



Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro* *Role of Follicle Stimulating Hormone in folliculogenesis in vivo and in vitro*

D.M. Magalhães¹, D.D. Fernandes, V.R. Araujo, A.P. Almeida, M.H.T. Matos; J.R. Figueiredo

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

¹Correspondência, dmmvet@hotmail.com

Resumo

A foliculogênese é controlada por diversos hormônios e fatores de crescimento, que sinergicamente agem regulando os eventos envolvidos na fisiologia da reprodução. Dentre esses hormônios, destaca-se o Hormônio Folículo Estimulante (FSH), que é uma gonadotrofina presente em todas as fases da foliculogênese, atuando de forma direta ou indireta para promover o desenvolvimento folicular *in vivo* e *in vitro*. Nesse contexto, a revisão irá abordar o papel do FSH na regulação da foliculogênese de mamíferos, bem como a influência das diferentes origens de FSH sobre o crescimento folicular *in vivo* e *in vitro* e o seu papel na reprodução assistida.

Palavras-chaves: foliculogênese, FSH, reprodução assistida.

Abstract

The folliculogenesis is controlled by various hormones and growth factors, which act synergistically to regulate the events involved in the physiology of reproduction. Among these hormones, the Follicle Stimulating Hormone (FSH) is a gonadotropin which is present in all stages of folliculogenesis, acting directly or indirectly to promote the follicular development in vivo and in vitro. In this context, the review will contribute to a better understanding of the role of FSH in the regulation of folliculogenesis of mammals as well as the influence of different sources of FSH on the follicular growth in vivo and in vitro and its role in assisted reproduction.

Keywords: folliculogenesis, FSH, assisted reproduction

Introdução

A foliculogênese, evento caracterizado pela formação, pelo crescimento e pela maturação folicular, é controlada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. A ativação folicular é caracterizada quando o *pool* de folículos primordiais deixa o estágio de repouso e começa seu crescimento. O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial ainda são escassos. Entretanto, existem hipóteses de que, além de fatores de crescimento, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) age sobre a ativação folicular (Betteridge et al., 1989).

O FSH parece estar envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (Van Den Hurk et al., 1997). Além disso, alguns estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH ao meio de cultivo promoveu a inibição de apoptose e a formação de antro em grandes folículos secundários isolados de diferentes espécies (murina: McGee et al., 1997; humana: Wright et al., 1999; ovina: Cecconi et al., 1999; bovina: Gutierrez et al., 2000; suína: Mao et al., 2002). Contrariamente aos efeitos benéficos do FSH no desenvolvimento folicular *in vitro*, Nuttinck et al. (1996) mostraram que o FSH porcino (FSHp) induz à degeneração em pequenos folículos pré-antrais bovinos.

In vivo, o FSH tem sido amplamente utilizado em programas de estimulação ovariana nas diversas espécies (humana: Agarwal et al., 2000; caprina: Baldassarre e Karatzas, 2004; bovina: Bényei e Barros, 1999). As diferenças existentes entre os resultados dos estudos que utilizam FSH podem, em parte, ser devido à origem e ao grau de pureza do FSH utilizado. Dessa forma, o objetivo dessa revisão é abordar o papel do FSH na regulação da foliculogênese de mamíferos bem como a influência das diferentes origens desse hormônio sobre o crescimento folicular *in vivo* e *in vitro* e o seu papel na reprodução assistida.

Princípios gerais da oogênese e da foliculogênese

O ovário mamífero é um órgão composto por vários tipos de células, incluindo oócito, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana, localizadas na porção funcional do ovário, o córtex (Silva, 2005). A região medular, localizada na porção mais interna do ovário na maioria das espécies, é constituída por tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário. O ovário é o órgão funcional primário do sistema reprodutivo das fêmeas e exerce duas funções

fisiológicas principais: liberação de oócitos maduros (ovulação) aptos a serem fecundados (Barnett et al., 2006) e produção de hormônios, fatores de crescimento e peptídeos (Hirshfield, 1991). Essas duas funções são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese.

Oogênese

A oogênese em ruminantes consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do oócito haplóide fecundado (Van Den Hurk e Zhao, 2005). No embrião, as células germinativas sofrem extensiva proliferação por mitose e redistribuição das organelas citoplasmáticas transformando-se em oogônias (Sadeu et al., 2006). A seguir, as oogônias entram em meiose e diferenciam-se em oócitos primários (Hirshfield, 1991). Estes, então formados, começam a primeira divisão meiótica, passando pelos estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira divisão meiótica (Hirshfield, 1991). No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica, e os oócitos permanecem nesse estágio até a puberdade. Na puberdade, imediatamente antes da ovulação, com o pico do FSH e do hormônio luteinizante (LH), os oócitos retomam a meiose, e o núcleo passa do estágio de vesícula germinativa para diacinese. Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, a progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, a expulsão do primeiro corpúsculo polar e a formação do oócito secundário, iniciando 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 nesse estágio até ser fecundado pelo espermatozóide, quando, então, completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado.

Foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (Van Den Hurk e Zhao, 2005). O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário mamífero, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito (Cortvrindt e Smitz, 2001), bem como produzir hormônios como o estrógeno, e peptídeos como inibina A e B, ativina e folistatina (Adashi, 1994). Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e as células circundantes se multiplicam e se diferenciam (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais, por sua vez, são classificados em primordiais, primários e secundários. Já os antrais, em terciários e pré-ovulatórios (Saumande, 1991).

Apesar dos fatores reguladores da foliculogênese inicial ainda não serem totalmente conhecidos, sabe-se que fatores endócrinos e, principalmente, fatores parácrinos e autócrinos estão envolvidos nessa fase.

Durante a última década, o papel de hormônios (FSH e LH) e fatores de crescimento, por exemplo, Kit ligand (KL), fator de crescimento fibroblástico - 2 (FGF-2), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF-1) e fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), na foliculogênese ovariana, tem sido bastante estudado, principalmente em roedores (Fig. 1).

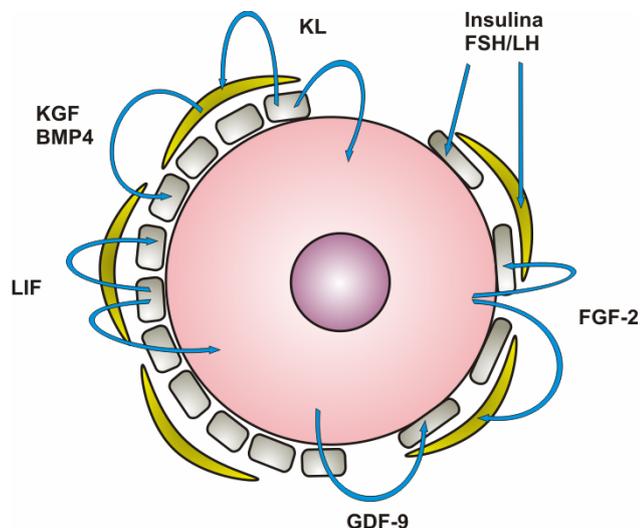


Figura 1. Atuação do KL, FGF-2, GDF-9, KGF, BMP-4, LIF, insulina, FSH e LH no folículo, através de mecanismos parácrinos e endócrinos.

Embora a foliculogênese pré-antral seja pouco dependente de gonadotrofinas, pode-se dizer que essa fase é responsiva ao FSH, visto que receptores para essa gonadotrofina (FSHR) foram detectados em folículos a partir do estágio de folículos primários (Oktay et al., 1997). Além disso, a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos foram observados após adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* (Matos et al., 2007).

Folículos pré-antrais

Os folículos primordiais são os menores folículos do ovário, tendo diâmetro de aproximadamente 33 μm em caprinos (Bezerra et al., 1998). Esses folículos são constituídos por um oócito quiescente, imaturo e circundado por uma camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa (Silva, 2005). O núcleo do oócito é relativamente grande e ocupa uma posição central à excêntrica. As organelas são uniformemente distribuídas no citoplasma ou, às vezes, mais próximas ao núcleo. As mitocôndrias são as organelas mais evidentes e são predominantemente arredondadas. No entanto, um pequeno número de mitocôndrias alongadas pode ser observado. Retículo endoplasmático liso e complexo de Golgi são observados associados a um número variável de vesículas distribuídas pelo citoplasma. As proteínas que irão formar a zona pelúcida já começam a ser sintetizadas (Lee, 2000), entretanto esta ainda não é evidente, sendo observada apenas uma justaposição do oócito e de células da granulosa, sem nenhuma junção específica (Lucci et al., 2001). Os folículos primordiais permanecem quiescentes até seu recrutamento para o grupo de folículos em crescimento (Van Den Hurk e Zhao, 2005). O primeiro sinal do início do crescimento de folículos primordiais, processo conhecido como ativação folicular, é a proliferação das células da granulosa, juntamente com a mudança na morfologia dessas células, de pavimentosa para cúbica, bem como o crescimento oocitário, o que pode acontecer dias, meses ou anos após a sua formação (Hirshfield, 1991).

Quando uma única camada de células da granulosa cúbica circunda o oócito, surgem os folículos primários (Silva, 2005). Nesses folículos, a membrana plasmática do oócito já apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes, e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária. Como em folículos primordiais, é possível observar mitocôndrias arredondadas e, com o desenvolvimento folicular, estas se tornam alongadas pelo aumento do metabolismo celular (Lucci et al., 2001). Em caprinos, esses folículos possuem o diâmetro de, aproximadamente, 49,8 μm (Bezerra et al., 1998).

Com a proliferação das células da granulosa, ocorre a formação do folículo secundário, que é caracterizado por possuir um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica (Silva, 2005), com as quais o oócito mantém íntimo contato. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica, e as organelas movem-se para a periferia. Ocorre um aumento da extensão de retículo endoplasmático liso, e a grande maioria das mitocôndrias apresenta-se alongada. Com o desenvolvimento dos folículos, também aumenta o número de microvilos, e a zona pelúcida já pode ser identificada com evidência (Parrot e Skinner, 1999). Nessa fase, inicia-se a formação das células da teca externa a partir do estroma intersticial (Van Den Hurk e Zhao, 2005). As células da teca interna são definidas quando os folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa (Lucci et al., 2001). Em caprinos, os pequenos folículos secundários têm diâmetro de, aproximadamente, 83 μm (Bezerra et al., 1998).

Folículos antrais

À medida que o folículo se desenvolve e há uma intensa proliferação das células da granulosa, uma área preenchida por fluido folicular denominada antro começa a se formar. A partir desse estágio, os folículos passam a ser denominados de antrais. O fluido antral é um composto rico em substâncias reguladoras derivadas do sangue ou secreções das células foliculares, como, por exemplo, gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento. A produção desse fluido é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e pela permeabilidade dos vasos sanguíneos (Van Den Hurk e Zhao, 2005) que ocorrem com o desenvolvimento do folículo. O início da formação de antro em caprinos é observado quando os folículos possuem cerca de 130 μm (Monniaux et al., 1993). Nos folículos antrais, as células da teca sofrem alterações morfológicas e funcionais, e aquelas células localizadas próximas da membrana basal são denominadas teca interna, enquanto as localizadas periféricamente são classificadas como teca externa. As células da granulosa são diferenciadas em células do *cumulus* (próximas ao oócito) e células murais.

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase dependente de gonadotrofinas, as quais irão desencadear os mecanismos de crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (Van Den Hurk e Zhao, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e a formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade. Além das gonadotrofinas, peptídeos sintetizados localmente desempenham papel-chave na regulação da fase antral, tanto por meio de mecanismos parácrinos como endócrinos (Fortune, 2003).

População e atresia folicular

O número de folículos por ovário varia entre espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (Shaw et al., 2000); 35.000 na cabra (Lucci et al., 1999); 160.000 na ovelha (Driancourt, 1991); 235.000 na vaca (Betteridge et al., 1989) e, aproximadamente, 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986). Apesar da grande população folicular presente no ovário mamífero, a quase totalidade dos folículos (99,9%) não chega à ovulação, morrendo por um processo natural denominado atresia, o qual ocorre por via degenerativa e/ou apoptótica (Figueiredo et al., 2008). Mesmo sendo um fenômeno natural, a atresia reduz significativamente o número de oócitos que seriam ovulados, diminuindo, assim, o potencial reprodutivo das fêmeas. A atresia, independente da via em que ocorre, é um processo que pode acometer qualquer estágio do desenvolvimento folicular, sendo, no entanto, predominante na fase antral. Além de ser regulada principalmente por fatores endócrinos, como o FSH e o Hormônio Luteinizante (LH), fatores parácrinos, incluindo KL, IGF-1, EGF, FGF-2, ativina e interleucina-1 β (IL-1 β), também influenciam no processo de morte celular nos diferentes estágios foliculares. Desta forma, é provável que o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem à atresia decidirá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (Hsu e Hsueh, 2000).

Uma das principais causas de atresia por degeneração é a ocorrência de isquemia em que a falha no fornecimento de oxigênio e nutrientes para o ovário provoca a morte celular. Já a atresia por apoptose é um processo de morte celular individual e ativo, caracterizado pela fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (Rachid et al., 2000), sendo um processo altamente dependente da expressão gênica, em que o desbalanço entre os genes pró e antiapoptóticos determinam a morte celular (Hurwitz e Adashi, 1992).

Visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e antrais que possibilitam o estudo dos fatores que controlam a atresia e o crescimento folicular.

Modelos *in vitro* para o estudo da foliculogênese inicial

Diferentes sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos para manter a viabilidade e promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* (Van Den Hurk et al., 2000). Nesses sistemas de cultivo *in vitro*, os folículos ovarianos podem ser cultivados dentro do próprio tecido ovariano (cultivo *in situ*) ou na forma isolada. Em roedores, devido à pequena dimensão da gônada feminina, os ovários são cultivados por inteiro no meio (Fortune, 2003). Por outro lado, em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, alguns autores têm realizado o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, com o objetivo de estudar a ativação folicular e o posterior crescimento de folículos primários (bovinos: Braw-Tal e Yossefi, 1997; humanos: Zhang et al., 2004; caprinos: Martins et al., 2008). Além da praticidade, o cultivo de fragmentos de córtex ovariano tem a vantagem de manter o contato entre as células foliculares e as do estroma ovariano (Abir et al., 2006).

Os métodos de isolamento mecânico, enzimático ou a associação de ambos têm sido muito utilizados para isolar um grande número de folículos intactos primários e/ou secundários de ovários de diferentes espécies para posterior cultivo *in vitro* (cabras: Lucci et al., 1999; ovelhas: Cecconi et al., 1999; vacas: Figueiredo et al., 1995, ratas: Zhao, 2000; camundongas: Lenie et al., 2004, Pesty et al., 2007). O cultivo de folículos isolados apresenta como vantagens permitir o acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de favorecer a maior perfusão do meio para o folículo (Abir et al., 2006). Os folículos isolados podem ser cultivados diretamente sobre o suporte de plástico (placa de cultivo), sobre uma matriz de colágeno ou incluso em gotas de colágeno (Demeestere et al., 2005).

Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Um considerável progresso já tem sido observado com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de diferentes espécies. O resultado mais satisfatório foi obtido por O'Brien et al. (2003), os quais mostraram que é possível obter crias viáveis a partir do cultivo de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de camundongas. Já nas demais espécies, ainda não houve nenhum relato de nascimento. A produção de embriões oriundos de oócitos derivados de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* foi relatada em ratas (Daniel et al., 1989), porcas (Wu et al., 2001a, b) e, recentemente, em búfalas (Gupta et al., 2008). Em outras espécies domésticas, observou-se apenas o desenvolvimento até o estágio antral a partir do cultivo de grandes folículos secundários (ovinos: Cecconi et al., 1999; bovinos: Gutierrez et al., 2000; caprinos: Huamin e Yong, 2000), valendo ressaltar que, na espécie ovina, já foi relatada a maturação nuclear de oócitos oriundos de folículos pré-antrais (Tamilmani et al., 2005). Essa dificuldade de alcançar nascimento após o cultivo de folículos pré-antrais oriundos de animais domésticos pode ser devido a alguns fatores como: 1) a foliculogênese em animais de laboratório tem a duração bem inferior (21 dias) a de animais domésticos, como, por exemplo, nos bovinos (cerca de seis meses; Lussier et al., 1987); 2) a dificuldade na obtenção dos ovários de animais domésticos tem atrasado as pesquisas; 3) em

roedores, trabalha-se com animais pertencentes à mesma linhagem, sendo os resultados mais homogêneos. Além disso, o ambiente em que os animais ficam alojados possibilita um melhor controle com relação à temperatura, umidade e alimentação quando comparado ao de animais domésticos. Desta forma, o sucesso na obtenção de oócitos de boa qualidade após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ainda é limitado, especialmente em ruminantes, sendo necessários mais esforços para melhorar as condições de cultivo.

Papel do FSH na reprodução de mamíferos

Controle endócrino do ciclo estral de ruminantes e do ciclo menstrual

Os ciclos estral e menstrual são regulados por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, principalmente pelos hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas e os esteróides secretados pelos ovários. Dependendo das concentrações na corrente circulatória, os hormônios esteróides podem exercer uma retroalimentação positiva ou negativa. O aumento na concentração de estrógenos circulantes tem efeito de retroalimentação positiva sobre o hipotálamo, induzindo a uma onda repentina de liberação de GnRH, acompanhada pela onda pré-ovulatória de LH e FSH secretados pela hipófise. As ondas pré-ovulatórias de LH e FSH duram de seis a 12 horas e são responsáveis pela ovulação (Hafez, 1995).

Ciclo estral em ruminantes

As fêmeas das espécies ruminantes são poliéstricas, apresentando estro em intervalos regulares (Sirois e Fortune, 1988). Durante o ciclo estral, ocorre uma cadeia de eventos que se repetem até o impedimento da luteólise pela gestação. Esse ciclo é dividido em fase luteínica ou progesterônica, que vai da ovulação até a luteólise, compreendendo o metaestro e o diestro, e em fase folicular ou estrogênica, que se estende do proestro ao estro, compreendendo o período que vai desde a luteólise até a ovulação. A fase folicular consiste no período em que ocorre o crescimento folicular sob baixas concentrações plasmáticas de progesterona e alta pulsatilidade de FSH e LH (após o fenômeno da luteólise), culminando na ovulação. Já a fase luteínica consiste no crescimento folicular, sob maiores concentrações plasmáticas de progesterona secretada pelo corpo lúteo, levando ao crescimento e à atresia dos folículos (onda de crescimento folicular) devido à diminuição da pulsatilidade e à ausência do pico de LH. Na fase luteínica plena, o FSH tem seu nível mais baixo (basal; Macmillan e Burke, 1996).

O ciclo estral em ruminantes é caracterizado pelo desenvolvimento dos folículos em ondas (Savio et al., 1988). Cada onda folicular é dividida em 4 fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação (Diskin et al., 2002). Um aumento nas concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular. Desse grupo de folículos, um é selecionado e adquire capacidade ovulatória, enquanto os folículos subordinados entram em atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e desempenha um papel ativo na supressão do crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina por meio de retroalimentação negativa sobre a hipófise (Fortune, 1994). Com o auxílio da ultrassonografia, foi possível observar a existência, predominantemente, de duas ou três ondas de desenvolvimento folicular em *Bos indicus* (Figueiredo et al., 1997), e três a quatro ondas em caprinos e ovinos (Amorin et al., 2007).

Ciclo menstrual

O ciclo menstrual é hormonalmente semelhante ao ciclo estral em animais. Em mulheres, o crescimento folicular se dá em ondas foliculares. Estudos realizados por Baerwald et al. (2003) mostraram que, de 50 mulheres avaliadas, 34 apresentavam o ciclo com duas ondas foliculares e apenas 16 apresentavam três ondas. O ciclo menstrual é caracterizado pela menstruação, que é um sangramento uterino episódico com intervalos de aproximadamente quatro semanas. Esse evento ocorre durante toda a vida reprodutiva da mulher. Não havendo fecundação do óvulo expelido pelo ovário, ocorrerá uma queda brusca dos níveis de estrógenos e progesterona no sangue. Em consequência, o endométrio, que estava desenvolvido pelo estímulo desses hormônios, entra em colapso, sendo parcialmente destruído. O sangue da menstruação é principalmente de origem venosa, pois as artérias, ao se romperem, contraem suas paredes, fechando a extremidade rompida (Pache et al., 1990). O período entre o estágio de folículo primário até o pré-ovulatório em humanos é de 85 dias, sendo a maioria desse tempo independente da ação de gonadotrofinas. Entretanto, a partir de um determinado momento, a presença de FSH se torna essencial para que os folículos recrutados continuem o crescimento e aquele selecionado, atinja a ovulação (Gougeon, 1981).

Caracterização da estrutura do FSH e expressão de seus receptores no ovário

O FSH desempenha um papel fundamental na regulação das funções gonadais, sendo produzido e

secretado pela glândula hipófise como uma glicoproteína de elevada heterogeneidade (Ulloa-Aguirre et al., 1995). Essa gonadotrofina é indispensável para o desenvolvimento e a maturação das gônadas na puberdade e para a produção de gametas durante a fase fértil da vida, além de ser implicada na manifestação do estro e da ovulação. As ações do FSH são mediadas nas células somáticas ovarianas e testiculares por receptores específicos da superfície celular (Minj et al., 2008).

O FSH atua se ligando a receptores localizados exclusivamente nas gônadas. Esse receptor é do tipo acoplado à proteína G, o qual é dividido em três domínios: um extracelular, um transmembranário, composto por sete hélices hidrofóbicas que ancoram o receptor no plasmalema, e um domínio intramembranário (Gudermann et al., 1995). O domínio intracelular do receptor do FSH (C-terminal) é acoplado a uma proteína G e, após a ativação do receptor pela interação hormonal com o domínio extracelular (N-terminal), inicia-se uma cascata de eventos que culmina com efeitos biológicos específicos da gonadotrofina (Simoni et al., 1997).

Vários estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular confirmaram a expressão de receptores para FSH nas células da granulosa (Camp et al., 1991; Tilly et al., 1992b; Tisdal et al., 1995; Zheng et al., 1996). Méduri et al. (2002) detectaram também a presença desses receptores em oócitos de folículos suíno e humano. A aquisição de receptores para FSH é fundamental para a diferenciação das células da granulosa e para a maturação folicular (Adashi, 1994). Em ratas adultas sexualmente maduras e em humanos, o receptor para FSH foi observado em folículos com pelo menos uma camada de células da granulosa de formato cúbico (Camp et al., 1991; Oktay et al., 1997). Além disso, a expressão do receptor para 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 ideia da ação do FSH sobre o crescimento dos folículos pré-antrais (Roy, 1993). Ademais, outros autores têm relatado que a atresia folicular está associada com a diminuição da responsividade ao FSH e com níveis reduzidos do RNAm do seu receptor, devido a uma inibição da transcrição ou a uma diminuição da estabilidade do RNAm do receptor (Tisdal et al., 1995; Xu et al., 1995; Tilly et al., 1992a).

Origens do FSH comercial

Comercialmente, o FSH pode ser extraído por meio de: 1) urina de mulheres na pós-menopausa e filtragem em gel, constituindo a gonadotrofina da menopausa humana (*human Menopausal Gonadotropin* - hMG), 2) FSH urinário altamente purificado (FSHu), 3) extrato hipofisário de animais domésticos, principalmente suínos (FSHp) e ovinos (FSHo), seguido da purificação do hormônio, bem como 4) da tecnologia do DNA recombinante, utilizando-se células ovarianas de hamster, as quais se incorporam os genes que codificam as duas subunidades do FSH (Le Cotonnee et al., 1994; Calder et al., 2003), produzindo o FSH recombinante (FSHr). Com o uso da tecnologia recombinante, tem se conseguido uma molécula de FSH cada vez mais purificada, o que constitui um avanço farmacológico. Antigamente, a separação do FSH de LH era realizada utilizando-se anticorpos antigonadotrofina coriônica humana (*human Corionic Gonadotropin* - hCG), que causavam absorção do LH, deixando o FSH livre (FSHu; Domini et al., 1966).

Embora alguma atividade de LH nas preparações de gonadotrofina exógena otimize a indução da ovulação em pacientes com alterações da ovulação e naquelas submetidas à reprodução assistida (Filicori et al., 1998), as preparações mais puras de FSH possuem uma melhor eficácia nos resultados de crescimento folicular. Por exemplo, o hMG apresenta no mercado uma alta pureza, eliminando um grande número das proteínas contaminantes, melhorando, assim, a qualidade e a eficiência do produto. Além disso, desenvolvida no início dos anos 80, a tecnologia do DNA recombinante para produção de FSH tem sido utilizada com sucesso em programas de estimulação ovariana controlada na reprodução assistida em humanos. Apesar do custo ainda elevado, o FSHr possui como principal vantagem a produção de um hormônio mais puro e homogêneo (Calder et al., 2003), além de mais eficaz. Já o FSH extraído da hipófise, mesmo após a purificação, resulta em um produto final com um pequeno percentual de contaminação por outros hormônios hipofisários, tais como o LH, Hormônio Tireostimulante (TSH), prolactina e Hormônio do Crescimento (GH; Closset e Hennen, 1989).

Influência do FSH na reprodução animal in vivo e in vitro e importância do FSH na superovulação de animais domésticos

No que se refere à reprodução animal *in vivo*, o FSHr não tem sido utilizado, devido ao custo elevado. As drogas atualmente mais utilizadas são Folltropin[®], Stimulfol[®], Pluset[®] (FSHp), Ovagen[®] (FSHo) e Urofolitropina (FSHu). Cada um desses fármacos contém um grau de pureza de FSH diferente, porém todos são eficientes na função desse hormônio, que é estimular o desenvolvimento folicular. O FSH é utilizado *in vivo* para a superovulação de animais domésticos em programas de transferência de embriões.

Estudos têm demonstrado que o Folltropin[®] promove resultados satisfatórios (altas taxas de gestação) em protocolos de superovulação e transferência de embriões em diferentes espécies de ruminantes domésticos (ovina: Cognie, 1999; caprina: Baldassarre e Karatzas, 2004; bovina: Bényei e Barros, 1999). Além disso, Beckers (1987) mostrou que a redução da quantidade de LH nas preparações comerciais de gonadotrofinas (FSH/LH: 12,5) está correlacionada com uma redução no número de embriões bovinos recuperados por doadora,

embora a qualidade embrionária tenha sido melhorada. Em outro estudo, McNatty et al. (1989) compararam a eficiência do Ovagen[®] e do Foltropin[®] em protocolos de superovulação e recuperação embrionária em cabras e observaram que não houve diferença entre as duas preparações de FSH e que ambas resultaram em mais de cinco embriões recuperados por doadora. Após superovulação em caprinos utilizando-se o Pluset[®], Andrioli et al. (1999) constataram que a repetição dos tratamentos superovulatórios fez diminuir a taxa de manifestação de sintomas de estro, porém não afetou a taxa de ovulação e reduziu a taxa de corpos lúteos regredidos. Recentemente, um estudo comparou o Pluset[®] e o Foltropin[®] em dose única na superovulação de bovinos. Os autores verificaram que essas duas preparações comerciais de FSH não afetam de forma diferenciada a resposta ovariana nem a qualidade de embriões de vacas em boa condição corporal (Alvarez et al., 2006).

Importância do FSH no início do crescimento folicular, formação da cavidade antral e proliferação das células da granulosa

Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o FSH inibe a apoptose e promove o crescimento folicular inicial. Em camundongas, foi demonstrado que o FSH inibe a apoptose em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (Baker e Spears, 1997). Estudos realizados por Silva et al. (2004) demonstraram que o FSHp, na concentração de 100 ng/mL, promoveu um aumento dos diâmetros oocitário e folicular, entretanto não exibiu efeito sobre a ativação e a viabilidade de folículos pré-antrais caprinos. Já na concentração de 50 ng/mL, o FSHp manteve a integridade morfológica de folículos pré-antrais após cultivo de tecido ovariano caprino por sete dias, além de estimular a ativação de folículos primordiais e o posterior crescimento folicular (Matos et al., 2007). Recentemente, Magalhães et al. (2009) demonstraram que, quando comparado com o FSHp, o FSHr promoveu maior ativação folicular durante sete dias de cultivo *in vitro*. Por outro lado, o FSH não afetou o diâmetro folicular e oocitário, bem como o número de células da granulosa durante cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos (Braw-Tal e Yossefi, 1997). Além disso, a adição de 5 ng/ml (Derrar et al., 2000), bem como de 1, 10 ou 100 ng/ml de FSH, não demonstrou efeito sobre os folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* por sete a 14 dias (Fortune et al., 1998). Outros autores mostraram que o crescimento de folículos primários é criticamente dependente ou exige uma adequada concentração de FSH (Qvist et al., 1990). Alguns trabalhos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como KL, GDF-9 e BMP-15, que têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (Joyce et al., 1999; Thomas et al., 2005). Embora os receptores de FSH não estejam presentes em folículos primordiais, o FSH parece exercer um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial por meio da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (Van Den Hurk e Zhao, 2005).

Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o FSH pode promover a formação de antro a partir do cultivo de folículos secundários avançados (camundongas: Spears et al., 1998; vacas: Gutierrez et al., 2000; cabras: Zhou e Zhang, 2005; ovelhas: Cecconi et al., 1999). Outros estudos demonstraram que o FSH recombinante, quando comparado ao FSH urinário, induz a uma melhor proliferação das células da granulosa (Calongos et al., 2007) e a uma maior produção de estradiol (Yding et al., 1999) em folículos pré-antrais (FOPA) murinos, provavelmente devido a uma maior afinidade na ligação com seus receptores. Contrariamente aos efeitos benéficos do FSH no desenvolvimento folicular *in vitro*, Nuttinck et al. (1996) mostraram que o pFSH (0,43 pg FSH/pg proteínas) induz à degeneração em pequenos folículos pré-antrais bovinos. As diferenças entre esses estudos podem ser devido às diferentes espécies estudadas, metodologias, à origem e ao grau de pureza do FSH utilizado, bem como às concentrações desse hormônio.

Influência do FSH na reprodução humana e papel do FSH na reprodução humana medicalmente assistida

As técnicas de reprodução assistida pertencem, basicamente, a duas modalidades: aquelas em que se introduz no aparelho reprodutor da mulher o esperma, denominada inseminação artificial (IA), e a fecundação *in vitro* (FIV), na qual o óvulo e o esperma são colocados em contato *ex situ* e posteriormente os embriões formados são introduzidos no aparelho reprodutor da futura mãe. Essas duas diferentes formas de fecundação são as alternativas médicas adotadas quando há dificuldade na fecundação pós-cópula.

As taxas de gestação alcançadas na fecundação *in vitro* se devem, em parte, à estimulação ovariana, que tem como finalidade a obtenção de um maior número de folículos recrutados e, conseqüentemente, um maior número de óvulos maduros que serão fecundados e produzirão um maior número de embriões transferidos por ciclo. Dessa forma, dentre as diversas drogas que têm sido utilizadas para esse objetivo, as gonadotrofinas são as que merecem um maior destaque.

Há mais de 30 anos, as gonadotrofinas são utilizadas na reprodução assistida em humanos. Lunenfeld et al. (1960) relataram, pela primeira vez, uma gravidez obtida após a estimulação ovariana com hMG. Além disso, alguns estudos têm sido realizados com a finalidade de comparar a influência das preparações comerciais do FSH na reprodução medicalmente assistida em humanos, porém seus resultados são controversos. A diferença entre essas preparações está fundamentada na pureza do hormônio, sendo seu mecanismo de ação, indicações e contraindicações semelhante em todos os casos. Entretanto, quando se utiliza um FSH mais puro, ocorre uma

melhoria na esteroideogênese folicular e uma relação andrógeno-estrógeno mais adequada no líquido folicular (Agarwal et al., 2000). Embora a maioria dos estudos aponte o FSHr como o mais eficaz devido à ausência de contaminação por LH, recentemente, Kolibianakis et al. (2006) verificaram que baixos níveis de LH endógeno não estão associados à redução da taxa de gestação, porém altos níveis de LH estavam associados à diminuição dessa taxa.

A maioria dos estudos mostram uma maior eficácia do FSHr quando comparado ao urinário e ao hMG. Daya et al. (1995) observaram que, em um procedimento de fecundação *in vitro*, o uso de FSHr foi associado a uma maior taxa de gestação quando comparado ao hMG. Da mesma forma, outros autores compararam o FSHu com o FSHr e verificaram melhores resultados no número de oócitos recuperados e uma menor quantidade de gonadotrofina administrada quando o FSHr foi utilizado (Raga et al., 1999; De Placido et al., 2000). Por outro lado, quando se utilizaram mulheres com idade reprodutiva avançada (em média 39 anos), o FSHu foi mais adotado do que o FSHr, devido ao menor custo, já que os resultados dos dois foram equivalentes (Mohamed et al., 2006). Além disso, quando comparado ao FSHr, o hMG resultou em um aumento significativo de 4% na taxa de nascimento (Coomarasamy et al., 2008). Essas diferenças talvez sejam devido à alta heterogeneidade dos pacientes analisados (por exemplo, diferentes idades e motivos que levaram à realização da fecundação *in vitro*) e à dose de FSH utilizada.

Importância do FSH no cultivo in vitro de folículos pré-antrais humanos

No tocante ao cultivo de folículos pré-antrais humanos, poucos são os trabalhos existentes devido à reduzida disponibilidade dos ovários e à questão ética. Alguns autores demonstraram que o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais cultivados na presença de FSH indicam a importância dessa gonadotrofina no desenvolvimento folicular inicial (Roy e Treacy, 1993). Além disso, sabe-se que o FSH é requerido para que os folículos primordiais cresçam até o estágio de secundário, embora o crescimento inicial seja independente da estimulação por gonadotrofinas (Oktay et al., 1997). Após cultivo com folículos pré-antrais humanos, observou-se que o FSH atua como um fator de sobrevivência folicular e aumenta o diâmetro folicular, sugerindo que esse hormônio tem efeito antiapoptótico e mitogênico (Wright et al., 1999). Ota et al. (2002) também observaram que, em um cultivo de folículos pré-antrais contendo FSH com duração de três semanas, houve um aumento no percentual de folículos atresícos com relação ao controle não cultivado, porém 37% de folículos primários e 2% de secundários permaneciam viáveis. Além disso, não foi encontrado nenhum folículo primordial após a terceira semana de cultivo, sugerindo a ocorrência de desenvolvimento folicular. Alguns autores cultivaram fragmentos de córtex ovariano na presença de FSH durante seis semanas e verificaram que, ao final do período de cultivo, houve um percentual significativo de folículos secundários, e 99% dos folículos apresentavam-se com a estrutura intacta. A ocorrência de mitoses nas células da granulosa confirmou que houve divisão celular durante o cultivo (Rahimi et al., 2001).

Considerações finais e perspectivas

O FSH desempenha uma função essencial na estimulação do desenvolvimento folicular, principalmente na fase antral. Entretanto, na fase pré-antral, esse hormônio atua indiretamente, estimulando a expressão de fatores de crescimento que são importantes para a foliculogênese inicial. *In vivo*, essa gonadotrofina tem sido largamente utilizada em programas de superovulação, IA e fecundação *in vitro* em animais domésticos e humanos. Além disso, nos últimos anos, várias pesquisas desenvolvidas em diferentes laboratórios demonstraram a importância do FSH no início do crescimento folicular, na proliferação das células da granulosa, na formação do antro, bem como na inibição da atresia folicular. Entretanto, os resultados da aplicabilidade desse hormônio, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm sido controversos, o que pode ser parcialmente devido às diferentes preparações comerciais de FSH utilizadas.

Em conclusão, o FSH desempenha um papel essencial na reprodução e na fertilidade de mamíferos. Portanto, mais pesquisas são necessárias para uma melhor compreensão do efeito das diferentes preparações comerciais de FSH na foliculogênese, resultando, assim, em um avanço biotecnológico de grande importância para a reprodução medicalmente assistida, tanto em animais domésticos como em humanos.

Referências bibliográficas

- Abir R, Nitke S, Ben-Haroush A, Fisch B.** In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. Review. *Histol Histopathol*, v.21, p.887-898, 2006.
- Adashi EY.** Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod*, v.9, p.815-827, 1994.
- Agarwal R, Holmes J, Jacobs HS.** Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in *in vitro* fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril*, v.73, p.338-343, 2000.
- Alvarez RH, Pires RML, Martinez AC.** Resposta Ovariana e Produção de Embriões de Vacas Superovuladas

- com Pluset ou Folltropin em Dose Única Subcutânea. *Acta Sci Vet*, v.34, suppl.1, 2006.
- Amorim EAM, Torres CAA, Amorim LS, Fonseca JF, Bruschi JH, Guimarães JD, Carvalho GR, Alves NG, Cecon PR.** Follicular dynamics of lactating Toggenburg does treated with recombinant bovine somatotropin. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.1500-1508, 2007.
- Andrioli A, Simplicio AA, Soares AT, Visintin JA.** Efficiency and effect of consecutive embryo recoveries on the reproductive system of goat donors. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.36, p.1-16, 1999.
- Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA.** Characterization of Ovarian Follicular Wave Dynamics in Women. *Biol Reprod*, v.69, p.1023-1031, 2003.
- Baker SJ, Spears N.** Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles *in vitro*. *J Reprod Fertil Abstr Ser*, n.19, p.21, 1997.
- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.255-66, 2004.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*, v.12, p.537-55, 2006.
- Beckers JF.** Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle. *Theriogenology*, v.27, p. 213, 1987.
- Bényei B, Barros CCW.** Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importado de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.52, p.366-371, 1999.
- 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.
- Bezerra MB, Rondina D, Oliveira LC, Lima AKF, Cecchi R, Lucci CM, Giorgetti A, Figueiredo JR.** Aspectos quantitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. *Ciênc Anim*, v.8, p.30-41, 1998.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.109, p.165-171, 1997.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ.** Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol*, v.14, p.1-12, 2003.
- Calongos G, Hasegawa A, Komori S, Koyama K.** Comparison of urinary and recombinant follicle stimulating hormone *in vitro* growth, maturation and fertilization of mouse preantral follicles. *Fertil Steril*, v.89, suppl.5, p.1482-1489, 2008.
- Camp TA, Rahal JO, Mayo KE.** Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol*, v.5, p.1405-1417, 1991.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M.** *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- Closset J, Hennen G.** Biopotency of highly purified porcine FSH and human LH on gonadal function. *J Endocrinol*, v.120, p.89-96, 1989.
- Cognie Y.** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D, Van Der Veen F, Bossuyt PMM, Van Wely M.** Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*, v.23, p.310-315, 2008.
- Cortvriendt R, Smitz JEJ.** *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.3-9, 2001.
- Daniel SAJ, Armstrong DT, Gorelangton RE.** Growth and development of rat oocytes *in vitro*. *Gamete Res*, v.24, p.109-121, 1989.
- Daya S, Gunby J, Hughes EG.** Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for *in vitro* fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril*, v.73, p.517-520, 1995.
- De Placido G, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Varricchio MT, Molis M.** Recombinant follicle stimulating hormone is effective in poor responders to highly purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, v.15, p.17-20, 2000.
- Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A.** Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, v.130, p.147-157, 2005.
- Derrar N, Price CA, Sirard MA.** Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. *Theriogenology*, v.54, p.587-598, 2000.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF.** Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol*, v.23, p.211-228, 2002.
- Domini P, Puzzooli D, Dialessio J. et al.** Purification and separation of FSH and LH from human postmenopausal gonadotropin. Preparation of biological apparently pure FSH by selective binding of the LH with anti-HCG serum and subsequent chromatography. *Acta Endocrinol*, v.52, p.169-174, 1966.

- Driancourt MA.** Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v.35, p.55-63, 1991.
- Erickson GF.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, v.4, p.233-254, 1986.
- Figueiredo JR, Hulshof SC, Thiry M, Van Den Hurk R, Bevers MM, Nusgens B, Beckers JF.** Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. *Theriogenology*, v.5, p.845-858, 1995.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.303-327.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Sole JMP.** Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- Filicori M, Tabare C, Casadio P, Ferlini F, Gessa G, Pocognoli P, Cognigni G, Pecorari R.** Interaction between menstrual cyclicity and gonadotropin pulsatility. *Horm Res*, v.49, p.169-172, 1998.
- Fortune JE.** Ovarian follicular growth and development in mammal. *Biol Reprod*, v.50, p.225-232, 1994.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.
- Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srsen V.** Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. *Theriogenology*, v.49, p.441-449, 1998.
- Gordon I.** Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p.43-49.
- Gougeon A.** Rate of follicular growth in the human ovary. In: Reinier De Graaf Symposium, 4, 1981, Amsterdam. *Proceedings ... Amsterdam: Excerpta Medica*, 1981.
- Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G.** Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*, v.73, p.51-63, 1995.
- Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.
- 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.
- Hafez ESE.** *Reprodução animal*. 6ª ed. São Paulo: Manole, 1995. p.319-333.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v.124, p.43-101, 1991.
- Hsu SY, Hsueh AJ.** Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev*, v.80, p.593-614, 2000.
- Huamin Z, Yong Z.** *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.
- Hurwitz A, Adashi EY.** Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol Cell Endocrinol*, v.84, p.19-23, 1992.
- Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ.** Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev Biol*, v.214, p.342-353, 1999.
- Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis B, Papanikolaou E, Devroey P.** Are endogenous LH levels during ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues associated with the probability of ongoing pregnancy? A systematic review. *Hum Reprod Update* v.12, p.3-12, 2006.
- Le Cotonnee JY, Purchet H, Beltramiv et al.** Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH). Comparative pharmacokinetics with urinary humana FSH. *Fertil Steril* v.61, p.669-678, 1994.
- Lee VH.** Expression of rabbit zona pellucida. 1. Messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biol Reprod*, v.63, p.401-408, 2000.
- Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens, Smits J.** A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biol Reprod*, v.71, p.1730-1738, 2004.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva J.R, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Lucci CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo R, Bão N.** Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin Res*, v.41, p.61-69, 2001.
- Lunefeld B, Menzi A, Volet B.** Clinical effects of human postmenopausal gonadotropin. *Rass Clin Ter Sci Affini*, v.59, p.213-217, 1960.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ.** Growth rates on follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil*, v.81, p.301-307, 1987.
- Macmillan KL, Burke CR.** Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.307-320, 1996.
- Magalhães DM, Araujo VR, Lima-Verde IB, Matos MHT, Silva RC, Lucci CM, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR.** Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Anim Reprod*, v.6, p.212, 2009. (abstract).

- Mao J, Wu G, Smith MF, Mccauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. *Biol. Reprod.* v.67, p.1197-1203, 2002.
- Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha Jr CMC, Lima-Verde IB, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR. Growth and Differentiation Factor -9 stimulates goat primordial follicles activation *in vitro* and the progression to secondary follicles. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.916-924, 2008.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia Jr JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão SN, Lucci CM, Figueiredo JR. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v.15, p.173-182, 2007.
- McGee E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, v.138, p.2417-2424, 1997.
- McNatty KP, Hudson NL, Ball K, Mason A, Simmons MH. Superovulation and embryo recovery in goats treated with Ovagen and Folltropin. *NZ Vet J*, v.37, p.27-29, 1989.
- Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Migrom E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.2266-2276, 2002.
- Minj A, Mondal S, Tiwari AK, Sharma B, Varshney VP. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Gen Comp Endocrinol*, v.158, p.147-153, 2008.
- Mohamed AMD, Sbracia MMD, Pacchiarotti AMD, Micara GBS, Linari ABS, Tranquilli DBS, Salomé MB, Espinola BS, Aragona CMD. Urinary follicle-stimulating hormone (FSH) is more effective than recombinant FSH in older women in a controlled randomized study. *Fertil Steril*, v.85, p.1398-1403, 2006.
- Monniaux D, Mariana JC, Cognié Y, et al. Controle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammifères domestiques. *Contracept Fertil Sex*, v.21, p.403-407, 1993.
- Nuttinck F, Collete L, Massip A. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigations. *Theriogenology*, v.45, p.1235-45, 1996.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v.68, p.1682-1686, 2003.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, v.82, p.3748-51, 1997.
- Otala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjöberg J, Suomalainen L, Suikkari AM, Pentikainen V, Dunkel L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Hum Reprod* v.8, p.228-236, 2002.
- Pache T, Wladimiroff J, Dejong F, Hop W, Fauser B. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril*, v.54, p.638-342, 1990.
- Parrot JA, Skinner MK. Kit ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.4262-4271, 1999.
- Pesty A, Miyara F, Debey P, Lefevre B, Poirot C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth *in vitro*. *Mol Hum Reprod*, v.13, p.3-9, 2007.
- Qvist R, Blackwell LF, Bourne H, Brown JB. Development of mouse ovarian follicles from primary to ovulatory stages *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.89, p.169-180, 1990.
- Rachid MA, Vasconcelos AC, Nunes VA. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.52, 2000.
- Raga, F, Bonilla-Musoles F, Casan EM, Bonilla F. Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. *Hum Reprod*, v.14, p.1431-34, 1999.
- Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, Wartenberg M, Isachenko V, Hescheler J, Mallmann P, Nawroth F. Measurement of apoptosis in long-term cultures of human ovarian tissue. *Reproduction*, v.122, p.657-663, 2001.
- Roy SK. Epidermal growth factor and transforming growth factor- β 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, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-90, 1993.
- Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kastertein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.85, p.1130-1141, 2006.
- Saumande J. La folliculogénèse chez les ruminants, *Rec Vét*, v.167, p.205-218, 1991.
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, v.83, p.663-671, 1988.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.

- Silva JRV.** Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. 2005. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, The Netherlands.
- 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, 2004.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E.** The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. *Endocr Rev*, v.18, p.739-773, 1997.
- Sirois J, Fortune JE.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by realtime ultrasonography. *Biol Reprod*, v.39, p.308-317, 1988.
- Spears N, Murray AA, Alisson V, Boland NI, Gosden RG.** Role of gonadotropins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.113, p.19-26, 1998.
- Tamilmani G, Rao BS, Vagdevi R, Amarnath D, Naik BR, Mutharao M, Rao VH.** Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. *Small Ruminant Res*, v.60, p.295-305, 2005.
- Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC.** Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, v.146, p.941-949, 2005.
- Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJW.** Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*, v.131, p.1670-1676, 1992a.
- Tilly JL, Lapolt PS, Hsueh AJ.** Hormonal regulation of follicle stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v.130, p.1296-1302, 1992b.
- Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP.** FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Endocrinol*, v.15, p.273-281, 1995.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley Jr AR, Beitins IZ, Padmanabhan V.** Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*, v.16, p.765-787, 1995.
- Van Den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update*, v.5, p.457-474, 2000.
- Van Den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF.** *In vivo* and *in vitro* development of follicles preantral. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 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.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS.** Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*, v.53, p.951-957, 1995.
- Zhang P, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Hreinsson J, Telfer EE, Hovatta O.** *In vitro* effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. *J Assist Reprod Genet*, v.21, p.301-306, 2004.
- Zhao J.** *Development of rat preantral follicles in vitro*. 2000. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, The Netherlands.
- Zheng W, Magid MS, Kramer EE, Chen YT.** Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol*, v.148, p.47-53, 1996.
- Zhou H, Zhang Y.** Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest Anim Endocrinol*, v.28, p.235-242, 2005.
- Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RML, Franks S, Hardy K.** Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Hum Reprod*, v.14, p.1555-1562, 1999.
- Wu J, Carrel DT, Wilcox AL.** Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*, v.65, p.1579-1585, 2001a.
- Wu J, Emery BR, Carrel DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Bio. Reprod*, v.64, p.375-381, 2001b.
- Yding C, Leonardsen L, Ulloa-Aguirre A, Barrios-De-Tomasi J, Moore L, Byskov A.** FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. *Mol Hum Reprod*, v.5, p.726-731, 1999.