



Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos

Regulatory factors of folliculogenesis in mammalian

Fabricio Sousa *Martins*, José Roberto Viana *Silva*, Ana Paula Ribeiro *Rodrigues*,
José Ricardo de *Figueiredo*

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais
LAMOFOPA - Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000, Fortaleza, Ceará

¹Correspondência, p. 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 ao 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.

Keywords: hormones, growth factors, in vitro culture, preantral follicles.

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, em que 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 por fatores de crescimento que agem, estes últimos, direta ou indiretamente, de forma autócrina ou parácrina.

Nesse contexto, uma melhor identificação e uma maior 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, o estabelecimento de um eficiente meio de cultivo poderá ser uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diversos estádios de desenvolvimento, para as técnicas 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 na 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 células germinativas

primordiais. 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 células germinativas primordiais 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 a formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (Moore e 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 e 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 e 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, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (Van den Hurk e Zhao, 2005). A foliculogênese ocorre simultaneamente à oogênese, quando o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies. Em outras palavras, a foliculogênese inicia-se 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. Nesse 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 os 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 e 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 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 da 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 na 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 e 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 nucleossômicas, 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 desses 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 estabeleça se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (Hsu e Hsueh, 2000). Duas famílias importantes regulam o processo apoptótico, p. 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 na 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_L e membros pró-apoptóticos, incluindo Bax, Bid, Bik, BOD e Bcl-X_S (Markstrom *et al.*, 2002).

Importância do FSH, LH e do Hormônio de Crescimento (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). A seguir, serão relatados os efeitos do FSH, LH e GH.

Hormônio Foliculo 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, a síntese de esteróides e a expressão de receptores para Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e 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, reforça 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 µm) 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 μm), 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 na 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 porcentagem de folículos atresicos (Roy e Greenwald, 1989). Liu *et al.* (1999) observaram que o FSH promoveu o crescimento de folículos pré-antrais (95–120 μm) isolados de ovários de camundongas adultas. Nesta mesma espécie, o FSH aumentou a sobrevivência e a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a secreção de estradiol e inibina em folículos isolados (95-142 μm ; Cortvindr *et al.*, 1997).

Hormônio Luteinizante (LH)

O 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 detectados em gônadas de roedores mesmo antes da formação folicular, o primeiro receptor funcional para LH (LHR) foi observado em ovários de camundongas cinco dias após o nascimento (O'Shaughnessy *et al.*, 1997). Isso 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* (Cortvindr *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 metafase II quando o cultivo foi realizado por 13 dias em meio contendo FSH e LH juntos (Cortvindr *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 e 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 fator de crescimento semelhante à insulina-1 (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 *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 quatro 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 quatro dias (Langhout *et al.*, 1991).

Eckery *et al.* (1997) demonstraram que o RNAm para o receptor do GH é abundante no oócito e nas 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 Morfogênica do Osso-15 (BMP-15), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), Fator de Crescimento

Keratinócito (KGF), Neurotrofinas, Peptídeo Intestinal 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- β (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 (Hreissou *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. Hreissou *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 sete 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 nove dias de cultivo, 10 ng/mL de GDF-9 estimulam 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 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 atrésicos de bovinos e ovinos. Há fortes evidências sugerindo que a alteração nos níveis de IGFBP é conseqüência 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-1 tem sido localizado nas células da granulosa de folículos antrais saudáveis enquanto o IGF-2 foi encontrado nas células da granulosa de folículos saudáveis e atrésicos (Zhou *et al.*, 1996). Ambos os 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 no crescimento folicular, estimulou a proliferação das células da granulosa e preveniu a apoptose de folículos pré-antrais cultivados por quatro 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 seis, 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 por meio 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 por meio de sua ligação ao receptor tirosina-quinase, conhecido com *c-kit*. Numerosos trabalhos têm mostrado que, em ovários de roedoras, o KL e o *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 do desenvolvimento folicular. A utilização do KL no cultivo *in vitro* de ovários de ratas recém-nascidas, por cinco ou 14 dias, aumentou a porcentagem 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, oito membros (Riese 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.*, 1995b), enquanto o RNAm do EGF já foi descrito somente no oócito e células da granulosa de folículos antrais suínos (Singh *et al.*, 1995b). 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, nas células da teca e no oócito em todos os estádios de desenvolvimento folicular e nas células intersticiais circundando pequenos folículos pré-antrais. 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 tem sido localizada em oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais e também nas células luteais de porcas (Singh *et al.*, 1995a) 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 e Treacy, 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 a manutenção da viabilidade por até seis 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- α , HB-EGF, anfiregulina, betacelulina e epiregulina. O TGF- α , 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 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, a betacelulina e a 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 β . 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 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 nas 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 nas 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 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 a 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 atua 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, p. 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 μ m) (Jewgenow, 1996). O FGF-2 também se mostrou eficiente na ativação e no crescimento de folículos primordiais e primários de ratas (Nilsson *et al.*, 2001). Recentemente, esses mesmos autores mostraram que o FGF-2 e o KL são necessários para promover a ativação de folículos primordiais de ratas (Nilsson e Skinner, 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 seis 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 cinco 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 por meio 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 primordiais para primário, pois, quando os ovários de ratas de quatro 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 o 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) 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 por meio de três tipos diferentes de receptor, p. PAC₁-R, VPAC₁-R e VPAC₂-R e tem sido encontrado em vários órgãos e tecidos periféricos como pulmões, testículos, adrenais e ovários (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 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 subunidades de inibina- β , a β_A e/ou β_B , que se combinam 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 cúmulus de folículos terciários (Rabinovici *et al.*, 1992) e as três subunidades de inibina foram detectadas em folículos primários e secundários de macacas Rhesus (Rabinovici *et al.*, 1992). Em ovários ovinos, as subunidades β_A e β_B foram localizadas nas células da granulosa e no oócito de folículos pré-antrais. 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 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 essa substância aumentou o número de células da granulosa, demonstrado pela incorporação de timidina [3 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/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 μ g/mL em ovários de camundongas aumenta o crescimento vascular, promove o desenvolvimento folicular e diminui a apoptose no foliculo (Quintana *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que o cultivo *in vitro*, durante 24 horas em 50 ng/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-ovarianos e sinalizações endógenas. A elucidação desses 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

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.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*, v.118, p.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*, v.37, p.269-277, 2000.
- Anderson E, Lee GY.** 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 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*, 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.
- Arimura A.** Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Trends Endocrinol Metab*, v.3, p.288-294, 1992.
- Barnett KR., Schilling CCR, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod*, v.10, p.1-19, 2006.
- Bennett RA, Osathanondh R, Yeh J.** Immunohistochemical localization of transforming growth factor- α , epidermal growth factor (EGF), and EGF receptor in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, v.8, p.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 Fertil*, v.38, p.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*, v.60, p.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*, v.101, p.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*, v.129, p.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*, v.4, p.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*, v.70, p.255-261, 2005.
- Carpenter G.** Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol*, v.146, p.697-702, 1999.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian TGF- β superfamily. *Endocr Rev*, v.23, p.787-823, 2002.
- Cortvriendt R, Smitz J. Van Steirteghem AC.** Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Human Reprod*, v.12, p.59-768, 1997.
- Cortvriendt 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. *Fertil Steril*, v.70, p.1114-1125, 1998.
- Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI.** Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod*, v.68, p.1736-1741, 2001.
- Danilovich NA, Bartke A, Winters TA.** Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. *Biol Reprod*, v.62, p.103, 2000.
- 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.
- Doneda L, Klinger FG, Larizza L, De Felici M.** KL/KIT co-expression in mouse fetal oocytes. *Int J Dev Biol*, v.46, p.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*, v.383, p.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*, v.57, p.507-13, 1997.
- Erickson GF.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, v.4, p.233-254, 1986.
- Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aarason SA.** Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, v.245, p.752-755, 1989.

- Findlay JK, Drummond AE.** Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends Endocrinol Metab*, v.10, p.183-188, 1999.
- 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. *Mol Cell Endocrinol*, v.191, p.35-43, 2002.
- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S.** The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.53-60, 2000.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development, p. activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.
- Garnett K, Wang J, Roy SK.** Spatiotemporal expression of EGF receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary, p. follicle stage specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol Reprod*, v.67, p.1593-1604, 2002.
- Gong JG, Baxter G, Bramley TA, Webb R.** Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin, p. a dose-response study. *J Reprod Fertil*, v.110, p.91-97, 1997.
- Gong JG, Bramley T, Webb R.** The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers, p. follicular population and peripheral hormones. *Biol Reprod*, v.45, p.941-949, 1991.
- Gordon I.** Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge, UK: CAB International, Raven Press, 1994. p.4349.
- Gougeon A, Busso D.** Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.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*, v.62, p.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*, v.140, p.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*, v.54, p.523-530, 1996.
- Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Kato S.** *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, v.100, p.333-339, 1994.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v.124, p.43-101, 1991.
- 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.
- Herrington J, Carter-Su C.** Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocr Metab*, v.12, p.252-257, 2001.
- Hsu SY, Hsueh AJ.** Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis, p. An ovarian paradigm. *Physiol Rev*, v.80, p.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. *Vet Quart*, v.2, n.16, p.78-80, 1994.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Bekers JF, Bevers MM, Van der Donk JA.** Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 44, p.217-226, 1995.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Bekers JF, Bevers MM, Vanderstichele H, Van Den Hurk R.** Bovine preantral follicles and activin, p. immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A *in vitro*. *Theriogenology*, v.48, p.133-142, 1997.
- Hutchinson LA, Findlay JK, Herrington AC.** Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Mol Cell Endocr*, v.55, p.61-9, 1988.
- 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.
- Jones JI, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, v.16, p.3-34, 1995.
- Johnson AL.** Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.185-201, 2003.
- 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.
- 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*, v.122, p.303-315, 2004

- Kezele PR, Ague JM, Nilsson E, Skinner MK.** Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. *Biol Reprod*, v.72, p.241-255, 2005.
- Kidder GM, Mhawi AA.** 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. *Biol Reprod*, v.65, p.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*, v.268, 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. *Biol Reprod*, v.59, p.836-842, 1998.
- Koos RD.** Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus, p. potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod*, v.52, p.1426-1435, 1995.
- Langhout DJ, Spicer LJ, Geisert RD.** Development of a culture system for bovine granulosa cells, p. effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J Anim Sci*, v.69, p.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*, v.140, p.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*, v.65, p.994-999, 2001.
- Levi-Setti PE, Cavagana M, Baggiani A, Zanonni E, Colombo GV, Liprandi V.** FSH and LH together in ovarian stimulation. *J Obst Gynecol Reprod Biol*, v.115, p.34-39, 2004.
- Li R, Phillips DM, Mather JP.** Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. *Endocrinology*, v.136, p.849-856, 1995.
- Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y.** A comparative study on transforming growth factor- β and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*, v.139, p.2480-2485, 1999.
- 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.
- 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*, v.82, p.1967-1975, 2004.
- Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v.123, p.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 sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. *Acta Sci Vet*, v.34, p. 265, 2006.
- 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*, v.23, p.139-54, 2002.
- 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.
- Moore KL, Persaud TV.** Início do desenvolvimento humano. In: Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.13-38.
- 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.
- Morita Y, Tilly JL.** Oocyte apoptosis, p. Like sand through and hourglass. *Dev Biol*, v.213, p.1-17, 1999.
- Nilsson E, Parrot JA, Skinner MK.** Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocr*, v.175, p.123-130, 2001.
- 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.
- 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.** Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocr*, 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.
- Ojeda SR, Dissen GA and Romero C.** Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. In: Fugimoto S, Adashi EY, Hsueh AJW, Strauss III, JF (Ed.). *Frontiers in endocrinology*, v.21: Ovarian function research: present and future. Rome: Sero Symposia publications, Rome, 1999. p.21171-21178.
- Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA.** Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.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. *Biol Reprod*, v.57, p.602-608, 1997.
- 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. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.3845-3851, 1999.
- Otsuka F, Shimasaki S.** A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand, p. its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci*, v.99, p.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*, v.276, p.11387-11392, 2001.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T-H, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S.** Bone morphogenetic protein-15, p. identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, v.275, p.39523-39528, 2000.
- 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. *Mol Cell Endocr*, v.214, p.1-8, 2004.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M.** EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, v.303, p.682-684, 2004.
- Pedro KG.** Neuropeptides in the skin. *An Bras Dermatol*, v.4, p.483-498, 2003.
- Parrot JA, Skinner MK.** Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.262-271, 1999.
- 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*, v.139, 2240-2245, 1998.
- Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Barañao RI.** Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril*, v.82, suppl.3, p.1101-1115, 2004.
- Rabinovici J, Spencer SJ, Doldi N, Goldsmith PC, Schwall R, Jaffe RB.** Activin-A as an intraovarian modulator, p. actions, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin Invest*, v.89, p.1528-1536, 1992.
- 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*, v.128, p.1119-1126, 2001.
- Reeka N, Berg FD, Brucker C.** Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod*, v.13, p. 2199-2205, 1998.
- Riese DJ, Stern DF.** Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioassays*, v.2, p.41-48, 1998.
- Redmer D, Reynolds L.** Angiogenesis in the ovary. *Biol 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.
- 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, Greenwald GS.** Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J Reprod Fertil*, v.87, p.103-114, 1989.
- Roy SK, Greenwald GS.** Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology*, v.126, p.1309-1317, 1990.
- Roy SK, Kole AR.** Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors, p. *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.
- Roy SK, Treacy BJ.** Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.
- Rüsse I.** Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.
- Sadeu JC, Cortvrint R, Ron-El R, Kastertein E, Smitz J.** Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. *Fert. Ster.*, v.85(1), p.1130-1141, 2006.

- Saumande J.** La folliculogénese chez les ruminants, *Rec Vét*, v.167, p.205-218, 1991.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- 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 Endocrinol*, v.113, p.137-143, 1995a.
- Singh B, Rutledge JM, Armstrong DT.** Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev*, v.40, p.391-399, 1995b.
- Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, Van Der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van Den Hurk R.** The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006a.
- 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*, v.14, p.107-117, 2006b.
- 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, 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*, v.70, p.11-19, 2004b.
- Skinner MK.** Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v.11, p. 461-471, 2005.
- Skinner MK, Coffey RJ.** Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology*, v.123, p.2632-2638, 1988.
- 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. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.125, p.233-238, 2006.
- 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.
- 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*, v.110, p.95-102, 1995.
- Tilly JL.** Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod*, v.1, p.162-172, 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 Endocr*, v.6, p.1942-50, 1992.
- Tsafiri A, Braw RH.** Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol*, v.6, p.226-265, 1984.
- Valve E, Penttila T, Paranko J, Härkönen P.** FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Commun*, v.232, p.173-177, 1997.
- 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 Wezel IL, Umaphysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ.** Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol Cell Endocr*, v.115, p.133-140, 1995.
- 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.
- Wandji S, Fortier MA, Sirard M.** Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol Reprod*, v.46, p.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*, v.45, p.817-832, 1996.
- Wang J, Roy SK.** Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster, p. modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, v.70, p.577-585, 2004.
- Wassarman PM.** The mammalian ovum. In, p. 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*, v.63, p.320-327, 2000.
- Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Kuroda H, Matsushita K, Hamid A, Yura Y, Mori I.** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol*, v.11, p.371-381, 1997.
- Yoshino O, McMahon 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*, v.103, p.10678-10683, 2006.
- Zama AM, Hudson FP, Bedell MA.** Analysis of Hypomorphic KitlSI Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells. *Biol Reprod*, v.73,



p.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*, 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.

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*, v.137, p.4893-4901, 1996.
