



Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor da leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras

The role of Sphingosine 1-phosphate and Leukemia Inhibitory Factor in the culture of goats preantral follicles in vitro

J.E. Nóbrega Jr.^{1,3}, P.B.D. Gonçalves¹, G.R. Pereira¹, J.R. Figueiredo²

¹Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

²Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³Correspondência: j.escario@gmail.com

Resumo

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) possibilita o aumento do potencial reprodutivo das fêmeas a partir do isolamento e cultivo de folículos pré-antrais (FOPA). Fisiologicamente, vários fatores de crescimento estão envolvidos durante o processo da foliculogênese, muitos dos quais até o momento não foram testados em cabras. Esta revisão tem como objetivo correlacionar a participação da S1P e do LIF no cultivo dos FOPA e, assim, possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados com a foliculogênese.

Palavras-chave: Esfingosina 1-fosfato, fator inibidor da leucemia, folículo pré-antral, caprino.

Abstract

The manipulation of oocytes included in preantral Follicles increasing the reproductive potential of the females from the isolation and culture of preantral follicles was studied. Physiologically various growth factors are involved in the folliculogenesis process, many of which have not been tested in goats so far. This review aims to correlate the involvement of S1P and LIF in the culture of preantral follicle enabling a better understanding of the mechanisms related to folliculogenesis.

Keywords: Sphingosine 1-phosphate, leukemia inhibitory factor, preantral follicles, caprine.

Introdução

Em animais domésticos, os métodos naturais de reprodução têm se mostrado pouco suficientes para aumentar a eficiência reprodutiva nos rebanhos. Diante desta situação, a forma mais coerente para corrigir e suprir essa constante demanda é o emprego de biotécnicas. Com o objetivo de aumentar a produção, surge a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), uma ferramenta biotecnológica que tem recebido atenção de vários pesquisadores. Essa técnica consiste no resgate de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) e seu posterior cultivo *in vitro*, aumentando o potencial reprodutivo das fêmeas pelo resgate dos FOPA antes da atresia. A MOIFOPA é importante ainda para espécies em vias de extinção, as quais não conseguem reproduzir-se no cativeiro, pois pode criopreservar e manter os gametas femininos em banco de germoplasma (Figueiredo et al., 2006).

A possibilidade do desenvolvimento dos FOPA é possível, desde que mantida a regulação entre os fatores estimulatórios e inibitórios presentes no ovário. *In vitro*, esses fatores estimulatórios com efeitos confirmados em espécie não caprina são: o “kit ligand” (Parrott e Skinner, 1999), o growth differentiation factor”-9 (GDF-9), o “fibroblast growth factor”-2 (FGF-2; Nilsson et al., 2001), o “keratinocyte growth factor (KGF; Nilsson e Skinner, 2003), a “bone morphogenetic protein”-4 (BMP-4; Tanwar et al., 2008) e o “nerve growth factor” (NGF), importantes para a ativação de folículos primordiais (Dissen et al., 2001).

A esfingosina 1-phosphato (S1P) e o fator inibidor da leucemia (LIF) são dois fatores ainda pouco estudados em caprino, mas com resultados promissores no cultivo de ovários de mamíferos. A S1P possui a capacidade de manter a viabilidade folicular e o crescimento dos FOPA em camundongas (Spiegel e Kolesnick, 2002; Kaya et al., 2008), e o LIF participou do desenvolvimento folicular em mulheres (Abir et al., 2004).

O uso da espécie caprina como modelo experimental para estudo dos FOPA *in vitro* vem sendo testado por Bruno et al. (2006), com 10% de soro fetal bovino, o qual manteve a morfologia folicular e os meios acrescidos com 20% de soro de cabra em estro promoveu ativação e crescimento dos FOPA. Lima-Verde et al. (2009) confirmaram que os antioxidantes promovem ativação folicular na mesma espécie. Recentemente, Nóbrega Jr. et al. (2012) observaram que o LIF participa da ativação dos FOPA de cabras. A presente revisão tem como objetivo correlacionar a participação da S1P e do LIF no cultivo dos FOPA e, com isso, possibilitar melhor compreensão dos mecanismos relacionados à foliculogênese.



Regulação e atividade ovariana

O ovário realiza duas funções básicas: a função exócrina, que consiste na liberação dos oócitos aptos à fecundação, e a função endócrina, que consiste na produção de hormônios esteroides, responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais femininas secundárias e pela manutenção da gestação (Hirshfield, 1991; Knight e Glistler, 2006). Duas regiões histológicas são observadas. A primeira é a região cortical, rica em fibras colágenas e pouco vascularizada, onde se encontram os FOPA e os folículos em diferentes estádios de desenvolvimento. São encontrados ainda corpos hemorrágicos, corpo lúteo e corpo *albicans* (Liu et al., 2006). A segunda região é composta por tecido conjuntivo, fibras de tecido nervoso, vasos sanguíneos e ductos linfáticos (Silva et al., 2004).

Os critérios para a classificação dos FOPA foram adotados por Yang e Fortune (2008). São classificados como: folículo primordial (oócito circundado apenas por uma única camada de células da pré-granulosa, de aspecto pavimentoso); folículo primário (oócito circundado por uma única camada de células da granulosa de aspecto cuboide); e folículo secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de aspecto cuboide e presença da zona pelúcida).

O desenvolvimento dos FOPA, em parte, ocorre por fatores parácrinos secretados pelo oócito e por células somáticas do ovário. Após a ativação dos folículos primordiais até a seleção de folículos secundários, vários fatores exercem diferentes efeitos sobre o crescimento e a diferenciação dos oócitos e das células da granulosa (Albertini et al., 2001). É fundamental que haja uma interação entre a sinalização parácrina do oócito e as células somáticas do ovário, para que ocorra os processos de oogênese e foliculogênese nos mamíferos (Hutt et al., 2006).

Esfingosina 1- fosfato (S1P)

A S1P é um derivado da esfingomielina presente na membrana celular, e sua hidrólise depende da esfingomielinase endotelial, induzida por citoquinas. Nesse processo, a ceramida participa como uma importante molécula lipídica transdutora de sinal, atuando como segundo mensageiro em uma variedade de processos biológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular, apoptose, além das respostas inflamatórias e imunológicas do organismo (Moura, 2003).

Somados a essas atividades, a S1P ainda participa dos mecanismos reguladores do ciclo celular, entre eles o crescimento, o efeito antiapoptótico, a angiogênese e a proliferação celular. A ceramida, a ceramida 1-fosfato, a esfingosina, bem como a S1P, atuam como segundo mensageiro, ativando a proteína quinase e os demais componentes da rota de sinalização intracelular. Esses lipídios podem agir intracelularmente, como segundo mensageiro, ou extracelularmente, ativando os receptores de S1P (r-S1P) que estão dispostos na superfície da membrana celular em outros tecidos (Eyster, 2007; Zanin et al., 2008).

A formação da S1P depende da degradação da esfingomielina, sendo considerada a principal via de formação dos esfingolipídios. Dessa forma, a esfingomielina presente na membrana plasmática é clivada pela esfingomielinase e convertida em ceramida, a qual é deacilada pela enzima ceramidase, formando a esfingosina. Pela ação da esfingosinaquinase, a esfingosina presente no retículo endoplasmático e no citosol sofre a reação de fosforilação, ocorrendo a conversão da esfingosina em S1P (Tani et al., 2007).

A esfingosinaquinase possui peso molecular de 49 kDa. Posteriormente, foram relatados dois clones com 381 e 388 aminoácidos e designados como esfingosinaquinase-1 de 42.3 kDa e esfingosinaquinase-2 de 43.2 kDa. Essas duas isoformas diferem apenas em alguns aminoácidos na porção *N*-terminal, sugerindo que possam ser derivadas de algum "splicing" alternativo para a transcrição do RNAm (Pyne e Pyne, 2000).

O cultivo do córtex ovariano de fetos humanos com S1P demonstrou a capacidade da S1P para ativação e crescimento dos FOPA (Oktem e Oktay, 2007). Outras pesquisas estão sendo direcionadas para detecção e localização dos receptores S1P (r-S1P), conhecidos como "endothelial differentiation gene" (EDG), a fim de buscar aplicação clínica da S1P no tratamento de várias doenças, entre elas atividade anticâncer (Pyne e Pyne, 2000). Este mesmo r-S1P foi identificado nas células da veia umbilical de humanos; entre suas funções, destacam-se a manutenção da sobrevivência, a migração e a proliferação celular, que favorecem a angiogênese. As ações da S1P ocorrem por meio da ligação aos diferentes membros da família S1P/EDG, entre eles EDG1, EDG3, EDG5 e EDG8. Uma vez que a S1P esteja ligada ao seu receptor, o EDG1 promove uma série de sinalização por múltiplas vias por meio da ligação da proteína-G, incluindo a ativação da fosfolipase C, a mobilização de Ca^{2+} , a ativação do mitógeno ativador da proteína quinase (MAPK), a regulação da ERK e a inibição da adenilatociclase. Em roedores, a expressão de receptores S1P1/EDG1 ocorre no cérebro, pulmão, coração, baço, rim, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, pele, testículo e útero (Kluk e Hla, 2002).

Fator inibidor da leucemia (LIF)

O LIF é uma citocina pleiotrópica, com peso molecular entre 40 e 50 kDa, pertencente à família da



interleucina 6 (IL-6), da qual fazem parte a oncostatina, o fator neutrófico ciliar e a cardiotropina-1 (Kimber, 2005). Suas ações são várias, mas se destacam a manutenção de células pluripotentes, a indução de hipertrofia cardíaca *in vitro*, a indução de proteínas de fase aguda hepática, a formação osteoclástica e a manutenção da sobrevivência e diferenciação dos neurônios (Taga e Kishimoto, 1997). Além dessas, o LIF está relacionado com a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular nos sistemas imune, nervoso, cardíaco e reprodutivo (Ozaki e Leonard, 2002). Bornstein et al. (2004) relataram que as citocinas interagem com a esteroidogênese de maneira sistêmica e complexa. Essas evidências sugerem que as citocinas produzidas pelo endométrio e pelo blastocisto participam do mecanismo de interação entre o embrião e o útero (Dominguez et al., 2003; Herrler et al., 2003).

Nos camundongos fêmeas, o LIF é considerado fundamental para a reprodução, uma vez que as fêmeas “knockout” para esse gene apresentam falhas de implantação embrionária (Stewart et al., 1992; Dimitriadis et al., 2005). Em coelhas, os receptores para LIF (r-LIF) são evidenciados no óvulo e no endométrio. Esses mesmos receptores, nos estágios de mórula e de blastocisto, estão presentes, indicando que o LIF pode agir de maneira parácrina durante o desenvolvimento embrionário (Bhatt et al., 1991; Lei et al., 2004).

Em mulheres, o LIF desempenha um importante papel para a manutenção da fertilidade (Cullinan et al., 1996). Estudos demonstraram que a concentração de LIF em lavados uterinos aumenta durante a fase de implantação embrionária, o que caracteriza sua importância fisiológica do LIF para a reprodução em humanos (Laird et al., 1997; Lédée-Bataille et al., 2002). Dessa forma, é possível associar algumas causas de infertilidade a genótipos com menor produção ou baixa atividade de LIF (Giess et al., 1999; Yue et al., 2000).

Em ovários de roedores com expressão de r-LIF ocorreu aumento da sobrevivência e da migração das células germinativas primordiais. Fato inverso foi observado e relatado nos ovários de ratas que apresentavam deficiência ou diminuição da expressão de r-LIF, o que causou nessas fêmeas redução do número de folículos primários e falha na ovulação. Esses estudos sugerem que a presença do r-LIF é necessária para os processos de oogênese e folículo gênese nesses animais (Molyneaux et al., 2003). O LIF-r apresenta estrutura intimamente relacionada com glicoproteína 130 (gp-130), de acordo com os resultados obtidos por Gearing et al. (1991), que confirmaram em murinos a presença de cDNA para o r-LIF, apresentando 70% dos aminoácidos homólogos com humanos e possuindo atividade muitas vezes similar à IL-6, embora o LIF e a IL-6 pareçam estruturalmente independentes.

Estudos sobre o LIF demonstram sua atividade pleiotrópica relacionada à proliferação, à diferenciação e à sobrevivência celular. Isso ocorre após a ligação a um heterodímero proteico transmembrana formado pela gp-130, que compreende uma unidade receptora específica do r-LIF (Ozaki e Leonard, 2002). As ações do LIF são mimetizadas por membros da família IL-6, pois compartilham do mesmo receptor gp-130 e utilizam as mesmas vias de sinalização intracelular, por meio das janus quinases JAK/STAT, SHP-2/Ras/ERK e/ou IP3K/Akt (Kimber, 2005). A ativação desse complexo inicia a cascata de sinalização das JAK-STAT3 e das MAPK (Cheng et al., 2001).

Diferentes fatores de crescimento possuem atividade intrínseca de tirosina quinase (TK). Consequentemente, para que ocorra a sinalização celular, essas citocinas necessitam do acoplamento de outras proteínas da família das TK aos seus receptores. Essas quinases citoplasmáticas participam da sinalização de receptores celulares de superfície com perda intrínseca da atividade da TK. Quando as JAKs são ativadas, ocorre a fosforilação do domínio citoplasmático do receptor e inicia-se a cascata de sinalização (Valentino e Pierre, 2006).

Cultivos livres de FSH demonstraram que 10 ng/mL de LIF podem promover ativação e crescimento dos FOPA de cabras cultivados *in situ*. Esses resultados foram observados na histologia clássica, sendo posteriormente confirmados pela microscopia eletrônica e pela microscopia de fluorescência (Nóbrega Jr. et al., 2012).

Considerações finais

A MOIFOPA é uma alternativa para aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas, pois possibilita a criação de um ovário artificial, aproveitando ao máximo a atividade folicular das fêmeas. Dessa forma, na concepção de um ovário artificial, tanto a S1P quanto o LIF, dois fatores com efeito significativos positivos, poderão ser incorporados ao meio básico de cultivo, tornando seu uso indispensável, devido à capacidade de manter a viabilidade e o crescimento dos FOPA. Neste contexto, as cabras representam um ótimo modelo experimental para o entendimento da foliculogênese e para, em um futuro próximo, fazer o uso clínico dessas moléculas em outras espécies, incluindo seres humanos, o que possibilitará, a um só tempo, o tratamento de mulheres submetidas à rádio ou quimioterapia e a manutenção da função reprodutiva.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa.



Referências

- Abir R, Fisch B, Jin S, Barnnet M, Freimann S, Van Den Hurk R, Feldberg D, Nitke S, Krissi H, Ao A.** Immunocytochemical detection and RT-PCR expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Mol Hum Reprod*, v.10, p.313-319, 2004.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ.** Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v.121, p.647-653, 2001.
- Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL.** Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.88, p.11408-11412, 1991.
- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I.** Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.215, p.135-141, 2004.
- Bruno JB, Martins FS, Lima-Verde IB, Matos MHT, Wanderley LS, Correia JC, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Influência de diferentes origens e concentrações de soro sobre folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. *Acta Sci Vet*, v.34, suppl.1, p.352, 2006. Resumo.
- Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL.** Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.98, p.8680-8685, 2001.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL.** Leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.93, p.3115-3120, 1996.
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA.** Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*, v.11, p.613-630, 2005.
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield NA, Ojeda SR.** Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*, v.142, p.2078-2086, 2001.
- Dominguez F, Pellicer A, Simon C.** The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface. *Placenta*, v.24, p.48-55, 2003.
- Eyster KM.** The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ*, v.31, p.5-16, 2007.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Santos RR, Lopes C, Silva JRV.** Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos incluídos em folículos pré-antrais. *Acta Sci Vet*, v.34, suppl.1, p.71-84, 2006.
- Gearing P, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D, Beckmann MP.** Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J*, v.10, p.2839-2848, 1991.
- Giess R, Tanasescu I, Steck T, Sendtner M.** Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod*, v.5, p.581-586, 1999.
- Herrler A, Von Rango U, Beier HM.** Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online*, v.6, p.244-256, 2003.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v.124, p.43-101, 1991.
- Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK.** Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod*, v.12, p.61-69, 2006.
- Kaya H, Desdicioglu R, Sezik M, Ulukaya E, Ozkaya O, Yilmaztepe A, Demirci M.** Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil Steril*, v.89, p.732-735, 2008.
- Kimber SJ.** Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction*, v.130, p.131-145, 2005.
- Kluk MJ, Hla T.** Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*, v.1582, p.72-80, 2002.
- Knight PG, Glister C.** TGF- β super family members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v.132, p.191-206, 2006.
- Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X.** The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*, v.12, p.569-574, 1997.
- Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chauat G.** Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*, v.17, p.213-218, 2002.
- Lei T, Yang ZQ, Xia T, Gan L, Chen XD, Yuan JH, Zhu Y.** Stage-specific expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in rabbit preimplantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. *Reprod Domest Anim*, v.39, p.13-18, 2004.
- Lima-Verde IB, Matos MH, Bruno JB, Martins FS, Santos RR, Bão SN, Luque MCA, Vieira GAB, Silveira ER, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Oliveira MAL, Lima PF.** Effects of α -tocopherol and ternatin



antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles in vitro cultured. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.57-65, 2009.

Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, Reddy P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol*, v.299, p.1-11, 2006.

Molyneaux KA, Schaible K, Wylie C. GP130, the shared receptor for the LIF/IL6 cytokine family in the mouse, is not required for early germ cell differentiation, but is required cell-autonomously in oocytes for ovulation. *Development*, v.130, p.4287-4294, 2003.

Moura JMP. Lípidos e imunidade. *Med Interna*, v.10, p.23-28, 2003.

Nilsson E, Parrott 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. Bone morphogenetic protein-4 acts as a KGF and primordial follicle development ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, v.69, p.1265-1272, 2003.

Nóbrega Jr JE, Gonçalves PBD, Chaves RN, Magalhães DM, Rossetto R, Lima-Verde IB, Pereira GR, Campello CC, Figueiredo JR, Oliveira JFC. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability in vitro. *Zygote*, v.20, p.73-78, 2012.

Oktem O, Oktay K. Sphingosine-1-phosphate enhances human primordial follicle survival and blocks ovarian apoptosis in vitro. *Fertil Steril*, v.88, suppl.1, p.270, 2007. Resumo.

Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem*, v.277, p.29355-29358, 2002.

Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.4262-4671, 1999.

Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*, v.349, p.385-402, 2000.

Silva JR, Van Den Hurk R, Costa SHE, 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, 2004.

Spiegel S, Kolesnick R. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia*, v.16, p.1596-1602, 2002.

Squires EL. Superovulation in mares. *Vet Clin N Am: Equine Pract*, v.22, p.819-830, 2006.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, v.359, p.76-79, 1992.

Taga T, Kishimoto T. GP130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, v.15, p.797-819, 1997.

Tani M, Ito M, Igarashi Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal*, v.19, p.229-237, 2007.

Tanwar PS, O'Shea T, McFarlane JR. In vivo evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. *Anim Reprod Sci*, v.106, p.232-240, 2008.

Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol*, v.71, p.713-721, 2006.

Yang MY, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod*, v.78, p.1153-1161, 2008.

Yue ZP, Yang ZM, Wei P, Li SJ, Wang HB, Tan JH, Harper MJK. Leukemia inhibitory factor, leukemia inhibitory factor receptor, and glycoprotein 130 in rhesus monkey uterus during menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod*, v.63, p.508-512, 2000.

Zanin M, Germinario E, Libera LD, Sandonà D, Sabbadini RA, Betto R, Danieli-Betto D. Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.294, p.36-46, 2008.
