, v.14, p.1299-1301, 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*, v.118, p.1682-1689, 1986
- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues AP, Costa SH, Goncalves PB, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology*, v.60, p.735-742, 2003a.
- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Gonçalves PBD, Figueiredo JR.** Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. *Fertil Steril*, v.81, p.735-740, 2003b.
- Anderson E, Lee GY.** The participation of growth factors in stimulating 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 ER, Seneda MM, Alfieri AA, Oliveira JA, Bracarense APFRL, Figueiredo JR, Tonioli R.** Interactions of índole 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 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*, 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. *Biol Reprod*, v.66, p.830-835, 2002.
- Boland NI, Gosden RG.** Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil*, v.101, p.369-374, 1994.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.109, p.165-171, 1997.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M.** In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- 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.
- 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*, v.70, p.1664-1669, 2004.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.
- Eppig JJ, O'Brien MJ.** Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biol Reprod*, v.54,

p.197-207, 1996.

Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van Den Hurk R, Bevers MM, Nusgens B, Beckers JF. Development of combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, v.40, p.789-799, 1993.

Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais-MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. v1, p.227-260.

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

Gospdarowicz D, Bialecki H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology*, v.104, p.757-764, 1979.

Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van Der Elst J, De Sutter P, Dhont M. *In vitro* maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod*, v.13, p.1638-1644, 1998.

Grob HS. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. *Science*, v.146, n.3640, p.73-74, 1964.

Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, v.54, p.209-218, 2000.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. *Biol Reprod*, 62:1322-1328, 2000.

Hartshorne GM. *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod*, v.2, p.94-104, 1997.

Heindel JJ, Sneed J, Powell CJ, Davis B, Culler MD. A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, regulates the function of rat granulosa cells *in vitro*. *Biol Reprod*, v.54, p.523-530, 1996.

Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Sato S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, v.100, p.333-339, 1994.

Hovatt O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RML. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod*, v.12, p.1032-1036, 1997.

Hreisson 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*, v.87, p.316-321, 2002.

Huanmin Z, Yong Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p. 641-650, 2000.

Hulshof SC, Dijkstra G, Van Der Beek EM, Bevers MM, Figueiredo JR, Beckers JF, Van Den HR. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary. *Biol Reprod*, v.50, p.553-560, 1994.

Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, van der Donk JA, van der Hurk R. Effects of human recombinant FSH and 17 β estradiol on The culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.44, p.217-226, 1995.

Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers 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*, v.48, p.133-142, 1997.

Hutt K, McLaughlin EA, Holland MK. KL and KIT have diverse role during mammalian oogenesis. *Mol Hum Reprod*, v.12, p. 61-69, 2006.

Ismail RS, Dube M, Vanderhyden BC. Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. *Dev Biol*, v.184, p.333-342, 1997.

Jewgenow K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v.45, p.889-895, 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*, v.70, p.82-90, 2005.

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*, v.51, p.327-333, 1994.

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*, v.140, p.818-826, 1999.

Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SK, Shimasaki S, Lee S, Lee KA. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev*, v.69, p.159-163, 2004.

Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens T, Smits J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biol Reprod*, v.71, p.1730-1738, 2004.

Li R, Phillips DM, Mather JP. Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. *Endocrinology*, v.136, p.849-856, 1995.

Li YH, Liu RH, Jiao LH, Wang WH. Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol

- oncytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Zygote*, v.10, p.349-354, 2002.
- 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.
- 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*, v.6, p.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*, v.56, p.39-49, 1999.
- Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LHR, Rumpf R, Bao SN.** Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1101-1114, 2004.
- Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, Mccauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN.** Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *J Anim Sci*, v.82, p.1967-1975, 2004.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia Jr JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão SN, Lucci CM, Figueiredo JR.** Essencial role of Follicle Stimulating Hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, 2007a. (in press).
- Matos MHT, Van Den Hurk R, Lima-Verde IB, Luque MCA, Santos KDB, Martins FS, Bão SN, Lucci CM, Figueiredo JR.** Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cells Tiss Org*, 2007b. (in press).
- 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 Fertil*, v.99, p.577-584, 1993.
- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK.** Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.188, p.65-73, 2002.
- Nilsson EE, Parrot JA, Skinner MK.** Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.175, p.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*, v.67, p.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*, v.69, p.1265-1272, 2003.
- Nuttinck F, Collete L, Massip A, Dessy F.** Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigations. *Theriogenology*, v.45, p.1235-1245, 1996.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v.68, p.1682-1686, 2003.
- 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 USA*, v.99, p.8060-8065, 2002.
- Parrot JA, Skinner MK.** Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.262-271, 1999.
- Prochazka R, Kalab P, Nagyova E.** Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Biol Reprod*, v.68, p.797-803, 2003.
- Redmer D, Reynolds L.** Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod*, v.1, p.182-192, 1996.
- Roberts RD, Ellis RCL.** Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells *in vitro*. *Biol Reprod*, v.61, p.1387-92, 1999.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004a.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.211-227, 2004b.
- 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. *Biol Reprod*, v.48, p.552-557, 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*, v.4, p.207-214, 1998.
- Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y.** *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.63, p.27-39, 2000.
- Santos RR, Rodrigues APR, Costa SHF, Silva JRV, Matos MHT, Lucci CM, Bão SN, Van Den Hurk R, Figueiredo JR.** Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim Reprod*

Sci, v.91, p.249-263, 2006a.

Santos RR, Van Den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of *in situ* and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.53-64, 2006b.

Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.7282-7287, 1999.

Shin S-Y, Lee JY, Lee EY, Choi JY, Yoon B, Bae D, Choi D. Protective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*, v.125, p.233-238, 2006.

Silva JRV. *Growth factors in gona ovarios and the role of activina-A in the development of early-staged follicles.* 2005. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, 2005.

Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van Den Hurk R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006a.

Silva JRV, Van Den Hurk R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.273-286, 2004a.

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*, v.61, p.1691-1704, 2004b.

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*, v.70, p.11-19, 2004c.

Silva JRV, Van Den Hurk R, Van Tol HT, Roelen BAJ, Figueiredo JR. The Kit Ligand / c-Kit Receptor System in Goat Ovaries: Gene Expression and Protein Localization. *Zygote*, v.14, p.317-328, 2006b.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v.11, p.461-471, 2005.

Telfer EE. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. *Theriogenology*, v.45, p.101-110, 1996.

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 Endocrinol*, v.6, p.1942-50, 1992.

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.

Vernon RK, Spicer LJ. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J Anim Sci*, v.72, p.2696-702, 1994.

Vitt UA, Mcgee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, v.141, p.3814-3820, 2000.

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*, v.45, p.817-832, 1996.

Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Hum Reprod*, v.12, p.1993-2001, 1997.

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*, v.70, p.577-585, 2004.

Williams GL. Suckling as regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *J Anim Sci*, v.68, p.831-852, 1990.

Wu J, Benjamin RE, Carrell DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, p.375-381, 2001.

Yang MY, Fortune JE. Vascular Endothelial Growth Factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 2007. (in press).

Zama AM, Hudson FP, Bedell MA. Analysis of Hypomorphic Kitl^{SI} Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells. *Biol Reprod*, v.73, p.639-47, 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*, v.65, p.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*, v.135, p.207-213, 1994.

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