

CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS: PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS REGULADORAS, VIAS DE SINALIZAÇÃO E AVANÇOS NAS ESPÉCIES MURINA, BOVINA, OVINA E CAPRINA

(In vitro culture of preantral follicles: main regulatory factors, signaling pathways and advances in murine, bovine, ovine and caprine)

Gerlane Modesto da SILVA^{1*}, Ivina Rocha BRITO¹, Valdevane Rocha ARAÚJO¹, José Roberto Viana SILVA², Ana Paula Ribeiro RODRIGUES¹, José Ricardo de FIGUEIREDO¹

¹Laboratório de Manipulação de Oócitos e folículos pré-antrais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - CE, Brasil.

²Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Universidade Federal do Ceará, Sobral - CE, Brasil

RESUMO

A regulação da foliculogênese é um processo complexo regulado por vários fatores intra e extraovarianos. A resposta das células ovarianas ao estímulo produzido por esses fatores depende da transdução de sinais no interior das células através de várias vias de sinalização. A interação entre as diversas vias de sinalização celular e a descoberta constante de novas vias demonstram a complexidade desse processo. A presente revisão se propõe a descrever os principais fatores reguladores da foliculogênese, seus receptores e as vias de sinalização celular destacando pontos de interação entre elas. Em adição, uma análise crítica dos principais resultados obtidos com o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos murinos, bovinos, caprinos e ovinos levando-se em consideração as substâncias presentes nos meios de cultivo utilizados e as prováveis vias de sinalização celular empregadas é apresentada na presente revisão.

Palavras-chave: Foliculogênese, receptores, sinalização celular.

ABSTRACT

Folliculogenesis is regulated by a complex process, which involves several intra- and extra-ovarian factors. The response of the ovarian cells to those factors depends on the signal transduction inside the cells through several signaling pathways. The interaction of different signaling pathways and discovery of new pathways demonstrate the complexity of folliculogenesis. Therefore, this review will highlight the main regulatory factors that control folliculogenesis, their receptors and sharing signaling pathways. Moreover, a critical analysis about the main results from *in vitro* follicle culture studies in murine, bovine, caprine, and ovine, focusing on the medium supplements and the interactions of their signaling pathways will be presented.

Key-words: Folliculogenesis, receptors, cell signaling.

*Endereço para correspondência:
gerlanems@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A resposta celular a estímulos externos como nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e estresse, requer a propagação de sinais correspondentes através de vias moleculares de sinalização (Zielinski et al., 2009). O desenvolvimento de folículos ovarianos *in vitro* e a elucidação da foliculogênese podem ser beneficiados pelo conhecimento molecular dessas vias. A intervenção terapêutica através do uso de anticorpos específicos para receptores ou compostos de baixo peso molecular que interfiram na ativação de moléculas sinalizadoras podem promover a sobrevivência, a proliferação e a maturação dos folículos ovarianos. Além disso, o conhecimento em nível molecular dos constituintes das vias de sinalização celular acompanhado do esclarecimento dos sistemas de redes de sinalização celular pode ainda contribuir para a elucidação da foliculogênese.

Apesar dessas perspectivas, e das moléculas dessas vias de sinalização já serem conhecidas, o entendimento das redes de sinalização é incipiente e descrições cada vez mais precisas dos diversos mecanismos de sinalização são acompanhados da reconstrução de cada vez mais vias e mais redes de interação entre elas (Herskowitz, 1995; Hunter, 2000). Isso ocorre devido a complexidade dessas vias de sinalização celular que não são vias isoladas de informação, mas sim interagem de várias maneiras formando redes sofisticadas de informação que respondem a diversos estímulos, muitas vezes opostos. Essa ligação pode envolver componentes que são comuns entre vias, bem como circuitos de feedback positivo e negativo (Hunter, 2000). Além disso, a resposta a um sinal depende da duração do limiar de ativação e do sinal (Marshall, 1995) adicionando ainda outro nível de complexidade ao sistema.

Dentre as principais vias estudadas atualmente destacam-se: adenilato ciclase, MAPK/Erk, PI3K/Akt, fosfolipase C, JAKS/STATS, SMADS e vias nucleares. Os fatores de crescimento e hormônios reguladores da foliculogênese atuam se ligando a diferentes tipos de receptores que ativam uma ou mais dessas vias levando a respostas relacionadas a ativação, sobrevivência, proliferação e maturação folicular.

A presente revisão fará uma discussão geral acerca dos principais fatores reguladores da foliculogênese, seus receptores e as vias de sinalização celular destacando pontos de interação entre elas. Por fim será feita uma análise dos principais resultados obtidos com o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos murinos, bovinos, caprinos e ovinos. Nesse tópico serão identificadas as vias de sinalização celular com base nas substâncias presentes no meio de cultivo e as interações dessas vias na tentativa de compreender melhor os resultados obtidos.

RECEPTORES DOS PRINCIPAIS FATORES EXTRA E INTRA-OVARIANOS ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE

a) Tipos de receptores

Os receptores são proteínas ou glicoproteínas presentes na membrana plasmática (transmembranários), na membrana das organelas ou no citosol celular (nucleares), que se unem especificamente as suas moléculas sinalizadoras (hormônios e fatores de crescimento), também denominadas ligantes. A união de uma molécula sinalizadora a seus receptores específicos desencadeia uma série de reações no interior das células, cujo resultado final depende não somente do estímulo recebido, mas de outros fatores, como a situação metabólica da célula, a presença de

patógenos, etc. Baseados na estrutura molecular e na natureza dos mecanismos de transdução de sinal com ativação de cascatas intracelulares, classicamente pode-se distinguir quatro tipos de receptores: 1) receptores acoplados a canais iônicos; 2) receptores acoplados à proteína G; 3) receptores acoplados a enzimas; 4) receptores nucleares (Leite et al., 2012), sendo os três últimos o foco desta revisão.

- **Receptores acoplados a canais iônicos**

Também conhecidos como receptores ionotrópicos, estes receptores estão envolvidos na rápida sinalização sináptica entre células nervosas e outras células-alvo eletricamente excitáveis, como células musculares (Leite et al., 2012).

- **Receptores acoplados à proteína G**

Todos os receptores acoplados à proteína G pertencem a uma grande família de proteínas que atravessam a membrana celular várias vezes. Esses receptores são compostos por um grande domínio extracelular N-terminal, sete domínios transmembranários e um domínio C-terminal intracelular acoplado à proteína G (Salesse et al., 1991; Dubocovich et al., 2010). A proteína G é uma GTPase formada por três subunidades designadas (pelo tamanho decrescente) α (alfa), β (beta) e γ (gama). A unidade α possui um sítio de ligação com o difosfato de guanossina (GDP) ou trifosfato de guanossina (GTP). A ativação dos receptores altera a conformação da proteína G, induzindo a troca de uma molécula de GDP por GTP no sítio catalítico localizado na subunidade $G\alpha$. Isso desencadeia a dissociação da subunidade $G\alpha$ (que está ligada ao GTP) do dímero $G\beta\gamma$ e do receptor. Ambas, $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$, podem então ativar diferentes cascatas de sinalização e proteínas efetoras (Fig. 1) (Hoelz et al., 2013).

Os hormônios foliculo estimulante (FSH), luteinizante (LH), tireotrófico (TSH) e a melatonina utilizam esse tipo de receptor. Apesar desses hormônios possuírem o mesmo tipo de receptor, a união dos ligantes ao domínio extracelular é específica para cada hormônio (Salesse et al., 1991). A localização dos seus receptores varia entre as categorias foliculares, seus tipos celulares e espécies animais conforme observado na Tab.1.

FSH

De forma geral os receptores de FSH (FSHR) já foram detectados em folículos pré-antrais em crescimento (primário e secundário) e folículos antrais em murinos, bovinos, caprinos e ovinos (Camp et al., 1991; Roy, 1993; Tisdall et al., 1995; Xu et al., 1995; Saraiva et al., 2010). Apesar da ligação do FSH ao seu receptor ser restrita às células da granulosa, estudos mais recentes demonstraram a presença destes receptores também em oócitos, sugerindo um efeito adicional do hormônio no ovário (Meduri et al., 2002; Barros et al., 2013).

LH

Os receptores para LH (LHR) já foram identificados em folículos pré-antrais em desenvolvimento em murinos, bovinos e caprinos e em folículos antrais também em ovinos (Xu et al., 1995; Gelety, Magoffin, 1997; Abdennebi et al., 1999; Saraiva et al., 2012). As células da granulosa adquirem seus próprios receptores para LH em meados da fase final de desenvolvimento folicular sob influência do FSH (Erickson e Hsueh, 1978), sendo predominantemente expressos na subpopulação de células murais (Peng et al., 1991). Além disso, sabe-se que as células da teca expressam receptores para LH (Adashi, 1994; Gougeon, 1996). Posteriormente, são encontrados receptores também nas células

luteínicas e do *cumulus* (MacFarland et al., 1989).

TSH

O receptor de TSH está localizado na glândula tireóide e sua ativação estimula a produção dos hormônios T3 e T4 a partir da tireoglobulina (Almeida, 2004). Estes últimos serão descritos posteriormente nessa revisão.

Melatonina

Em mamíferos, são descritos dois principais tipos de receptores de melatonina acoplados à membrana celular: MT1 e MT2. Em adição, foi relatada a existência de um terceiro receptor de melatonina, MT3, relacionado a locais de ligação nucleares (Vincent et al., 2010). Receptores para a melatonina já foram encontrados em folículos pré-antrais em crescimento e antrais em murinos e caprinos (Soares et al., 2003; Barros et al., 2013). No ovário, o RNAm para os receptores MT1 e MT2 foram identificados em células da granulosa ovarianas (Niles et al., 1999; Soares et al., 2003; Barros et al., 2013). Isto sugere que este hormônio pode ter uma ação sobre a esteroidogênese dessas células e sobre a função folicular (Webley et al., 1986; Tamura et al., 1998).

• **Receptores acoplados a enzimas**

Em geral esses receptores compartilham uma estrutura comum, que consiste de um grande domínio extracelular de ligação com o ligante (hormônio ou fator de crescimento), conectado ao domínio intracelular através de uma única hélice transmembrana. A grande maioria são receptores com atividade enzimática intrínseca, como os receptores tirosina quinase (TKR) ou serina/treonina-quinase (STKR). Nesse caso a transdução de sinais geralmente envolve a dimerização de receptores após a fixação do ligante ao domínio extracelular, seguida da

autofosforilação de resíduos de tirosina ou serina/treonina. Os resíduos de fosfotirosina ou fosfoserina/treonina atuam como aceptores dos domínios de homologia com SRC2 (SH2) de várias proteínas intracelulares, permitindo o controle de muitas funções celulares (Silva et al., 2009).

Por outro lado, alguns receptores acoplados a enzimas quinases, como os receptores de citocinas, carecem de atividade enzimática intrínseca. Quando ativados, eles se associam e ativam uma tirosina quinase citosólica (JAK), que fosforila o dímero do receptor, levando, posteriormente, à ativação de uma família de fatores de transcrição (STATs) (Shiu & Bleecker, 2001).

São receptores do tipo tirosina quinase: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), insulina, fator de crescimento semelhante a insulina I e II (IGFs I e II, respectivamente), Kit Ligand (KL) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A Tab. 2 resume a identificação tanto dessas proteínas como de seus receptores por categoria folicular nas espécies murina, bovina, caprina e ovina.

Insulina

O receptor de insulina é uma proteína composta por duas subunidades α (massa molecular 135 kDa) e duas subunidades β (massa molecular 95 kDa) unidas por uma ponte dissulfídica (Lawrence et al., 2007). A subunidade α inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase, levando a alteração conformacional e fosforilação do substrato do receptor de insulina. Esse receptor interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de

fosforilação e desfosforilação (Cheatham & Kahn, 1996).

A insulina pode atuar por meio dos receptores específicos de insulina, que estão amplamente distribuídos nos ovários, pelos receptores do IGF-I ou ainda por receptores híbridos, que contêm combinação das subunidades α e β dos receptores de insulina e IGF-I (Yarak et al., 2005).

Em bovinos e caprinos, os receptores de insulina já foram detectados em folículos pré-antrais em crescimento e antrais (Shimizu et al., 2008; Chaves et al., 2012). Estes receptores são amplamente distribuídos em todos os compartimentos ovarianos, incluindo células da granulosa, células da teca, estroma e oócito (Myers et al. 1991; Sirotkin et al., 1998; Louhio et al., 2000).

EGF

O receptor de EGF (EGFR) e seus múltiplos ligantes são considerados os maiores reguladores de diversos processos reprodutivos (Schneider & Wolf, 2008). O sistema EGF compreende oito ligantes e quatro receptores. Como ligantes, pode-se citar: o próprio EGF, fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), anfieregulina (AR), betacelulina (BTC), epiregulina (EPR), neuregulina (NRG 1-4) e epigen (Strachan et al., 2001; Schneider & Wolf, 2008). Como receptores podem ser citados o EGF-R (ErbB1; HER1), ErbB2 (neu; HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4) (Schneider & Wolf, 2008). Vários ligantes da superfamília EGF podem interagir com o EGF-R (ErbB1), ErbB3 e ErbB4, com diferentes especificidades para cada receptor, resultando em distintos efeitos celulares (Riese & Stern, 1998; Jones et al., 1999; Normanno et al., 2003). Ao EGF-R podem se ligar o EGF, TGF- α , EPR, AR, HB-EGF, BTC e epigen (Riese et al., 1996;

Strachen et al., 2001). O ErbB2 não possui ligantes conhecidos (Klapper et al., 1999), enquanto o ErbB3 não possui atividade quinase intrínseca, parecendo atuar apenas como correceptor (Guy et al., 1994).

Quanto à localização do ligante, o EGF já foi descrito em todas as categorias foliculares em murinos e caprinos, bem como seu receptor (Gamett et al., 2002; Silva et al., 2006). O RNAm para a proteína e o EGFR tem sido identificado no oócito e nas células da granulosa de folículos iniciais (primordiais, primários e secundários) e em estádios mais avançados de desenvolvimento (antrais), em diferentes espécies (Chabot et al., 1986; Feng et al., 1987; Lonergan et al., 1996; Gall et al., 2004; Silva et al., 2006).

FGF-2

Os FGFs compõem uma família de pelo menos 25 membros (FGF 1-25; Katoh & Katoh, 2005), tendo sido apenas 23 membros descritos em mamíferos (Itoh & Ornitz, 2004). Os eventos celulares mediados pelos FGFs acontecem via ativação de sete principais receptores em suas isoformas: FGFR1 (isoformas B/C), FGFR2 (isoformas B/C), FGFR3 (isoformas B/C) e FGFR4. A interação ligante-receptor é coordenada pela conjugação desse complexo com heparina ou proteoglicana, conferindo maior estabilidade à ligação e dimerização dos FGFRs. A sinalização intracelular do complexo FGF-FGFR-heparina é mediada pelo recrutamento de diversas proteínas sinalizadoras, culminando na ativação da via intracelular Ras/Raf/ MAP quinase (Eswarakumar et al., 2005). Essa revisão se deterá somente ao FGF-2, também conhecido como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), pois é o membro da família melhor estudado no contexto da foliculogênese (Castilho et al., 2013).

O FGF-2 apresenta alta afinidade aos receptores FGFR-1 (isoformas IIIB e IIIC); FGFR-2 (isoforma IIIC); FGFR-3 (isoforma IIIC) e FGFR-4 (Powers et al., 2000). O FGF-2 já foi localizado em folículos primordiais de murinos, bovinos e caprinos, folículos pré-antrais em crescimento de murinos e bovinos e antrais de caprinos e bovinos. Seu receptor está presente em todas as categorias foliculares de murinos, bem como folículos antrais em bovinos (Shikone et al., 1992; Wordinger et al., 1993; Van Wezel et al., 1995; Nilsson et al., 2001; Almeida et al., 2012). Quanto ao tipo celular, o FGF-2 já foi localizado em todas as células foliculares, enquanto seus receptores estão localizados essencialmente nas células da granulosa e da teca (Shikone et al., 1992; Wordinger et al., 1993; Van Wezel et al., 1995; Nilsson et al., 2001; Almeida et al., 2012).

IGF-I e IGF-II

O sistema IGF consiste em dois ligantes (IGF-I e IGF-II), uma família de seis proteínas de ligação de IGF de alta afinidade (IGFBPs 1-6) associadas a enzimas de degradação IGFBP (referidas coletivamente como proteases) e dois receptores de superfície (IGFR-I e IGFR-II) (Monget et al., 2002). O receptor IGFR-I se liga preferencialmente ao IGF-I e o IGFR-II ao IGF-II. Além disso, por serem similares à insulina, os IGF-I e IGF-II podem se ligar aos receptores de insulina com aproximadamente 10% de afinidade (Yarak et al., 2005).

Tanto o IGF-I e II como seus receptores já foram identificados em folículos pré-antrais em crescimento e antrais murinos e bovinos. Em adição, o IGF-II foi identificado também em folículos ovinos. Quanto aos tipos celulares, a localização dos ligantes e seus receptores ocorrem essencialmente em células da granulosa e da teca (Monniaux & Pisselet,

1992; Spicer et al., 1994; Wandji et al., 1998; Armstrong et al., 2000).

KL

O KL, também conhecido como fator de células tronco ou fator de crescimento de mastócitos, exerce seu efeito biológico através da ligação e ativação de receptores do tipo tirosina quinase denominados c-Kit (Lemmon et al., 1997). No ovário, a expressão do RNAm para o KL já foi demonstrada nas células da granulosa de diversas espécies, incluindo humanos (Hoyer et al., 2005), roedores (Manova et al., 1993; Ismail et al., 1996), ovinos (Tisdall et al., 1999) e caprinos (Silva et al., 2006; Celestino et al., 2010). Em camundongos (Manova et al., 1993) e ovelhas (Tisdall et al., 1999), a expressão do KL foi detectada nas células da granulosa em todos os estágios do desenvolvimento folicular. Similarmente, em ovários de fetos humanos, a presença dessa proteína foi identificada nas células da granulosa tanto de folículos pré-antrais quanto de folículos antrais iniciais (Hoyer et al., 2005). Já em caprinos, a proteína e o RNAm para o KL e para o seu receptor foram verificados em todas as categorias foliculares e ainda no corpo lúteo, no epitélio ovariano e no tecido medular do ovário (Silva et al., 2006).

VEGF

A família VEGF é composta de vários membros: fator de crescimento placentário, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. VEGF-A é o subtipo mais estudado e tem sido detectado em folículos pré-antrais de várias espécies de mamíferos (Araújo et al., 2011). Dois receptores do tipo tirosina quinase se ligam ao VEGF-A com alta afinidade: FLT1 (também conhecido como VEGFR1) e KDR (também denominado VEGFR2). Tem sido observado que o sucesso na

de embriões em caprinos (Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Silva et al., 2014) e ovinos (Arunakumari et al., 2010; Luz et al., 2012) a partir de folículos secundários crescidos *in vitro*.

1. Murinos

No trabalho de O'Brien et al. (2003) foi utilizado um sistema de cultivo em dois passos. Inicialmente, o ovário inteiro foi cultivado na presença de soro (10% de soro fetal bovino) e os complexos granulosa-oócito obtidos após 14 dias (folículos secundários) foram isolados e cultivados na presença de FSH recombinante humano (0,05 ng/mL), EGF (1 ng/mL) e insulina (5 µg/mL) por mais 8 dias. Em seguida, os complexos granulosa-oócito foram mantidos em cultivo por mais 6 dias na presença apenas de insulina.

O soro utilizado na primeira etapa do cultivo é um produto biológico indefinido, composto por substâncias ativas, tais como aminoácidos (Kim et al., 1993; Keskintepe et al., 1995), substratos energéticos, vitaminas (Takahashi et al., 1992), peptídeos, proteínas, hormônios, fatores de crescimento e outros compostos (Mingoti, 1999). A utilização dessa substância apresenta resultados controversos na literatura (Hulshof et al., 1995; Telfer et al., 2000; Mitchell et al., 2002; Demeestere et al., 2005) em função da sua constituição indefinida, a variabilidade de acordo com a partida, além de ser passível de contaminação por agentes microbianos (Freitas, 2004). Entretanto, no estudo de O'Brien et al. (2003) ele foi eficiente em promover o desenvolvimento de folículos secundários utilizando o sistema de cultivo de órgão inteiro. Esse sistema, que é possível apenas em murinos devido à pequena dimensão do ovário, possibilitou a manutenção de toda a arquitetura ovariana e interações entre os

tipos celulares o que pode ter contribuído para a obtenção dos folículos secundários.

Os folículos secundários obtidos na primeira etapa foram cultivados na presença dos fatores extraovarianos como o FSH (0,05 ng/mL) e a insulina (5 µg/mL), e intraovariano como o EGF (1 ng/mL). Estudos anteriores já demonstraram que a concentração plasmática de FSH em camundongos pode chegar até 2000 ng/mL (Murr et al., 1973; Michael et al., 1980; Parkening et al., 1980; Hill et al., 2010). Contudo, nesse estudo foi utilizada uma concentração bem inferior. A utilização de concentrações superiores aos níveis plasmáticos de EGF (0,28 a 0,5 ng/mL; Tsutsumi et al., 1987; Kasayama et al., 1989; Ozawa et al., 1991) e insulina (300 pg/mL; Hill et al., 2010) podem ter superestimulado as vias de sinalização celular comuns aos três fatores utilizados (a PKC, a MAPK e a PI3K como observado na Fig. 3), compensando a baixa concentração de FSH. Além disso, o FSH também estimula a via PKA.

Na última etapa do cultivo, o meio foi simplificado e passou a conter apenas insulina. Essa metodologia demonstrou que o próprio folículo foi capaz de produzir durante os últimos 6 dias de cultivo as substâncias necessárias a sua sobrevivência e crescimento sendo fornecido a eles apenas a insulina, aminoácidos essenciais, vitaminas, sais e outros compostos presentes no meio de base.

2. Bovinos

Gutierrez et al. (2000) descreveu pela primeira vez a formação de antro após um sistema de cultivo de longa duração (28 dias) de folículos secundários bovinos ($166 \pm 2,15 \mu\text{m}$). Nesse sistema, a insulina (10 ng/mL) estava presente no meio de base e foram adicionados ao meio, FSH bovino (1 ng/mL), EGF (0,5 ng/mL) e IGF I (1 ng/mL) isoladamente ou associados ao

FSH. Todos os tratamentos estimularam o crescimento foliular e a formação de antro.

Nesse trabalho foram utilizados 2 hormônios de origem extraovariana (insulina e FSH) e dois fatores de crescimento de origem intraovariana (EGF e IGF-I). Segundo Akbar et al. (1974), a concentração plasmática de FSH em bovinos varia entre as fases do ciclo estral (estro = 78 ng/mL, varia entre 60 a 106 ng/mL; fase foliular: 66 ng/mL, varia entre 44 a 100ng/mL; e fase luteal: 64 ng/mL, varia entre 26 a 1060 ng/mL). Esses resultados demonstram que a concentração utilizada por Gutierrez et al (2000) foi inferior à concentração plasmática. De forma similar, o EGF foi adicionado ao meio em concentração inferior a detectada no fluido foliular de porcas e camundongas, que é cerca de 1 ng/mL (Hsu et al., 1987) e 10 ng/mL (Demeestere et al., 2005), respectivamente. O IGF-I também foi adicionado em concentração inferior a determinada anteriormente no plasma de bovinos (250 a 465 ng/mL; Hayden et al., 1993; Ryu et al., 2003). Já a insulina foi adicionada em concentração superior à concentração plasmática observada em bovinos (0,5 a 1,4 ng/mL) (McAtee & Trenkle, 1971; Hayden et al.; 1993). Apesar da insulina compartilhar as mesmas vias de sinalização do FSH, EGF e IGF-I (a PKC, a MAPK e a PI3K), exceto para a via PKA estimulada apenas pelo FSH, essas concentrações parecem não ter sido suficientes em promover o desenvolvimento completo dos folículos bovinos tomando-os aptos a maturar e produzir embriões *in vitro*.

Enquanto para a espécie murina a foliulogênese dura em média 21 dias, como citado anteriormente, na espécie bovina esse período se estende por meses (Lussier et al., 1987). Gupta et al. (2008) relataram a produção de embriões de

bufalos após um cultivo *in vitro* de folículos secundários por aproximadamente 100 dias, demonstrando a necessidade de um período de cultivo *in vitro* mais extenso. No estudo de Gutierrez et al. (2000), o tempo de 28 dias provavelmente não foi suficiente para produzir oócitos maduros, aptos à produção *in vitro* de embriões. Portanto, a produção de embriões a partir de folículos pre-antrais representa o desafio atual na espécie bovina.

3. Caprinos

Embriões caprinos foram obtidos a partir de folículos secundários (>150 μm) cultivados *in vitro* em meio contendo insulina (10 $\mu\text{g/mL}$), FSH recombinante bovino em concentrações crescentes (100 ng/mL até o dia 6, 500 ng/mL até o dia 12 e 1000 ng/mL até o dia 18 de cultivo) associados ao LH e EGF (ambos na concentração de 100 ng/mL; Saraiva et al., 2010), ao GH (50 ng/mL; Magalhães et al., 2011) ou ao VEGF (100 ng/mL; Silva et al., 2014). Todos esses experimentos tiveram a duração de 18 dias e as taxas de maturação oocitária e produção de embriões foram baixas.

No estudo de Saraiva et al. (2010) as concentrações de FSH utilizadas foram superiores às encontradas no plasma caprino, que podem variar entre 85 a 248 ng/mL durante o estro natural (Chemineau et al., 1981). Além disso, as concentrações de EGF variam em porcas e camundongas entre 1 (Hsu et al., 1987) e 10 ng/mL (Demeestere et al., 2005), respectivamente. Já a concentração de LH estava dentro dos níveis plasmáticos determinados por Chemineau et al. (1982) que publicou que os níveis de LH no plasma caprino variam entre 2,6 a 114,0 ng/mL. Quanto as vias de sinalização envolvidas com os fatores utilizados, a insulina compartilha as mesmas vias de sinalização do FSH, EGF e do IGF (a PKC, a MAPK e a PI3K) exceto

para a via PKA estimulada apenas pelo FSH.

Já Magalhães et al. (2011) utilizou a combinação apenas de fatores extraovarianos, insulina, FSH e GH. A concentração de GH utilizada nesse experimento também foi superior à encontrada para o plasma de caprinos que varia entre 2 a 3 ng/mL (Simms et al., 1978; Komalijnslijper et al., 1997). Aqui, pressupõe-se que os folículos foram capazes de produzir os fatores intra-ovarianos reguladores da foliculogênese, uma vez que houve o completo desenvolvimento folicular, maturação e produção embrionária. As altas concentrações dos fatores utilizados podem ter superestimulado as vias de sinalização celular. Além disso, a insulina compartilha as mesmas vias de sinalização do FSH e GH (a PKC, a MAPK e a PI3K), exceto para a via PKA estimulada apenas pelo FSH e GH.

Já Silva et al. 2014 adicionou ao meio de cultivo os fatores extraovarianos insulina e FSH e o fator intraovariano VEGF. Esses fatores estimulam vias em comum (a PKC, a MAPK e a PI3K), enquanto a via PKA é estimulada apenas pelo FSH.

Aliado a todas as considerações anteriores ressalta-se que, em caprinos, a foliculogênese dura aproximadamente 6 meses. Um estudo recente nessa espécie desenvolvido também por nossa equipe (Pessoa et al., 2014), sugeriu a extensão do período do cultivo *in vitro* para 36 dias. Nesse experimento verificou-se que o período de 36 dias de cultivo pode aumentar as taxas de retomada da meiose, levando a um aumento no número de oócitos maduros e, conseqüentemente, de embriões.

4. Ovinos

Arunakumari et al. (2010) demonstraram que a suplementação do meio de cultivo com T4 (1 µg/mL), FSH (2

µg/mL), IGF-I (10 ng/mL) e GH (1 mIU/mL) melhorou o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais (250 a 400 µm), a maturação oocitária e o desenvolvimento de embriões até o estágio de mórula. Nesse experimento foram utilizados três hormônios extraovarianos (T4, FSH e GH) e um intraovariano, o IGF-I, durante um cultivo *in vitro* por 6 dias.

As concentrações utilizadas para o T4 foram superiores às encontradas no soro de ovelhas (45,41 ng/mL a 51,32 ng/mL; Colodel et al., 2010), assim como a de FSH encontrado em média na concentração de $13,5 \pm 5,2$ ng/mL (Miller et al., 1981). Já o IGF-I é encontrado no plasma de ovelhas em média de 300 a 400 ng/mL durante a fase estral (Mirzaei & Rezaei, 2014), tendo sido utilizado uma concentração inferior à fisiológica. Foram estimuladas com essa combinação de fatores, as vias de sinalização celular: PKC, MAPK e a PI3K (vias em comum entre o FSH, GH e IGF-I), a via PKA, que é estimulada apenas pelo FSH, além da via dos receptores nucleares estimulada apenas pelo T4.

Estima-se que, na ovelha, ao deixar o pool de reserva, o folículo levaria aproximadamente 180 dias para atingir o estágio pré-ovulatório, 135 dias até o aparecimento do antro e mais de 45 dias até a ovulação (Cahille Mauléon, 1980). O estudo de Aranakumari et al (2010) demonstrou que a aceleração desse processo *in vitro* pode ter sido justificada devido à adição das substâncias anteriormente citadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão mostra a complexidade da foliculogênese em função da sua regulação por inúmeros hormônios e fatores de crescimento, os quais atuam através de receptores identificados em diferentes estágios de desenvolvimento e células foliculares. Somado a isso, a

ativação de diferentes vias de sinalização celular e a interação entre estas dificulta a elucidação da foliculogênese. Essas vias podem ser influenciadas pela combinação, momento de adição e concentração dos hormônios e fatores de crescimento utilizados. Entretanto, a compreensão de como isso ocorre ainda não foi completamente elucidada, sendo foco de

varias pesquisas. Estudos que avaliem o bloqueio e/ou estímulo de determinadas vias de sinalização podem ajudar a desvendar o processo de foliculogênese, além de poder aprimorar o cultivo *in vitro*, resultando na produção de elevado número de embriões a partir de oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* nas espécies domésticas.

Tabela 1. Local de produção do FSH, LH e melatonina e localização por categoria folicular de seus receptores em murinos, bovinos, caprinos e ovinos.

FATOR	LOCAL DE PRODUÇÃO	LOCALIZAÇÃO POR CATEGORIA FOLICULAR			REFERÊNCIAS
		Receptor			
		Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	
FSH	Adenohipófise	m	m, b, c, o	m, b, c, o	Camp <i>et al.</i> , 1991; Xu <i>et al.</i> , 1995; Roy, 1993; Tisdall <i>et al.</i> , 1995; Samra <i>et al.</i> , 2010
LH			m, b, c	m, b, c, o	Xu <i>et al.</i> , 1995; Gelety & Magoffin, 1997; Abdelnabi <i>et al.</i> , 1999; Saraya <i>et al.</i> , 2012
MELATONINA	Pineal		m, c	m, c	Soares <i>et al.</i> , 2003; Barros <i>et al.</i> , 2013

Murinos (m), bovinos (b), caprinos (c) e ovinos (o).

Tabela 2. Localização por categoria folicular da insulina, EGF, FGF-2, IGF-I, IGF-II, KL, VEGF (ligante e receptor) em murinos, bovinos, caprinos e ovinos.

FATOR	LOCAL DE PRODUÇÃO			LOCALIZAÇÃO POR CATEGORIA FOLICULAR			REFERÊNCIAS
	Ligante			Receptor			
	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	
INSULINA		Pâncreas			b, c	b, c	Shimizu <i>et al.</i> , 2008; Claves <i>et al.</i> , 2012
EGF	c	c	c	m, c	m, c	m, c	Omett <i>et al.</i> , 2002; Silva <i>et al.</i> , 2006
FGF-2	m, b, c	m, b	b, c	m	m	m, b	Shikone <i>et al.</i> , 1992; Wordinger <i>et al.</i> , 1993; Wezel <i>et al.</i> , 1995; Nilsson <i>et al.</i> , 2001; Van Almeida <i>et al.</i> , 2012
IGF-I		m, b	m, b	m, b	m, b	m, b	Spicer <i>et al.</i> , 1994; Wondji <i>et al.</i> , 1998; Armstrong <i>et al.</i> , 2000
IGF-II		m, b, o	m, b, o	m, b	m, b	m, b	Monnaux & Pissot, 1992; Armstrong <i>et al.</i> , 2000
KL	m, c	m, c	m, c	m, c, o	m, c, o	m, c, o	Motro & Bernsten, 1993; Clark <i>et al.</i> , 1996; Doneda <i>et al.</i> , 2002; Silva <i>et al.</i> , 2006; Lima <i>et al.</i> , 2011
VEGF	c	m, b, c	b, c, o	c	m, b, c, o	b, c, o	Bensha <i>et al.</i> , 2000; Kocs, 1995; Yang & Fortune, 2007; Bruno <i>et al.</i> , 2009; Sharma & Sudan, 2010; Chowdhury <i>et al.</i> , 2010

Murinos (m), bovinos (b), caprinos (c), ovinos (o).

Tabela 3. Componentes da superfamília TGF- β e seus receptores (Tabela adaptada de Silva et al., 2009).

FATOR	RECEPTOR		REFERÊNCIAS
	Tipo 2	Tipo 1	
BMP-2 BMP-4	BMPR-II	BMPR-IA (ALK3) BMPR-IB (ALK6)	Shimasaki et al., 1999; Erickson & Shimasaki, 2003
BMP-6 BMP-7	BMPR-II ActR-IIA ActR-IIB	ActR-IA (ALK2) BMPR-IB (ALK6)	Sidis et al., 1998; Drummond et al., 2002; Knight & Glaston, 2003
BMP-15	BMPR-II	BMPR-IB (ALK6)	Erickson & Shimasaki, 2003; Shimasaki et al., 2004
GDF-9	BMPR-II	T β R-1 (ALK5)	Virt et al., 2002; Erickson & Shimasaki, 2003; Mazerbourg et al., 2004
AMH	Δ MHR-II	ActR-IA (ALK2) BMPR-IA (ALK3) BMPR-IB (ALK6)	Erickson & Shimasaki, 2003; Shimasaki et al., 2004
ATIVINA	ActR-IIA ActR-IIB	ActR-IB (ALK4)	Drummond et al., 2002; Pangas et al., 2002
TGF- β	T β R-II	T β R-1 (ALK5)	Ten Dijke et al., 1994; Shimasaki et al., 2004

Tabela 4. Localização por categoria folicular dos fatores da superfamília TGF- β (ligante e receptor) em marinhos, bovinos, caprinos e ovinos.

FATOR	LOCALIZAÇÃO POR CATEGORIA FOLICULAR						REFERÊNCIAS
	Ligante			Receptor			
	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	
BMP-2		m	m, b		m, o	m, o	
BMP-4		m	m, b		m, o	m, o	
BMP-6		m	m		m, o	m, o	Drummond et al., 2002; Silva et al., 2009;
BMP-7		m, b	m, b		m, o	m, o	
BMP-15	c	m, c	m, c	m	m, o	m, o	
TGF- β	b	b	m, b				Christopher, 2000; Nilsson et al., 2003
GDF-9	b, c, o	m, b, c, o	m, b, c, o	m, c	m, c	m, c	McGrath et al., 1995; Bodensteiner et al., 1990; Silva et al., 2004;
ATIVINA	m, b, c	m, b, c	m, c	m, c	m, c	m, b, c	Hulshof et al., 1997; Izobyr et al., 1998; Zhao et al., 2001; Silva et al., 2006;
INIBINA	m, c, o	m, c, o	m, b, c, o	m, c	m, c	m, b, c	Snitz & Corvini, 1998; Silva et al., 2006; Leitão et al., 2013
AMH		m, b, o	m, b, o				Bezard et al., 1987; Baarends et al., 1995; Durlinger et al., 2002

Marinhos (m), bovinos (b), caprinos (c), ovinos (o).

Tabela 5. Localização por categoria folicular do GHR e LIF (ligante e receptor) em murinos, bovinos, ovinos e caprinos.

FATOR	LOCALIZAÇÃO POR CATEGORIA FOLICULAR					REFERÊNCIAS	
	Ligante			Receptor			
	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	
GH		Adenohipófise		m, b, o	m, b, c, o	m, b, o	Carlsson <i>et al.</i> , 1993; Eckers <i>et al.</i> , 1997; Kolle <i>et al.</i> , 1998; Frota <i>et al.</i> , 2010
LIF	m	m	m				Nilsson <i>et al.</i> , 2002

m= murinos, b= bovinos, c= caprinos, o= ovinos.

Tabela 6. Localização por categoria folicular da triiodotironina (T3), tiroxina (T4), estradiol e progesterona (ligante e receptor) em murinos, bovinos, ovinos, caprinos e humanos.

FATOR	LOCALIZAÇÃO POR CATEGORIA FOLICULAR					REFERÊNCIAS	
	Ligante			Receptor			
	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	Primordial	Pré antral em crescimento	Antral	
T3						h	Zhang <i>et al.</i> , 1997
T4		Tireóide				h	
Estradiol			m, b, c, o	m, o	m, o	m, b, c, o	Byers <i>et al.</i> , 1997; Jansen <i>et al.</i> , 2001
Progesterona			m, b, c, o		o	m, b, c, o	Juengel <i>et al.</i> , 2006

m= murinos, b= bovinos, c= caprinos, o= ovinos, h= humanos.

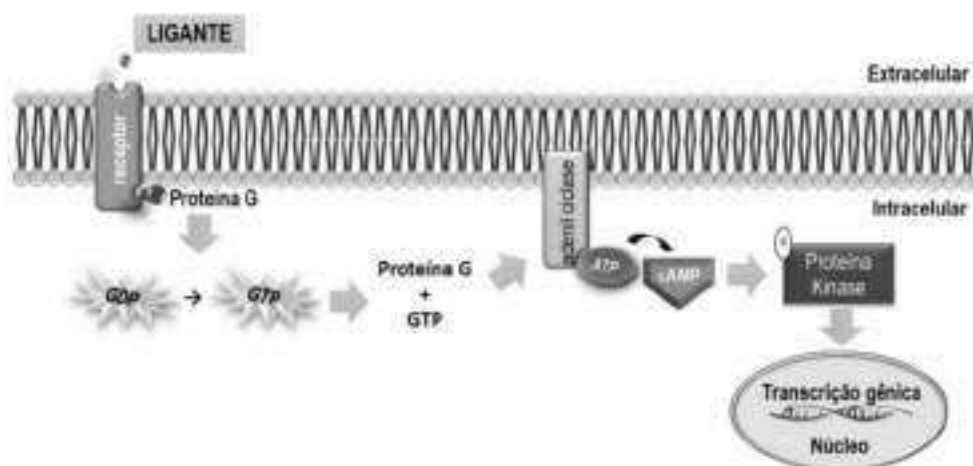


Figura 1. Ativação dos receptores acoplados à proteína G. O complexo ligante-receptor ativa as proteínas G associadas, promovendo a conversão de guanosina difosfato (GDP) em guanosina trifosfato (GTP), que se liga à subunidade α da proteína G, estimulando a adenil ciclase a gerar AMP cíclico (cAMP). Este, por sua vez, aciona uma cascata de fosforilação nas proteínas quinases dependentes de cAMP que irão desencadear a resposta celular através da transcrição gênica.

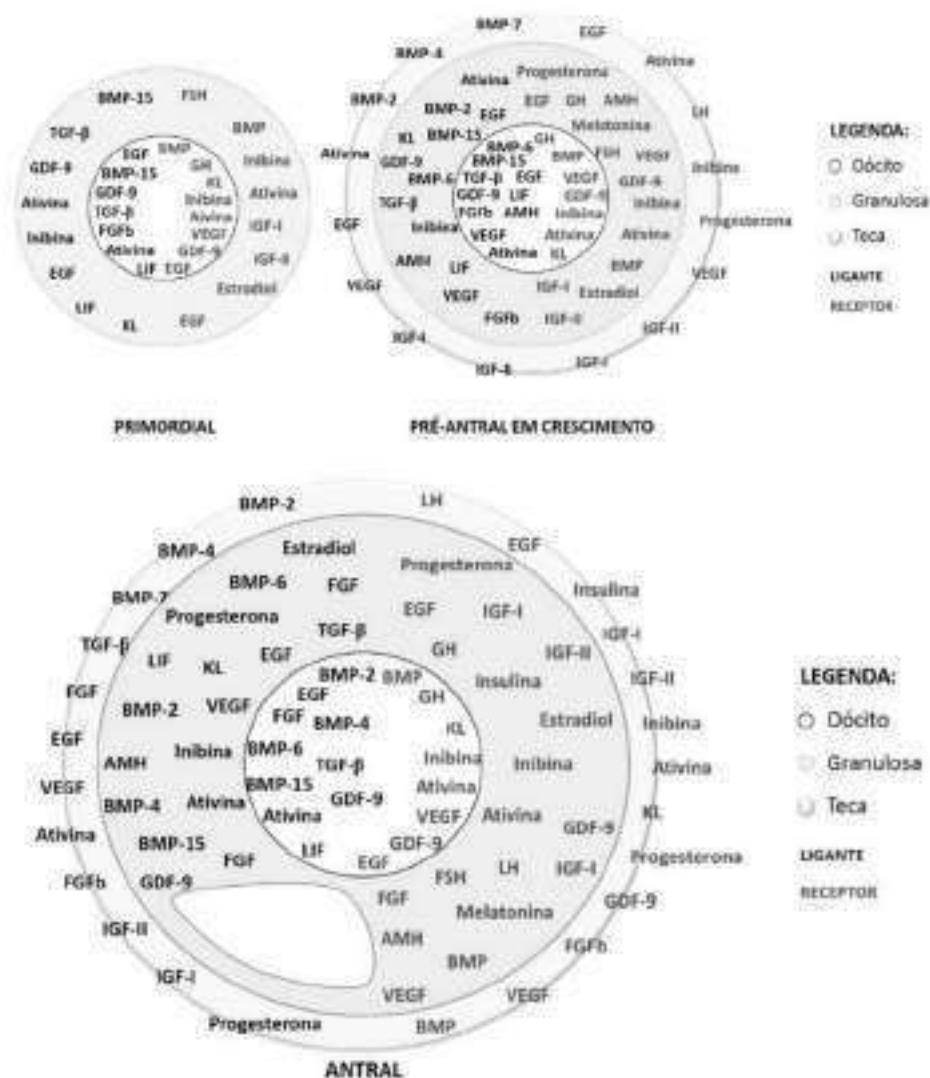


Figura 2. Localização dos fatores reguladores da foliculogênese (ligante e receptor) em folículos ovarianos pré-antrais e antrais nas espécies caprina, ovina e bovina.

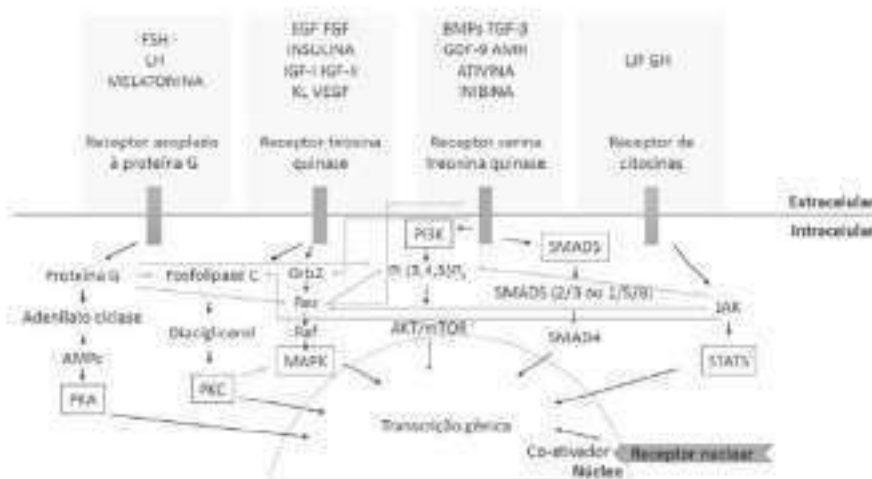


Figura 3. Principais vias de sinalização celular dos fatores reguladores da foliculogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDENNEBI, L.; MONGET, P.; PISSELET, C.; REMY, J. J.; SALESSE, R.; MONNIAUX, D. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 845-854, 1999.
- ABIR, R.; FISCH, B.; JIN, S.; BARNNET, M.; FREIMANN, S.; VAN DEN HURK, R.; FELDBERG, D.; NITKE, S.; KRISSE, H.; AO, A. Immunocytochemical detection and RT-PCR expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Molecular Human Reproduction*, v.10, n.5, p. 313-319, 2004.
- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, v.9, p.815-827, 1994.
- AKBAR, A. M.; REICHERT JR., L. E.; DUNN, T. G.; KALTENBACH, C. C.; NISWENDER, G. D. Serum levels of follicle-stimulating hormone during the bovine estrous cycle. *Journal of Animal Science*, v. 39, p. 360 - 366, 1974.
- ALMEIDA, A.P.; SARAIVA, M.V.A.; FILHO, J.G.A.; SILVA, G.M.; GONÇALVES, R.F.B.; BRITO, I.R.; SILVA, A.W.B.; LIMA, A.K. F.; CUNHA, R.M.S.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, JR. Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the In vitro Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 20-25, 2012.
- ALMEIDA, H. B. Concentrações plasmática de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen equino resfriado. 2004, 25-26 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal): Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- AMROZI, K. S.; ANDO, T.; HAMANA, K. Distribution of estrogen receptor α in the dominant follicles and corpus luteum at the three stages of estrous cycle in Japanese black cows. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 66, p. 1183-1188, 2004.
- ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; MAGALHÃES, D. M.; ALMEIDA, A. P.; GONÇALVES, R. F. B.; BRUNO, J. B.; SILVA, T. F. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Vascular endothelial growth factor-A165 (VEGF-A165) stimulates the in vitro development and oocyte competence of goat preantral follicles. *Cell and Tissue Research*, v. 346, p. 273-281, 2011.
- ARMSTRONG, D. G.; GUTIERREZ, C. G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A. L.; MANN, G. E.; WOAD, K. J.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type I IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, v. 165, p. 101-113, 2000.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H.; Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-894, 2010.
- AUERNHAMMER, C. J.; MELMED, S. Leukemia-Inhibitory Factor—Neuroimmune Modulator of Endocrine Function. *Endocrine Reviews*, v.21, p. 313-345, 2000.
- BAARENDS, W. M.; VAN HELMOND, M. J.; POST, M.; VAN DER SCHOOT, P. J.; HOGERBRUGGE, J. W.; DE WINTER, J. P.; UILENBROEK, J. T.; KARELS, B.; WILMING, L. G.; MEIJERS, J. H. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*, v. 120, p. 189-197, 1994.
- BARROS, V. R.; CAVALCANTE, A. Y.; MACEDO, T. J.; BARBERINO, R. S.;