

## CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE E SEU PAPEL NA FISIOLOGIA DE CÉLULAS OVARIANAS

(Structural Characterization of the Follicle Stimulating Hormone and its role in the physiology of ovarian cells)

Sanely Lourenço da COSTA<sup>1\*</sup>, Eduardo Paulino da COSTA<sup>1</sup>, Emilio César Martins PEREIRA<sup>2</sup>, Vivian Rachel de Araújo MENDES<sup>1</sup>, Talita Fernandes da SILVA<sup>1</sup>, Ana Clara Fidélis RODRIGUES<sup>1</sup>, Pedro Paulo Teixeiras FREITAS<sup>1</sup>, Leticia Maria Pereira SANGIARD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Maturação de Ovócitos e Fertilização *In Vitro*, Universidade Federal de Viçosa (UFV);

<sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP)

### RESUMO

O hormônio folículo estimulante (FSH) é uma glicoproteína heterodímera sintetizada e secretada na porção anterior da hipófise (adenohipófise). O FSH desempenha ações relevantes nos estádios mais avançados do desenvolvimento e maturação folicular. O FSH exerce múltiplas funções como a ativação de mais de 100 genes que codificam diferentes respostas. A ação do FSH está restrita as células da granulosa. Esta gonadotrofina atua por meio da ativação da enzima adenilciclase na membrana plasmática, a qual forma AMPc a partir de ATP. O AMPc promove as mudanças metabólicas que caracterizam a ação gonadotrópica, normalmente por meio da fosforilação de proteínas-quinases. Durante o processo fisiológico da ovulação, os estrógenos melhoram o efeito estimulador do FSH e provocam a liberação de FSH/LH necessária para a ovulação. O próprio folículo maduro é responsável pela ovulação, pois secreta estradiol, hormônio responsável pelo pico pré-ovulatório de LH, resultando na ovulação. Diante disso, a adição de FSH aos meios de cultivo caracteriza ações importantes, como, o desenvolvimento folicular e o processo de ovulação. Desta forma, o objetivo da revisão foi descrever o papel do FSH e seu mecanismo de ação e receptores no desenvolvimento folicular ovariano. E bem como, o efeito deste sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento folicular.

**Palavras-Chave:** cultivo *in vitro*, FSH, ovulação, receptores.

### ABSTRACT

The follicle stimulating hormone (FSH) is a heterodimeric glycoprotein synthesized and secreted in the pituitary anterior portion (adenohypophysis). The FSH performs important actions in the later stages of follicular development and maturation. The FSH exerts multiple functions such as the activation of more than 100 genes encoding different answers. The action of FSH is restricted to the granulosa cells. This gonadotropin acts through the activation of the enzyme adenylate cyclase in the plasma membrane, which forms AMPc from ATP. The AMPc promotes metabolic changes that characterize the gonadotropic action, usually through the phosphorylation of protein kinases. During the physiological process of ovulation, estrogens enhance the stimulatory effect of FSH and cause the release of FSH/LH required for ovulation. The mature follicle itself is responsible for ovulation, as it secretes estradiol, hormone responsible for the pre-ovulatory peak of LH, resulting in ovulation. Thus, the addition of FSH to the culture media characterizes important actions, as the follicular development and the ovulation process. Thus, the revision of the objective was to describe the role of FSH and its mechanism of action and receptor in ovarian follicular development. And as well as the effect of this on survival, activation and follicular growth.

**Key-words:** *in vitro* culture, FSH, ovulation, receptors.

\*Endereço para correspondência:

sanelylc@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O FSH é uma glicoproteína heterodimera sintetizada e secretada pelas células gonadotróficas, presentes na porção anterior da hipófise (Saraiva et al., 2010). A hipófise é dividida em três regiões distintas denominadas lobos anterior (adeno-hipófise), posterior (neuro-hipófise) e intermédio. Cada substância produzida por uma dessas três regiões atua sobre tipos celulares específicos, denominadas células-alvo. As células-alvo de um determinado hormônio possuem na sua membrana ou citoplasma proteínas denominadas receptores (Greco & Stabenfeldt, 2004).

Os receptores de FSH já foram expressos durante estudos moleculares, comprovando que a interação do FSH com seu receptor desencadeiam várias reações intracelulares importantes para proliferação celular e síntese de esteroides (Hunzicker-Dunn & Maizels, 2006). Os estrógenos produzidos nestes animais também melhoram o efeito estimulador do FSH e provocam a liberação de FSH/LH necessária para a ovulação (Driancourt et al., 1993).

Tem-se conhecimento de que os ovários das diferentes espécies de mamíferos contêm milhares de ovócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (FOPA), sendo esses folículos, portanto, uma fonte potencial de gametas fertilizáveis. Com isso, é de grande interesse assegurar o crescimento *in vitro* e permitir a aquisição da competência dos ovócitos provenientes destes folículos (McLaughlin et al., 2010).

No entanto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente é um ponto crucial para a ativação, ou seja, a transição dos folículos primordiais para intermediários, primários e secundários, permitindo, assim, o desenvolvimento de um grande número de FOPA. (Figueiredo et al., 2008).

Várias pesquisas com cultivo *in vitro* de FOPA revelaram importantes fatores de crescimento e hormônios envolvidos no desenvolvimento folicular (Picton et al., 2008). Dentre as substâncias que participam da foliculogênese inicial, merece destaque o FSH. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH no meio de cultivo promoveu a inibição de apoptose e a formação de antro em grandes folículos secundários isolados de diferentes espécies (humana: Wright et al., 1999; ovina: Cecconi et al., 1999; bovina: Gutierrez et al., 2000; suína: Mao et al., 2002).

Neste contexto, a presente revisão de literatura destacará os aspectos relacionados à expressão de FSH e seus receptores no ovário, as vias de sinalização celular do FSH e o efeito deste sobre a sobrevivência, a ativação e o crescimento folicular.

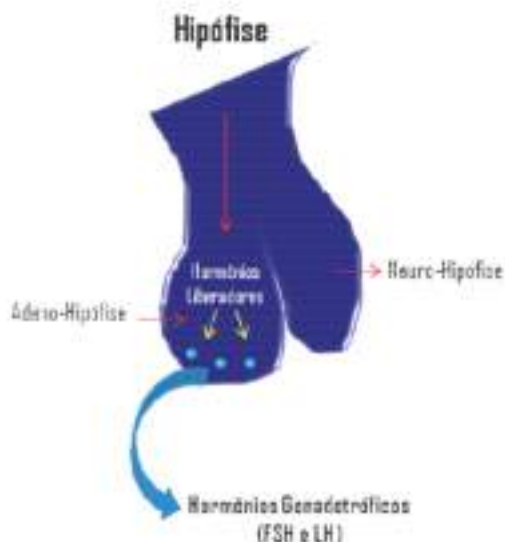
## HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

Existem diversas substâncias, dentre hormônios e fatores de crescimento, que estão envolvidas na foliculogênese. Dentre estes, destaca-se a atuação dos hormônios hipofisários, como Hormônio Foliculo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), Hormônio do Crescimento (GH) e Tireotropina (TSH), que desempenham efeitos diretos ou indiretos na manutenção da viabilidade e estímulo ao crescimento e à maturação folicular (Matos et al., 2007; Saraiva et al., 2008).

O FSH é uma glicoproteína heterodimera sintetizada e secretada pelas células gonadotróficas (Fig.1) presentes na porção anterior da hipófise (adenohipófise). Este hormônio, bem como as outras gonadotrofinas, parece apresentar maior relevância nos estádios mais avançados do desenvolvimento folicular (Saraiva et al.,

2010). Esta gonadotrofina é indispensável para o desenvolvimento e maturação das gônadas na puberdade e produção de gametas durante a fase fértil da vida, além de ser implicada na manifestação do estro e na ovulação (Minj et al., 2008).

O ciclo estral é regulado 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. O aumento na concentração de estrógenos circulantes tem efeito de retroalimentação positiva sobre o hipotálamo, induzindo uma onda repentina de liberação de GnRH, acompanhada pela onda pré-ovulatória de LH e FSH secretados pela hipófise (Fig.1). As ondas pré-ovulatórias de LH e FSH duram de 6 a 12 horas e são responsáveis pela ovulação (Hafez, 1995).



(Fonte: Confeccionado pela autora)

**Figura 1** - Estrutura esquemática da síntese e secreção de FSH

## MECANISMO DE AÇÃO DO FSH NA FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese compreende todas as fases do desenvolvimento folicular, desde sua formação, ativação e crescimento até a completa maturação, sendo controlada por fatores endócrinos, parácrinos (Fig. 2) e autócrinos (Magalhães et al., 2009). Ainda não estão bem elucidados os mecanismos pelos quais ocorre a regulação da fase inicial da foliculogênese, mas já é conhecido que o FSH atua sobre a ativação folicular (Betteridge et al., 1989).

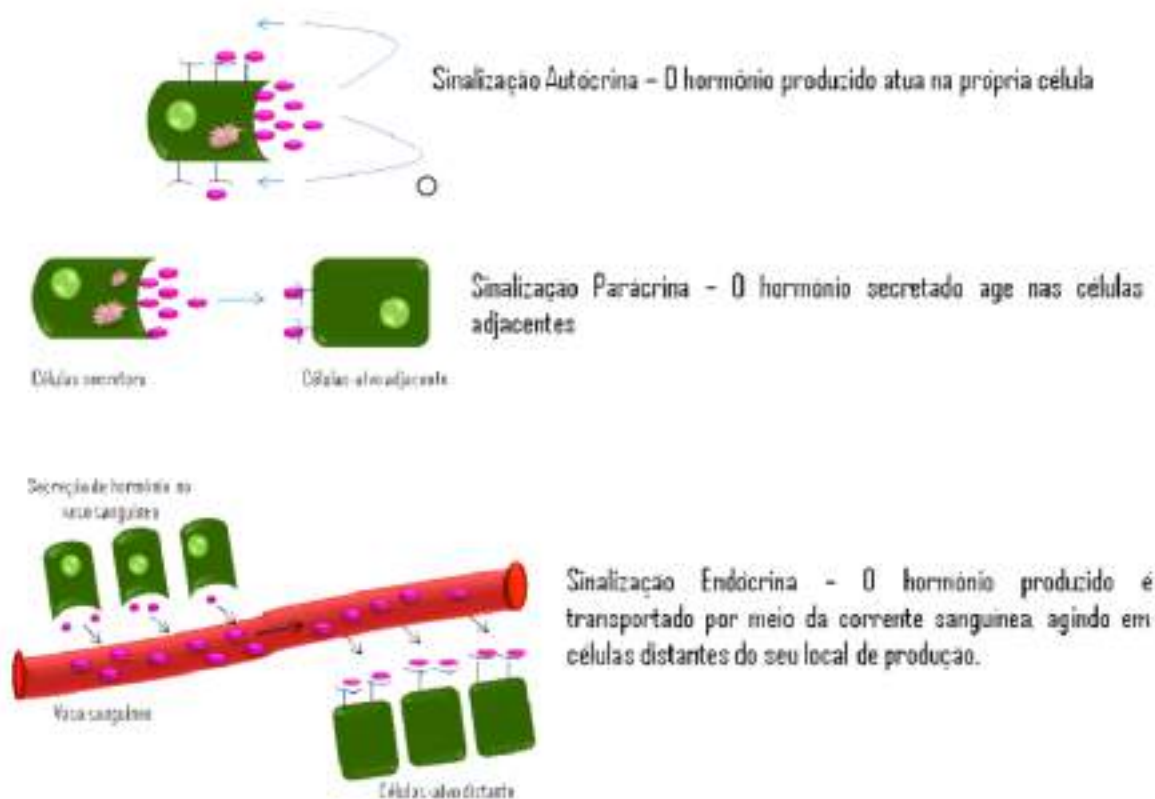
Após sofrerem a ativação, que compreende a transição do estágio de primordiais para primários, estes folículos entram em um curso pré-programado de desenvolvimento e maturação ou então sofrem o processo de atresia (Fair, 2003). O FSH também parece atuar neste momento, pois o mesmo promove a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a inibição da atresia folicular (Magalhães et al., 2009).

O FSH atua por meio da sua ligação a receptores específicos nas células alvo da superfície celular (Minj et al., 2008). No entanto, o mecanismo de ação e de sua transdução de sinal em células germinativas do ovário ainda não está totalmente elucidado (Liu et al., 2010). Tem sido considerado que esta transdução é mediada, principalmente, pela via Adenosina 3',5'-monofosfato Cíclico (cAMP) dependente da Proteína Quinase A (PKA) (Yu et al., 2003). Trata-se de uma reação de primeira camada, em que o FSH controla a proliferação e diferenciação celular e a apoptose (Liu et al., 2010).

Nesta via, após a ligação do hormônio a um receptor específico, é desencadeada a ativação de uma enzima intracelular (adenilciclase). Esta enzima converte parte da Adenosina Trifosfato (ATP) intracelular em

AMP-cíclico. Este, por sua vez, ativa a proteína Quinase dependente de cAMP, que fosforila uma série de outras proteínas, promovendo sua ativação ou inibição. Assim, o AMP-cíclico, direta ou indiretamente,

executa uma série de alterações fisiológicas na célula, como ativação de enzimas, alterações da permeabilidade da membrana celular, ativação de síntese protéica e aumento de secreções (Silva et al., 2009).



(Fonte: Confeccionado pela autora)

**Figura 2** - Representação esquemática dos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos.

O sinal é transmitido por meio de vários mecanismos intracelulares, como a ativação de cAMP/Proteína Quinase A (PKA) e da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK). O Fator de Transcrição CREB é um dos seus substratos, o qual é responsável pela regulação da expressão de alguns genes relacionados à proliferação e esteroidogênese

de células da granulosa (Hunzicker-Dunn & Maizels, 2006).

É possível que o CREB atue como um mediador do efeito do FSH na proliferação das células da granulosa. Neste caso, o FSH primeiramente estimula a produção de cAMP e/ou MAPK, que são ativadores de CREB (Das et al., 1996). Este, por sua vez, pode ativar a proliferação de diferentes peptídeos,

como ciclina D2 e ciclina B1, resultando na proliferação celular (Lauková & Sirotkin, 2007).

Durante a foliculogênese, os eventos referentes à multiplicação e diferenciação celular são dependentes de energia. Em condições *in vitro*, a glicólise é a principal fonte de energia disponibilizada para os folículos pré-antrais de camundongas (Boland et al., 1994). O lactato é um produto originado da glicólise, sendo produzido *in vitro* pelos FOPA de camundongas. Esta substância aumenta de forma significativa, na medida em que os folículos se desenvolvem para o estágio antral. Tendo em vista que o FSH estimula a produção de lactato, este hormônio participa da metabolização da glicose, regulando desta forma o metabolismo energético dos FOPA (Boland et al., 1994).

## EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA FSH

Para a mediação da interação do FSH e dos fatores de crescimento com o ovário e suas estruturas, se faz necessário um conjunto de receptores. Estes são de extrema importância, pois na sua ausência a interação hormônio-ovário não ocorre (Méduri, et al., 2002). A interação do FSH com seu receptor desencadeiam várias reações intracelulares que inclui a ativação de mais de 100 genes que codificam diferentes respostas (Hunzicker-Dunn & Maizels, 2006), tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de esteróides e a expressão de receptores para o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), o IGF-I e o LH (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Este último estimula a expressão do gene que leva a codificação do receptor do FSH *in vitro* (Minegishi et al, 2000).

Os receptores de FSH (rFSH) pertencem a superfamília dos receptores que

atuam pela proteína G. Esta desempenha um papel fundamental na tradução dos sinais, se ligando aos diversos receptores na superfície da membrana (Spiegel et al., 1996). A proteína G é heterodimera, sendo formada por subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), composta por três domínios: um extracelular, um transmembrana (composto por sete hélices hidrofóbicas) e outro intramembranário.

A família dos receptores que atuam por meio da proteína G possui um N-terminal extracelular e um C-terminal intracelular (Johnson & Dhanasedaran, 1989). Com a ativação do domínio extracelular, pela ligação do hormônio gonadotrófico, ocorrerá a ativação da proteína G pelo domínio intracelular, levando assim a uma cascata de eventos, os quais, ao final, determinarão os efeitos específicos do FSH (Simoni et al., 1997).

A expressão do rFSH em CGs de folículos pré-antrais já foi detectada por meio de estudos a nível molecular (Tisdall et al., 1995; Zheng et al., 1996) em ovócitos de suínos e de humanos (Méduri et al., 2002). Nas células da granulosa de bovinos, os rFSH já foram detectados em folículos primários, secundários e antrais e em ovócitos de folículos primordiais de animais de laboratório (Roy, 1993).

No intuito de determinar o estágio do folículo no primeiro momento em que ocorre a expressão do gene que codifica o rFSH, Oktay et al. (1997) verificaram que o início da expressão do gene para este receptor ocorre em folículos com até duas camadas de células da granulosa. Os rFSH são funcionais em ovários de ratas recém-nascidas com idade de quatro a cinco dias (Sokka & Huhtaniemi, 1990) e a sua transcrição atinge o ápice após 10 dias de nascimento em camundongas (O'Shaughnessy et al., 1997).

## INFLUÊNCIA DO FSH NA OVULAÇÃO

O hormônio gonadotrófico FSH é crucial para a manutenção da função ovariana. (Martins et al., 2008). A fase folicular é definida como aquele período desde a regressão do corpo lúteo (CL) até a ovulação. O comportamento e a receptividade sexual das fêmeas durante o estro ocorrem pela produção de estradiol. Os estrógenos produzidos nestes animais também melhoram o efeito estimulador do FSH e provocam a liberação de FSH/LH necessária para a ovulação (Driancourt et al., 1993).

Existem receptores nas células da teca interna e da granulosa que controlam a ação das gonadotrofinas. A ação do FSH está restrita às células da granulosa. As gonadotrofinas (FSH e LH) atuam através da ativação da enzima adenilciclase na membrana plasmática, a qual forma AMPc a partir de ATP. O AMPc promove as mudanças metabólicas que caracterizam a ação gonadotrófica, normalmente por meio da fosforilação de proteínas-quinases. O FSH estimula o complexo aromatase para produzir estradiol a partir de andrógenos. Entretanto, as células da granulosa possuem baixa quantidade de andrógenos, tendo em vista a baixa concentração das enzimas que sintetizam estes hormônios (17 hidroxilases e C<sub>17,20</sub> liases). Assim, os andrógenos devem ser fornecidos pelas células da teca interna, proveniente da estimulação pelo LH (Driancourt et al., 1993).

Muitos fatores são produzidos por influência das gonadotrofinas (Thomas et al., 2005), sendo que a passagem destes ocorre por meio da comunicação bidirecional entre o ovócito e as células da granulosa. Esta comunicação ocorre durante todo o processo de desenvolvimento folicular por meio das junções *gap* (intercomunicantes; Buccione et al., 1990). Estas permitem a transferência de

aproximadamente 85% dos metabólitos para o ovócito (Buccione et al., 1990), bem como modulam a ação transcricional (De La Fuente & Eppig, 2001) e induzem modificações de diversas proteínas no ovócito.

Alguns estudos têm introduzido um novo conceito de que os sistemas de comunicação entre ovócitos e células foliculares somáticas são cruciais não apenas para o crescimento e a maturação dos ovócitos, mas também para a própria mitose e a diferenciação das células foliculares circundantes (Matzuk et al., 2002). Neste conceito, os ovócitos produzem fatores de crescimento, mais notavelmente a BMP-15, o KL e o GDF-9, que podem agir nas células da granulosa para regular a atividade do FSH e controlar a proliferação destas células (Otsuka et al., 2005).

O crescimento do folículo até o estágio antral independe das gonadotrofinas. Entretanto, o folículo cresce e se desenvolve sobre a influência de LH e FSH. O FSH é o principal responsável pela formação do antro, estimulando a mitose das células da granulosa e a secreção do fluido folicular. O FSH também aumenta a sensibilidade das células da granulosa para o LH, mediante a estimulação da síntese de receptores para LH, o que prepara a luteinização das células da granulosa em resposta a onda pré-ovulatória de LH.

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 através de retroalimentação negativa sobre a hipófise (Fortune et al., 1994). A

secreção de estradiol pelo folículo dominante provoca o pico pré-ovulatório de LH, resultando na ovulação e no desenvolvimento do CL (Ginther et al., 1996).

### **IMPORTÂNCIA DO FSH DURANTE O CULTIVO IN VITRO**

O desenvolvimento de meios de cultivos que permitam a manutenção da viabilidade ovocitária é fundamental, tanto para a produção de ovócitos aptos à fecundação *in vitro*, tanto para a compreensão da foliculogênese, mas também para a preservação das células germinativas das fêmeas. Diante do exposto, muitas pesquisas têm sido realizadas no intuito de desenvolver sistemas de cultivos que possibilitem o desenvolvimento e a sobrevivência de FOPA (Mao et al., 2002). Neste contexto, algumas gonadotrofinas e fatores de crescimento têm um papel importante na regulação da função ovariana e vêm sendo pesquisados como componentes para este meio de cultivo folicular.

O FSH é uma gonadotrofina fundamental no cultivo *in vitro* (Kobayashi et al., 2009), uma vez que a sua ausência pode comprometer a difusão de vários fatores químicos e físicos essenciais através da membrana basal. Estudos revelam que sistemas de cultivo sem a presença do FSH resultaram na extrusão do ovócito (Cortvrindt et al., 1997), causado por uma deficiência ou redução do número de junções comunicantes (Hsueh et al., 1994).

Informações geradas por meio de estudos com ratos revelaram que a ausência de FSH no meio de cultivo resultou na morte das células foliculares e comprometimento da vitalidade das células da granulosa. Por outro lado, a adição de FSH ao meio de cultivo de FOPA promoveu o crescimento, a sobrevivência e a formação do antro

(Cortvrindt et al., 1997). Também em humanos, o FSH promove a formação de antro e a produção de estrógeno no cultivo *in vitro* (Abir et al., 1997). Estes dados reforçam o papel vital deste hormônio na manutenção do crescimento saudável do folículo e do ovócito (Mao et al., 2002).

Alguns estudos experimentais revelam que o cultivo *in vitro* de FOPA isolados utilizando FSH estimula a proliferação de células da granulosa e a formação do antro (Andrade et al., 2005) e na presença de 10% de soro fetal bovino, teve um importante papel no crescimento de FOPA de caprinos e ovinos, após 18 dias de cultivo (Rodrigues et al., 2010). Além disso, Saraiva et al. (2011) demonstraram que a utilização de concentrações crescentes de FSH (100 ng/mL até o dia 6, 500 ng/mL até o dia 12 e 1000 ng/mL até o dia 18 de cultivo) melhorou o desenvolvimento *in vitro* de FOPA caprinos.

Mao et al. (2002) relataram maior crescimento e proporção de folículos com antro (83,3%) em folículos cultivados na presença de FSH, quando comparados aos cultivados na ausência do hormônio. Estudos recentes demonstraram que a adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* tem a capacidade de estimular a expressão de RNAm para receptores de IGF-I em FOPA caprinos (Magalhães-Padilha et al., 2012).

Durante a foliculogênese, poucos FOPA entram em atresia. Porém, ao atingirem a fase antral, a maioria deles sofre este processo. Alguns estudos sugeriram que a apoptose (morte celular programada) é um mecanismo subjacente da atresia folicular, sendo o FSH apontado como regulador deste processo. A apoptose pode ser induzida por alguns fatores oxidantes, sendo que a adição ao meio de cultivo de FSH e de fatores antioxidantes, como ácido ascórbico, inibem esta resposta (Tilly & Tilly, 1995, Rossetto et al., 2009).

Foi relatado que o uso de FSH associado ao EGF estimula o crescimento dos FOPA em caprinos, tendo em vista que promove o crescimento do ovócito (Silva et al., 2004). A adição de EGF e FSH durante o cultivo *in vitro* de FOPA reduz a porcentagem de células foliculares atresicas e aumenta a taxa de proliferação das células da granulosa (Saha et al., 2000). Em bovinos, o rápido crescimento de FOPA para a fase antral ocorre durante um longo período de cultivo de até 28 dias (Gutierrez et al., 2000), com a adição de FSH e EGF.

O estrogênio atua como um regulador positivo na ação do FSH durante a diferenciação das células da granulosa. Estudos em seres humanos e ratos demonstraram que as interações funcionais entre a ação estrogênica e o FSH são necessárias para o estabelecimento de folículos dominantes no ovário. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares deste sinergismo permanecem desconhecidos. Pesquisas demonstraram que a comunicação entre os ovócitos e as células foliculares somáticas é essencial, não só para o crescimento e a maturação do ovócito, mas também para a mitose e diferenciação de células foliculares somáticas adjacentes (Otsuka et al. 2005).

Já foi comprovado que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, como o GDF-9 e a BMP-15, os quais são produzidos pelo ovócito e têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (Otsuka et al. 2005). Pesquisas anteriores mostraram que o GDF-9 produzido pelo ovócito atua na regulação do crescimento dos FOPA *in vitro* (Orisaka et al., 2006). Durante o período pré-ovulatório, o FSH estimula as células da granulosa e do *cumulus* a sintetizar ácido hialurônico, resultando em efeitos dissociativos (Eppig, 1979). Talvez o FSH em excesso possa

provocar uma diminuição prematura das junções comunicantes entre as células do *cumulus* e o ovócito, o que impediria a transferência de nutrientes das células da granulosa ao ovócito, resultando na morte do mesmo (Andrade et al., 2005).

Driancourt et al. (1995) pesquisaram o papel das gonadotrofinas na regulação da foliculogênese na espécie suína utilizando a técnica de hipofisectomia ou o tratamento com antagonista de GnRH, o qual bloqueia a secreção de LH pulsátil, sem contudo interferir na secreção do FSH. Estes autores demonstraram que o crescimento de folículos de 0,19 a 1,1 mm é independente de gonadotrofinas, enquanto que o crescimento de 1,1 a 2 mm é dependente de FSH e os maiores que 2 mm dependente de LH.

Do ponto de vista bioquímico, como os folículos desenvolvem de duas a três camadas de células da granulosa e a teca interna e externa começam a se diferenciar, receptores de FSH manifestam-se nas células da granulosa de FOPA em suínos (Yuan et al., 1996) e os folículos se tornam dependentes de gonadotrofinas. Segundo Mao et al. (2002), os FOPA poderiam responder a quantidades crescentes de FSH, o que implica que o cultivo destes fornece uma abordagem consistente para o estudo da regulação folicular precoce pelo FSH.

Sabe-se que o FSH aumenta o crescimento folicular pré-antral *in vitro* (Orisaka et al., 2006). Embora ele sozinho seja capaz de estimular o crescimento folicular pré-antral, um aumento adicional e significativo no crescimento dos folículos ocorre quando os mesmos são cultivados juntamente com T<sub>3</sub> (Kobayashi et al., 2009). Em um de seus trabalhos, Kobayashi et al. (2009) demonstraram pela primeira vez que o T<sub>3</sub>, embora ineficaz sozinho, promove sinergismo com FSH em FOPA de ratos durante o desenvolvimento *in vitro*.



Pelo exposto anteriormente, a presença de FSH é fundamental para o crescimento de FOPA na espécie humana (Hsueh et al., 1994) e no rato (Nayudu & Osborn, 1992) por meio de diversos mecanismos de ação. Outro fator importante a ser considerado é a utilização de uma concentração adequada do hormônio para que este desenvolvimento ocorra (Mao et al., 2002).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* que permita a ativação e o desenvolvimento de um grande número de FOPA é de grande interesse, por permitir a elucidação de mecanismos envolvidos na foliculogênese e possibilitar a conservação de material genético de fêmeas com interesse econômico.

Assim, o FSH tem sido apontado como um hormônio fundamental no meio de cultivo, por apresentar atividades como a regulação da expressão de diversos fatores de crescimento que, por sua vez, participam da ativação e do crescimento folicular. Todos estes eventos são imprescindíveis para a obtenção de ovócitos competentes durante o cultivo *in vitro*. Além disso, este hormônio promove a proliferação das células da granulosa, a formação do antro e a inibição da atresia folicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; FRANKS, S.; MOBBERLEY, M. A.; MOORE, P. A.; MARGARA, R. A.; WINSTON, R. M. L. Mechanical isolation and *in vitro* growth of preantral and small antral human follicles. *Fertility and Sterility*, v.68, p.682-688, 1997.

ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p.1104-1113, 2005.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.38, p.87-98, 1989.

BOLAND, N. I.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J. GOSDEN, R. G. The effect of glucose metabolism in murine follicle development and steroidogenesis *in vitro*. *Human Reproduction*, v.9, p.617-623, 1994.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*, v.43, p.543-547, 1990.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v.60, p.594-601, 1999.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Human Reproduction*, v.12, n. 4, p.759-768, 1997.

DAS, S.; MAIZELS, E. T.; DEMANNO, D.; ST CLAIR, E.; ADAM, S. A.; HUNZICKER-DUNN, M. A stimulatory role of cyclic adenosine 3,5-monophosphate in follicle-stimulating hormone-activated mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, v.137, p.967-74, 1996.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J. J. Transcriptional activity of the mouse oocyte

- genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Development Biology*, v.229, p.224-236, 2001.
- DRIANCOURT, M. A.; GOUGEON, A.; ROYERE, D.; THIBAUT, C. Ovarian Function. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, p.281-305, 1993.
- DRIANCOURT, M. A.; LOCATELLI, A.; PRUNIER, A. Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reproduction, Nutrition, Development*, v.35, p.663-673, 1995.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-838, 1979.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.203-216, 2003.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em foliculos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, p. 303-327, 2008.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammal. *Biology Reproduction*, v. 50, p. 225-232, 1994.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GRECO, D.; STABENFELDT, G. G. Endocrinologia. In: Cunningham, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 307-350, 2004.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- HAFEZ E.S.E. *Reprodução Animal*. 6o Edição. Editora Manoele. Capítulo 14. p. 319-333, 1995.
- HSUEH A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, v.15, p.707-724, 1994.
- HUNZICKER-DUNN, M.; MAIZELS, E. T. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase A. *Cellular Signalling*, v.18, p.1351-1359, 2006.
- JOHNSON, G. L.; DHANASEDARAN, N. The G protein family and their interactions with receptors. *Endocrine Reviews*, v.10, p.317-331, 1989.
- KOBAYASHI, N.; ORISAKA, M.; CAO, M.; KOTSUJI, F.; LEADER, A.; SAKURAGI, N.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor-9 Mediates Follicle-Stimulating Hormone-Thyroid Hormone Interaction in the Regulation of Rat Preantral Follicular Development. *Endocrinology*, v.150, p.5566-5574, 2009.
- LAUKOVÁ, M.; SIROTKIN, M.; A. V. Follicle-stimulating hormone: Effects and possible mechanisms of action in rabbit ovarian cells. *Slovak Journal of Animal Science*, v.40, p.66-71, 2007.
- LIU, H.; ZENG, W.; CAO, A.; ZHANG, C. Follicle-stimulating hormone promotes proliferation of cultured chicken ovarian germ cells through protein kinases A and C activation. *Journal of Zhejiang University Science B*, v.11, p.952-957, 2010.
- MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.;

- MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Foliculo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.33, p.171-182, 2009.
- MAGALHÃES-PADILHA, A. D.M.; DUARTE, A.B.; ARAÚJO, V.R.; SARAIVA, M.V.; ALMEIDA, A.P.; RODRIGUES, G.Q.; MATOS, M.H.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 77, p. 206-213, 2012.
- MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; McCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation *In Vitro*. *Biology of Reproduction*, v.67, p.1197-1203, 2002.
- MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, p.36-49, 2008.
- MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D. B.; ROCHA, R. M. P.; SILVA, J. R. V.; BAO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle Stimulating Hormone and Fibroblast Growth Factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p.677-684, 2007.
- MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, v.296, p.2178-2180, 2002.
- MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F. & TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Molecular Human Reproduction*, v.16, p.644-653, 2010.
- MÈDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M. A.; COMBETTES, L.; GRANET, P.; VANNIER, B.; LOOSFELT, H.; MIGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.87, p.2266-2276, 2002.
- MINEGISHI, T.; HIRAKAWA, T.; KISHI, H.; ABE, K.; ABE, Y.; MIZUTANI, T.; MIYAMOTO, K. A role of insulin-like growth factor I for folliclestimulating hormone receptor expression in rat granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.62 p.325-333, 2000.
- MINJ, A.; MONDAL, S.; TIWARI, A.K.; SHARMA, B.; VARSHNEY, V.P. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *General and Comparative Endocrinology*, v.158, p.147-153, 2008.
- NAYUDU, P. L.; OSBORN, S. M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Journals of Reproduction & Fertility*, v.95, p.349-362, 1992.
- O'SHAUGHNESSY, P. J.; McLELLAND, D.; McBRIDE, M. V. Regulation of Luteinizing Hormone Receptor and Follicle-Stimulating Hormone-Receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse. *Biology of Reproduction*, v.57, p.602-608, 1997.
- OKTAY, K., BRIGGS, D., GOSDEN, R. G.. Ontogeny of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Expression in Isolated Human Ovarian Follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.82, p.3748- 3751, 1997.

- ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J. Y.; GRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor 9 Is Antiapoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. *Molecular Endocrinology*, v.10, p.2456-2468, 2006.
- OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; WANG, X.; SHARMA, S.; MIYOSHI, T.; SHIMASAKY, S. Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology*, v.146, p.3362-3367, 2005.
- PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v.136, p.703-715, 2008.
- RODRIGUES, G.Q.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES, D.M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Animal Reproduction*, v. 7, p. 382-388, 2010.
- ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L.R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; NAME, K.P.O.; BÃO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v.37, p.112-123, 2009.
- ROY, S. K. Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$  modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biology of Reproduction*, v.48, p.552-557, 1993.
- SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, K. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.63, p.27-39, 2000.
- SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, G. M.; PORFIRIO, E. P.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Influence of different concentrations of LH and FSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. *Small Ruminant Research*, v.78, p.87-95, 2008.
- SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, p.206-221, 2010.
- SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; ALMEIDA, A.P.; LIMA-VERDE, I.B.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, G.M.; MARTINS, F.S.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote*, v. 19, p. 205-214, 2011.
- SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004.
- SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, v.32, p.453-462, 2009.
- SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The Follicle-Stimulating Hormone

- Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. *Endocrine Reviews*, v.18, p.739-773, 1997.
- SOKKA, T.; HUHTANIEMI, I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclicAMP production in the neonatal rat ovary. *Journal Endocrinology*, v.127, p.297-303, 1990.
- SPIEGEL, A. M. Mutations in G proteins and G protein coupled receptors in endocrine disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.81, p.2434-42, 1996.
- THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, v.146, p.941-949, 2005.
- TILLY J. L.; TILLY K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles *Endocrinology*, v.136, p.242-252, 1995.
- TISDALL, D. J.; WATANABE, K.; HUDSON, N. L.; SMITH, P.; MCNATTY, K. P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Endocrinology*, v.15, p.273-281, 1995.
- 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.
- WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in-vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction* v.14, p.1555-1562, 1999.
- YU, Y.; LI, W.; HAN, Z.; LUO, M.; CHANG, Z.; TAN, J. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. *Theriogenology*, v.60, p.1691-1704, 2003.
- YUAN, W.; LUCY, M. C.; SMITH, M. F. Messenger ribonucleic acid for insulin like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein- 2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biology of Reproduction*, v.55, p.1045-1054, 1996.
- ZHENG, W.; MAGID, M. S.; KRAMER, E. E.; CHEN, Y. T. Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *American Journal of Pathology*, v.148, p.47-53, 1996.