

**INFLUÊNCIA DA ORIGEM E PUREZA DO HORMÔNIO FOLÍCULO  
ESTIMULANTE (FSH) NA SOBREVIVÊNCIA E NO  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
CAPRINOS**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DEBORAH DE MELO MAGALHÃES**

**INFLUÊNCIA DA ORIGEM E PUREZA DO HORMÔNIO FOLÍCULO  
ESTIMULANTE (FSH) NA SOBREVIVÊNCIA E NO  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
CAPRINOS**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**DEBORAH DE MELO MAGALHÃES**

**INFLUÊNCIA DA ORIGEM E PUREZA DO HORMÔNIO FOLÍCULO  
ESTIMULANTE (FSH) NA SOBREVIVÊNCIA E NO  
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e Sanidade de pequenos ruminantes

**Orientador:** Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

**FORTALEZA-CE  
2008**

DEBORAH DE MELO MAGALHÃES

INFLUÊNCIA DA ORIGEM E PUREZA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) NA SOBREVIVÊNCIA E NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 09/ 12/ 2008

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Presidente da banca /Orientador)  
Universidade Estadual do Ceará

---

Dra. Maria Helena Tavares Matos (Examinadora)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Dr. Eduardo Paulino da Costa (Examinador)  
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

INFLUÊNCIA DA ORIGEM E PUREZA DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE  
(FSH) NA SOBREVIVÊNCIA E NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS  
PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

DEBORAH DE MELO MAGALHÃES

Aprovada em: 09/ 12/ 2008

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Presidente da banca /Orientador)  
Universidade Estadual do Ceará

---

Dra. Maria Helena Tavares Matos (Examinadora)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Dr. Eduardo Paulino da Costa (Examinador)  
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

*Aos meus pais, Antonio Nogueira Magalhães e  
Maria Edná de Melo Magalhães, que nunca  
mediram esforços para a concretização dos  
meus sonhos.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, nosso Criador e Consumador de todas as coisas, que através de seus ensinamentos nos faz trilhar pelos caminhos de vitória.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionou e à Universidade de Brasília (UNB) pela colaboração profissional na execução do experimento. Agradecimento sincero ao CNPq pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo e auxílio financeiro dessa pesquisa.

À minha mãe, Maria Edna de Melo Magalhães, que nos momentos incertos me faz acreditar, dando-me “asas para voar” em busca dos meus sonhos e ao meu pai, médico veterinário Antônio Nogueira Magalhães, pelo apoio afetivo e pelas experiências adquiridas através deste grande profissional.

Aos meus tios-pais Maria Edneusa de Melo Campos (tiazinha) e Francisco das Chagas Campos Neto (Paê) que através de toda dedicação despertaram em mim o amor mais nobre: não o de ser, mas o de me fazer sentir verdadeiramente filha. E também à minha “irmãzinha” Priscilla de Melo Campos que através dos seus gestos nos dá uma lição de que ser feliz é dividir e compartilhar, sempre torcendo pelo sucesso e o caminho da vitória.

Ao meu noivo, Msc. Rodrigo Tenório Padilha, peça fundamental na minha caminhada profissional e pessoal, me fazendo uma pessoa mais feliz e aos meus futuros sogros Martha e Huáscar Padilha, pelo carinho e incentivo, provando que o companheirismo não mede distância.

Ao meu irmão Thiago de Melo Magalhães que com sua sabedoria e experiência profissional conseguiu trazer de volta essa dissertação (o arquivo tinha corrompido), transformando minhas lágrimas em sorriso. À minha cunhada Carolina Cabral pelo exemplo de profissional dedicada e ao pequeno Yuri, meu sobrinho, que me dá a consciência e o dever de construir um mundo melhor.

Aos meus irmãos da Comunidade Cristã Kayrós na pessoa do pastor Luiz Cláudio e sua esposa Priscila pela comunhão e por suas orações vitais e palavras transformadoras.

Ao meu orientador Dr. José Ricardo de Figueiredo pelo exemplo de profissionalismo e humildade, me ensinando um pouco do que é saber e outro pouco do que é viver.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Helena Matos, peça chave do LAMOFOPA, exemplo de dinamismo profissional e de amiga incondicional.

Ao professor Cláudio Cabral Campello pela sua mente brilhante e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Dr. Eduardo Paulino da Costa, professor da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que veio enriquecer meus conhecimentos, fazendo parte como membro da banca dessa dissertação.

À grande família LAMOFOPA, professoras Ana Paula e Líliam Mara, exemplo de profissionais e “mulheres de fibra”, ao professor José Roberto Viana, por sua marcante colaboração em nossos projetos. Aos doutorandos Juliana Jales Celestino, Cláudio Afonso, Fabrício Souza, Anderson Almeida, Isabel Lima-Verde, Jamily Bruno, Márcia Viviane, Roberta Chaves, Janduí Nóbrega, Ana Beatriz e mestrandos Giovanna Quintino, Leonardo Pinto, Cleidson Manoel, Rafael Rosseto, Sanely, Luciana Faustino, Isadora Machado e Valesca Barreto (hoje mestre) pelo agradável convívio e trocas de conhecimentos. E em especial a mestranda Valdevane Rocha Araujo, por toda colaboração no experimento e seu incondicional companheirismo. Aos alunos de Iniciação Científica: Márcio Breno, Rebeca Magalhães, Laritza Lima, Alison André, Anelise Costa, Rafael Fernando, Rochele e Gerlane Modesto pela disponibilidade em ajudar e a amizade, e em especial ao meu “filho”, Diego Diógenes, por ele ter despertado em mim o espírito materno de dar o meu melhor para que ele se torne um grande profissional. Agradeço aos técnicos Leandro Silva, Patrícia Magalhães e ao funcionário Zandor Camelo que com competência e disponibilidade vêm desempenhando suas funções.

Ao coordenador do PPGCV, professor Marcos Fábio Gadelha, por desempenhar com tamanha seriedade e compromisso essa difícil função. Aos professores do programa pelos conhecimentos que recebemos, e em especial a professora Lúcia Daniel Machado da Silva, que é um referencial para nós que queremos seguir a carreira de magistério. Também a todos os funcionários do PPGCV e colegas pelo agradável convívio.

Aos criadores Nelson Prado, Miguel Bitar, Sérgio Duso, Geraldo Magela, Roberto Leite, Leopoldo Vasconcelos e Eduardo Vasconcelos que abriram as portas de suas fazendas, me dando a oportunidade de aperfeiçoar meus conhecimentos. E ao veterinário Weaver Braga, pelo apoio e incentivo na minha carreira. Além de excelente profissional, grande amigo.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

O Hormônio Folículo Estimulante é uma gonadotrofina que regula a expressão de fatores de crescimento, os quais exercem um papel essencial na foliculogênese inicial. Entretanto, os efeitos de diferentes preparações comerciais desse hormônio em folículos ovarianos pré-antrais caprinos são desconhecidos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da origem (hipofisário e recombinante) e pureza do FSH na sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais caprinos. Fragmentos de córtex ovariano foram cultivados *in vitro* por um ou sete dias em Meio Essencial Mínimo (MEM<sup>+</sup>) na ausência ou presença de diferentes concentrações (10, 50, 100 e 1000 ng/ml) de FSH hipofisário suíno (Foltropin<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil) ou FSH recombinante bovino (rFSH<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil). O grupo controle (não cultivado) e aqueles cultivados por um ou sete dias foram processados para análise histológica e ultra-estrutural para verificação do crescimento e da morfologia folicular. Os folículos foram classificados em primordiais ou em desenvolvimento (primário e secundário), bem como em normal ou degenerado. Além disso, os diâmetros folicular e oocitário foram analisados antes e após o cultivo. Os resultados mostraram que, após sete dias de cultivo, apenas 50 ng/mL de FSHr manteve o percentual de folículos histologicamente normais similar ao controle ( $P > 0,05$ ). Após sete dias, a adição de 10 ng/mL de Foltropin<sup>®</sup> e todas as concentrações de FSHr diminuíram de modo significativo ( $P < 0,05$ ) o percentual de folículos primordiais e aumentaram o percentual de folículos em desenvolvimento ( $P < 0,05$ ). A presença de 50 ng/mL de rFSH promoveu o maior diâmetro folicular ( $P < 0,05$ ) no sétimo dia de cultivo. Além disso, o grupo FSHr 50 ng/mL mostrou folículos ultra-estruturalmente normais na microscopia eletrônica. Em conclusão, esse estudo demonstrou que a concentração de 50 ng/ml de FSHr promoveu a ativação de folículos primordiais e o posterior crescimento folicular, mantendo a integridade ultra-estrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados por 7 dias.

Palavras-chaves: caprino; FSH; crescimento folicular; folículos pré-antrais

## ABSTRACT

Follicle stimulating hormone (FSH) is known as a gonadotropin that regulates growth factors which have an essential role in early folliculogenesis. However, the effects of the different commercial preparations of this hormone in caprine preantral ovarian follicles are not well-known. The aim of this study was to evaluate the effects of FSH source (pituitary or recombinant) on the survival, activation and growth of caprine preantral follicles. Pieces of caprine ovarian cortical tissues were in vitro cultured for 1 or 7 days in Minimum Essential Medium (MEM) alone or containing different concentrations (10, 50, 100 and 1000 ng/ml) of porcine pituitary FSH (Foltropin<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil) or bovine recombinant (rFSH<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil). Ovarian tissues from control (non-cultured) and from those cultured for 1 or 7 days were processed for histological and ultrastructural studies to verify follicular morphology and growth. Follicles were classified in primordial or growing (primary and secondary), as well as in normal or degenerated. In addition, follicular and oocyte diameter were analysed before and after culture. The results showed that after seven days of culture only the concentration of 50 ng/ml of rFSH maintained the percentage of histologically normal follicles similar to control ( $P > 0.05$ ). After seven days, addition of 10 ng/ml of pFSH and all the concentrations of rFSH significantly decreased ( $P < 0.05$ ) the percentage of primordial follicles and increased ( $P < 0.05$ ) the percentage of growing follicles. In addition, the presence of 50 ng/ml of rFSH promoted the highest follicle diameter ( $P < 0.05$ ) at day seven of culture. In conclusion, 50 ng/ml of rFSH maintained the ultrastructural integrity of caprine preantral follicles, promoted primordial follicles activation and further growth of cultured follicles.

Keywords: caprine; FSH; follicular growth; preantral follicles

## LISTA DE FIGURA

Figura 1. Mecanismos de ação: endócrino, parácrino e autócrino.	28
Figura 2. Atuação do KL, FGF- $\beta$ , GDF-9, KGF, BMP-4, LIF, insulina, FSH e LH no folículo, através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos.	29
Figure 1. Percentages (means $\pm$ SD) of histologically normal preantral follicles in non-culture tissue (control) and in tissue cultured for one or seven days in MEM <sup>+</sup> and MEM <sup>+</sup> supplemented with different concentrations of pFSH or rFSH. * $p < 0.05$ , significantly different from non-cultured ovarian cortex tissue (control/D0). A,B Different letters in the same column denote significant differences between culture periods within the same medium ( $p < 0.05$ ). (a, b, c, d) Different letters in the same column denote significant differences among treatments in the same period ( $p < 0.05$ ).....	59
Figure 2. Histological section of (A) culture tissue with rFSH 50 ng/ml (seven days of culture) after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing normal follicles and (B) culture tissue with pFSH 100 ng/ml, showing degenerated follicles. o: oocyte; n: oocyte nucleus; gc: granulosa cells (x400).....	60
Figure 3. Percentages (mean $\pm$ SD) of primordial (A) and growing follicles (primary and secondary) (B) in non-cultured tissues and in tissues cultured for one or seven days in MEM <sup>+</sup> (control medium) and MEM <sup>+</sup> supplemented with various concentrations of pFSH or rFSH. Per treatment, 120 follicles were evaluated. * $p < 0,05$ , significantly different from non-cultured ovarian cortex tissue (control/D0). A,B Different letters in the same column denote significant differences between culture periods (one or seven days) within the same medium ( $p < 0.05$ ). a,b,c Different letters in the same column denote significant differences among treatments in the same period ( $p < 0.05$ ).....	61
Figure 4. Ultrastructural analysis of (A) a non cultured preantral follicle (5000X) and (B) a follicle cultured for seven days in medium containing 50 ng/ml rFSH (6000X). Note separation between granulosa cells and oocyte. <b>n</b> - nucleus, <b>gc</b> - granulosa cell, <b>nc</b> - nucleolus, <b>m</b> - mitochondria, <b>v</b> - vacuole, <b>arrow</b> - oocyte plasmatic membrane.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oocyte and follicle diameters (mean $\pm$ SD) in non-cultured tissues and in tissues cultured for one or seven days in MEM+ (control medium) and MEM+ supplemented with various concentrations of porcine and recombinant FSH (n = 120)... 63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	: Análise de Variância
BMP	: Proteína Morfogenética do osso
°C	: Graus Celsius
CGP	: Células Germinativas Primordiais
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
e.g.	: <i>exempli gratia</i>
EGF	: Fator de Crescimento Epidermal
FGF -2	: Fator de Crescimento Fibroblástico 2
Fig.	: Figura
FOPA	: Folículos Ovarianos Pré-Antrais
FSH	: Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	: Fator de Crescimento e Diferenciação-9
h	: Horas
HC	: Histologia Clássica
IC	: Iniciação Científica
IGF-1	: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1
KGF	: Fator de Crescimento de Keratinócitos
KL	: Kit Ligand
LAMOFOPA	: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais
LH	: Hormônio Luteinizante
LIF	: Fator Inibidor da Leucemia
MEM	: Meio Essencial Mínimo
MET	: Microscopia Eletrônica de Transmissão
min.	: Minuto
mL	: Mililitro
mm	: Milímetro
MOIFOPA	: Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
n	: Número
ng	: nanograma

pg	:picograma
Pág	: Página
PAS	: Ácido periódico de Schiff
P<0,05	: Probabilidade de erro menor do que 5%
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
SRD	: Sem Raça Definida
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
UNB	: Universidade de Brasília
µL	: Microlitro
µm	: Micrômetro
%	: Percentagem
~	: Aproximadamente
400x	: Aumento de 400 vezes

## SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA (CAPÍTULO 1).....	18
3 JUSTIFICATIVA.....	43
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	44
5 OBJETIVOS.....	45
5.1 Geral.....	45
5.2 Específicos.....	45
6 CAPÍTULO 2.....	46
7 CONCLUSÕES.....	64
8 PERSPECTIVAS.....	65
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil existem aproximadamente 10 milhões de caprinos, dos quais 90% encontram-se na região Nordeste. Esta espécie desempenha um importante papel como fonte de produtos comerciais que incluem: carne, leite e pele (IBGE, 2002). Com o intuito de maximizar o potencial reprodutivo dessa espécie, diversas biotecnologias reprodutivas vêm sendo utilizadas com sucesso, como a inseminação artificial (IA), a fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE). Outras biotécnicas vêm sendo desenvolvidas e terão, no futuro, sua aplicabilidade prática em larga escala. Nesse grupo, pode-se destacar a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).

O ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos primordiais e poucos destes folículos desenvolvem-se até o estágio pré-ovulatório (LIU et al., 2002). Desta forma, a biotécnica de MOIFOPA tem por objetivo recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, prevenindo-os, assim, da atresia ou morte folicular. Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente é um ponto crucial para a ativação, ou seja, a transição dos folículos primordiais para primários, e seu posterior crescimento *in vitro*, permitindo, assim, o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais. Esse sistema poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese inicial e no processo de atresia (FIGUEIREDO et al., 2008), bem como será, futuramente, uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais, para posterior maturação e produção *in vitro* de embriões (TELFER, 1996). Além disso, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais permite a avaliação do efeito de diferentes substâncias (hormônios, fatores de crescimento, antibióticos, etc.) na fisiologia ovariana antes do seu uso em animais ou humanos, contribuindo para o bem estar animal ou humano.

Dentre as substâncias envolvidas na foliculogênese inicial, merece destaque o Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (VAN DEN HURK et al., 1997). 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 (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 follicular *in vitro*, NUTTINCK et al. (1996) mostraram que o pFSH induz a degeneração em pequenos folículos pré-antrais bovinos. As

diferenças entre esses estudos podem, em parte, ser devido à origem e ao grau de pureza do hormônio utilizado (FSH).

Para uma melhor compreensão dos aspectos relacionados à dissertação, serão destacados na revisão de literatura a seguir os tópicos: bases gerais da oogênese e foliculogênese, população e atresia folicular, foliculogênese na fase pré-antral, métodos de estudo da foliculogênese *in vitro*, controle endócrino do ciclo estral e menstrual, papel do FSH e suas origens no cultivo folicular *in vitro* e na reprodução medicalmente assistida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA (CAPÍTULO 1)

### **Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese e sua importância na reprodução medicalmente assistida**

*Role of Hormônio Folículo Estimulante in folliculogenesis and its influence in medically assisted reproduction*

Deborah de Melo *Magalhães*<sup>1</sup>, Diego Diógenes *Fernandes*, Valdevane Rocha *Araujo*  
Anderson Pinto *Almeida*, Maria Helena Tavares *Matos*; José Ricardo de *Figueiredo*

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

<sup>1</sup> Correspondência, [dmmvet@hotmail.com](mailto: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 que está presente em todas as fases da foliculogênese, atuando direta ou indiretamente para promover o desenvolvimento folicular *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, dependendo da origem do FSH, as respostas aos tratamentos tanto *in vivo* quanto *in vitro* são diferenciadas. Neste 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 medicalmente assistida.

Palavras-chaves: Foliculogênese, FSH, reprodução medicalmente assistida.

## ABSTRACT

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 follicular development *in vivo* and *in vitro*. However, depending on the origin of FSH, responses to treatment both *in vivo* as *in vitro* are differentiated. 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 medically assisted reproduction.

Keywords: folliculogenesis, FSH, medically assisted reproduction.

## 1 Introdução

A foliculogênese, evento caracterizado pela formação, crescimento e maturação folicular, é controlada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. A ativação folicular é a primeira etapa da foliculogênese, sendo iniciada 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 antra 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 a 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 and 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 de FSH sobre o crescimento folicular *in vivo* e *in vitro* e o seu papel na reprodução medicalmente assistida.

## 2 Princípios gerais da oogênese e foliculogênese

O ovário mamífero é um órgão composto por vários tipos de células, incluindo oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana, localizadas na porção funcional do ovário, a região parenquimatosa (Silva, 2005). Já a região vascularizada, 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 dos órgãos genitais das fêmeas e

exerce duas funções fisiológicas principais: 1) Liberação de oócitos maduros (ovulação) aptos a serem fecundados (Barnett *et al.*, 2006) e 2) Produção de hormônios, fatores de crescimento e peptídeos (Hirshfield, 1991). Estas duas funções são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese.

## 2.1 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 dictióteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e os oócitos permanecem neste 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, progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e 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 neste estágio até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então, completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado.

## 2.2 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 maturação do oócito (Cortvrindt e Smits, 2001), bem como produzir hormônios como o

estrógeno, e peptídeos como inibina A e B, ativina e folistatina (Adashi, 1994). O folículo ovariano é formado por vários tipos celulares, sendo composto por um oócito circundado por células da granulosa e da teca. Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada uma vez que o oócito cresce e as células circundantes se multiplicam e 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).

### 2.2.1 Folículos Pré-Antrais

Os folículos primordiais são os menores folículos do ovário, tendo diâmetro de aproximadamente 33  $\mu\text{m}$  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. A zona pelúcida nesse estágio ainda não é evidente, sendo observada apenas uma justaposição do oócito e 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 retomada da proliferação das células da granulosa, 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 cúbicas circunda o oócito, surgem os folículos primários (Silva, 2005). Nesses folículos, a membrana plasmática do oócito penetra entre as células da granulosa adjacentes, e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária. As proteínas que irão formar a zona pelúcida já começam a ser sintetizadas (Lee, 2000). 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  $\mu\text{m}$  (Bezerra *et al.*, 1998).

Com a proliferação das células da granulosa, ocorre a formação do folículo secundário, que é caracterizado por conter 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  $\mu\text{m}$  (Bezerra *et al.*, 1998).

### 2.2.2 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 deste estágio, os folículos passam a serem 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 permeabilidade dos vasos sanguíneos (Van Den Hurk e Zhao, 2005) que ocorre com o desenvolvimento do folículo. O início da formação de antro em caprinos é observado quando os folículos possuem cerca de 130  $\mu\text{m}$  (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 que as localizadas perifericamente são classificadas como teca externa. Já as células da granulosa são diferenciadas em células do cumulus (mais 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 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).

### 3. 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, ou seja, 99,9%, não chega à ovulação, mas morre 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 LH, fatores parácrinos, incluindo o Kit Ligand (KL), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), ativina e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), também influenciam no processo de morte celular nos diferentes estádios 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).

No que se refere à atresia por degeneração, ela tem como uma das principais causas a 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 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 anti-apoptóticos determinam a morte celular (Hurwitz e Adashi, 1992).

Diante disso, visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários 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. Nos tópicos seguintes desta revisão, serão abordadas as principais características dos diferentes sistemas de cultivo folicular *in vitro*, destacando também as diversas pesquisas com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais que vêm sendo utilizadas no intuito de elucidar a foliculogênese inicial e produzir oócitos aptos a serem fecundados.

#### **4 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 primários e/ou secundários intactos 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 inclusos em gotas de colágeno (Demeestere *et al.*, 2005).

#### **5 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 (2003), os quais mostraram que é possível obter crias viáveis a partir do cultivo de oócitos oriundos de folículos pré-antrais de camundongos. 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: Huanmin 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). A 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 6 meses) (Lussier, 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 a 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 necessário mais esforços para melhorar as condições de cultivo.

## **6 Papel do FSH na reprodução de mamíferos**

Para uma melhor compreensão da influência do FSH na reprodução animal *in vivo*, será feita uma breve revisão acerca dos mecanismos endócrinos que controlam o ciclo estral e menstrual, bem como do papel do FSH no crescimento folicular inicial.

### **6.1 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. 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. As ondas pré-ovulatórias de LH e FSH duram de 6 a 12 horas e são responsáveis pela ovulação (Hafez, 1995).

#### 6.1.1 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. Este ciclo é dividido nas fases luteínica ou progesterônica, que vai da ovulação até a luteólise, compreendendo o metaestro e o diestro e, na 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 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 ausência do pico de LH (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. Deste 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). Com o auxílio da ultra-sonografia, foi possível observar a existência, predominantemente, de duas ou três ondas de desenvolvimento folicular em bovinos (Figueiredo *et al.*, 1997), e três a quatro ondas em caprinos e ovinos (Amorin *et al.*, 2007).

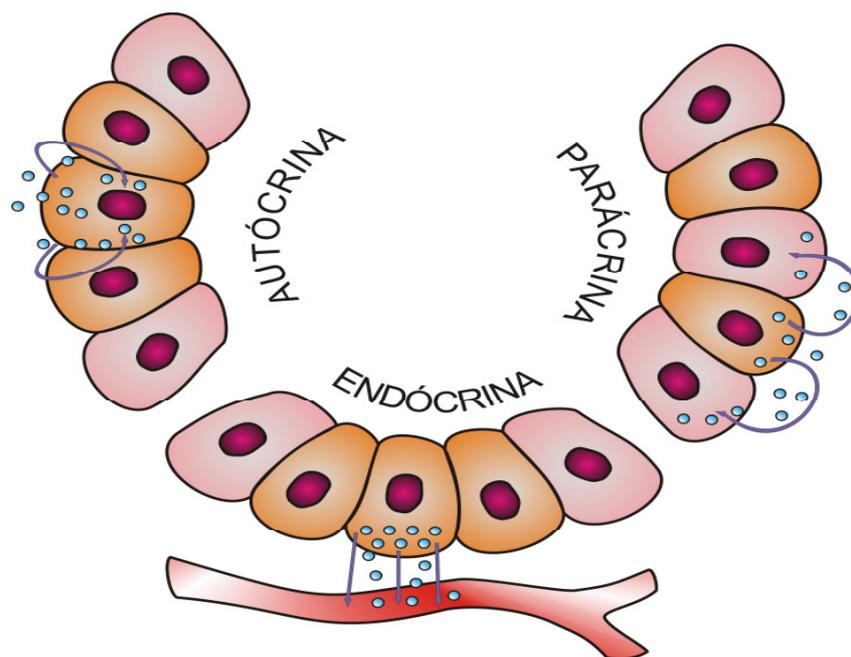
#### 6.1.2 Ciclo menstrual

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 2 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 oócito 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 deste tempo independente da ação de gonadotrofinas. Entretanto, a partir de um determinado momento, a presença de FSH se torna essencial para que a corte de folículos recrutados continue o crescimento e, aquele selecionado, atinja a ovulação (Gougeon, 1981).

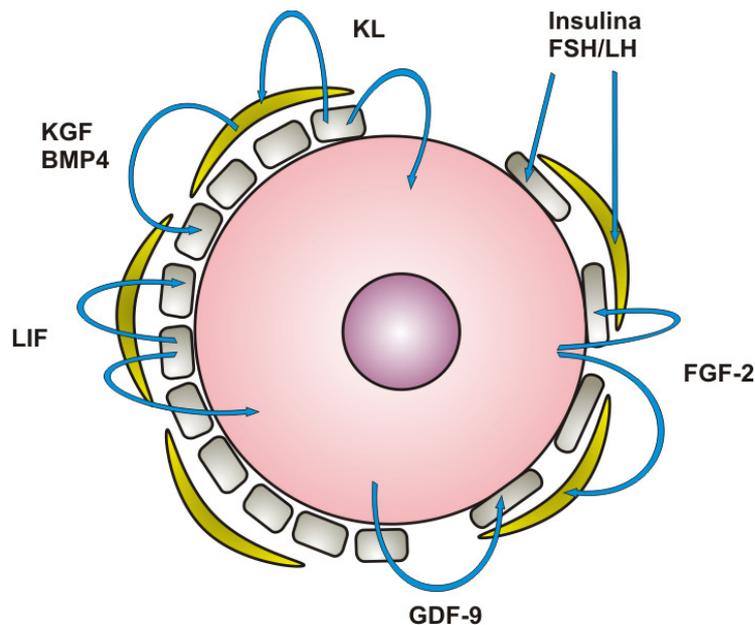
## 6.2 Papel do FSH na foliculogênese inicial

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 (Fig. 1).



**Figura 1. Mecanismos de ação: autócrino, parácrino e endócrino.**

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



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

Embora a foliculogênese pré-antral seja pouco dependente de gonadotrofinas, pode-se dizer que esta fase é responsiva ao FSH visto que receptores para esta 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).

Nas seções seguintes, será dada especial atenção aos tópicos: 1) local de expressão dos receptores de FSH no ovário, 2) importância das diferentes origens do FSH na resposta ovariana, e 3) papel essencial desta gonadotrofina na reprodução de mamíferos.

### 6.3 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). 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 da ovulação. As ações do FSH são mediadas nas células somáticas ovarianas e testiculares através de receptores específicos da superfície celular (Minj *et al.*, 2008).

O FSH atua se ligando a receptores localizados exclusivamente nas gônadas. Este receptor é do tipo acoplado à proteína G, que é dividido em três domínios: um extracelular, um transmembranário, composto por 7 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 (Tisdall *et al.*, 1995; Camp *et al.*, 1991; Tilly *et al.*, 1992a; Zheng *et al.*, 1996). Méduri (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, reforçam a idéia 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 à uma inibição da transcrição ou diminuição da estabilidade do RNAm do receptor (Tisdal *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995; Tilly *et al.*, 1992b).

#### 6.4 Origens do FSH comercial

Comercialmente, o FSH pode ser extraído através 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 células ovarianas de hamster, as quais se incorporam os genes que codificam as duas subunidades do FSH (Le Cottonnee *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 anticorpos anti-gonadotrofina coriônica humana (*human Corionic Gonadotropin* – hCG), que causavam imobilização 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 Tireo-Estimulante (TSH), prolactina e Hormônio do Crescimento (GH) (Closset e Hennen, 1989).

## 6.5 Influência do FSH na reprodução animal *in vivo* e *in vitro*

### 6.5.1 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<sup>®</sup>, Stimulfoll<sup>®</sup>, Pluset<sup>®</sup> (FSHp), Ovagen<sup>®</sup> (FSHo) e Urofolitropina (FSHu). Cada um desses fármacos contém

um grau de pureza de FSH diferente, porém todos são eficientes na função deste 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> e Foltropin<sup>®</sup> 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 o Pluset<sup>®</sup>, Andrioli *et al.* (1999) constataram que a repetição dos tratamentos superovulatórios diminuiu 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<sup>®</sup> e o Folltropin<sup>®</sup> 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).

#### 6.5.2 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 7 dias, além de estimular a ativação de folículos primordiais e o posterior crescimento folicular (Matos *et al.*, 2007). Recentemente, Magalhães *et al.* (2008),

demonstraram, que quando comparado com o FSHp, o FSHr promoveu uma maior ativação folicular durante 7 dias de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. 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 and 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 7 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 através 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 (camundongos: Spears *et al.*, 1998; vacas: Gutierrez *et al.*, 2000; cabras: Zhou e Zhang, 2005; ovelhas: Cecconi *et al.*, 1999). Outros estudos demonstraram que o FSHr, quando comparado ao FSH urinário, induz uma melhor proliferação das células da granulosa (Calongos, 2007) e uma maior produção de estradiol (Yding, 1999) em folículos pré-antrais 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 a 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 deste hormônio.

## 6.6 Influência do FSH na reprodução humana

### 6.6.1 Papel do FSH na reprodução humana medicalmente assistida

As duas principais técnicas de Reprodução Assistida, adotadas quando há dificuldade de engravidar naturalmente, são a inseminação artificial (IA) e a fecundação in

vitro (FIV). Na IA, introduz-se no aparelho reprodutor da mulher o esperma, enquanto na FIV, ocorre a fecundação do óvulo pelo espermatozóide *in vitro* (em placa de Petri) e, posteriormente, os embriões formados são introduzidos no útero da mulher. Essas duas diferentes formas de fecundação são as alternativas médicas adotadas quando há dificuldade em engravidar naturalmente.

As taxas de gestação alcançadas na fecundação *in vitro* (FIV) se devem, em parte, à estimulação ovariana, no intuito de se obter um maior número de folículos recrutados e, conseqüentemente, um maior número de oócitos 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, especialmente o FSH, 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 contra-indicações semelhantes em todos os casos. Entretanto, quando se utiliza um FSH mais puro, ocorre uma melhoria na esteroidogênese 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 FIV, 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 utilizou mulheres com idade reprodutiva avançada (em média 39 anos), o FSHu foi preferencial ao FSHr, devido a obtenção de resultados equivalentes, porém com menores custos (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 FIV) e a dose de FSH utilizada.

#### 6.6.2 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 falta de 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 indica 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 anti-apoptótico e mitogênico (Wright *et al.*, 1999). Otała *et al.* (2002) também observaram que, em um cultivo de folículos pré-antrais contendo FSH com duração de 3 semanas, houve um aumento no percentual de folículos atrésicos 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 6 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).

### 7 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 FIV em animais domésticos e humanos. Além disso, nos últimos anos, várias pesquisas desenvolvidas em muitos 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.

## 8 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. *Histology and Histopathology*, v.21, p.887-898, 2006.
- Adashi EY.** Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, 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.338-43, 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 Scientiae Veterinariae*, Nova Odessa-SP, 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 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. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences*, v.36, p.1-16, 1999.
- Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA.** Characterization of Ovarian Follicular Wave Dynamics in Women. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1023-1031, 2003.
- Baker SJ, Spears N.** Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility Abstr Ser*, v.19, p.21, 1997.
- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.255-66, 2004.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, p.366-71, 1999.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA.** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 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. *Ciência Animal*, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, 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*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 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. *Fertility and Sterility*, in press, 2007.
- 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. *Biology of Reproduction*, v.60, p.594-601, 1999.
- Closset J, Hennen G.** Biopotency of highly purified porcine FSH and human LH on gonadal function. *Journal of Endocrinology*, v.120, p.89-96, 1989.
- Cognie Y.** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-16, 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. *Human Reproduction*, v.23, p.310-315, 2008.
- Cortvrindt R, Smitz JEJ.** *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animal*, v.36, p.3-9, 2001.
- Daniel SAJ, Armstrong DT, Gorelangton RE.** Growth and development of rat oocytes *in vitro*. *Gamete Research*, v.24, p.109-21, 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.517-20, 1995.
- 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.
- 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.
- 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. *Domestic Animal Endocrinology*, v.23, p.211-228, 2002.
- Domini P, Puzooli 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 and 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. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 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 RA, Barros CM, Pinheiro OL, Sole JMP.** Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.
- Filicori M, Tabare C, Casadio P. et al.** Interaction between menstrual cyclicity and gonadotropin pulsatility. *Hormone Research*, v.49, p.169, 1998.
- Fortune JE.** Ovarian follicular growth and development in mammal. *Biology Reproduction*, v.50, p.225-232, 1994.
- Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srsen V.** Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. *Theriogenology*, v.49, p.441-449, 1998.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.135-163, 2003.
- Gordon I.** Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: Raven Press, p.4349, 1994.
- Gougeon A.** Rate of follicular growth in the human ovary. In: *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Reinier De Graaf Symposium*. Amsterdam, 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*. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- Hafez ESE.** *Reprodução Animal*. 6<sup>o</sup> Edição. Editora Manoele. Capítulo 14. p.319-333, 1995.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, v.124, p.43-101, 1991.
- Hsu SY, Hsueh AJ.** Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiological Reviews*, 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. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 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.342-53, 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.669-78, 1994.
- Lee VH.** Expression of Rabbit Zona Pellucida-1 Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. *Biology of Reproduction*, v.63, p.401, 2000.
- Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens, Smitz J.** A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biology of Reproduction* v.71, p.1730-1738, 2004.
- Lucci CM, Amorim CA, Bao SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva J.R, Gonalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.56, p.39-49, 1999.
- Lucci CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo R, Bao N.** Light microscopical and ultrastrutural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v.41, p.61-69, 2001.
- Lunenfeld B, Menzi A, Volet B.** Clinical effects of human postmenopausal gpnadotropin. *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. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.307-320, 1996.
- Magalhoes DM, Araujo VR, Lima-Verde IB, Matos MHT, Silva RC, Lucci CM, Bao SN, Campello CC, Figueiredo JR.** Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability *in vitro*. *In: II International Symposium on animal biology of reproduction*, 2008.
- Mao J, Wu G, Smith MF, Mccauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN.** Effects of culturemedium, serumtype, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. *Biol. Reprod.* v.67, p.1197-203, 2002.
- Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha Jr CMC, Lima-Verde IB, Lucci CM, Bao SN, Figueiredo JR.** Growth and Differentiation Factor -9 stimulates goat primordial follicles activation *in vitro* and the progression to secondary follicles. *Reproduction, Fertility and development*, v.20, p.916-924, 2008.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia Jr JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bao 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.173-82, 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.2417-24, 1997.
- McNatty KP, Hudson NL, Ball K, Mason A, Simmons MH.** Superovulation and embryo recovery in goats treated with Ovagen and Folltropin. *New Zealand Veterinary Journal* v.37, p.27-29, 1989.
- Meduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H.; Migrom, E.** Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *The Journal of Clinical. Endocrinology & Metabolism*, 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*). *General and Comparative Endocrinology*, 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. *Fertility and Sterility*, v.85, p.1398-1403, 2006.
- Monniaux D, Mariana JC, Cognié Y, et al.** Contrôle 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.
- 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.
- 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. *Biology of Reproduction*, v.68, p.1682-1686, 2003.
- Otala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjoberg J, Suikkari AM, Pentikainen V, Dunkel L.** Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproduction* 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*. *Molecular Human Reproduction*, 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*. *Journal of reproduction and fertility*, 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, p.6, 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- $\beta$  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.
- Roy SK, Treacy BJ.** Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Steril.*, v.59, p.783-90, 1993.
- Sadeu JC, Cortvrintd R, Ron-El R, Kastertein E, Smitz J.** Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, 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, 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.
- Silva JRV.** Growth factors in gota ovarios and the role of activina-A in the development of esrly-staged follicles. *Phd Thesis Utrecht University*, Faculty of Veterinary Medicine, p.142, 2005.
- 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.
- Sirois J, Fortune JE.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by realtime ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v.39, p.308-317, 1988.
- Spears N, Murray AA, Alisson V, Boland NI, Gosden RG.** Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 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 Research*, 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, 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, 1992a.
- 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, 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, Bevers MM, Beckers JF.** In vivo and *in vitro* development of follicles preantral. *Theriogenology*, v. 47, p. 73-82, 1997.
- Van Den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction Update*, v.5, p.457-474, 2000.
- 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. *Journal of Assisted Reproduction Genetic*, v.21, p.301-306, 2004.

- Zhao J.** Development of rat preantral follicles *in vitro*. *PhD thesis, Utrecht University, The Netherlands*, 2000.
- 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. *Domestic Animal Endocrinology*, 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. *Human Reprod.*, v.14, p.1555–62, 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.1579–85, 2001a.
- Wu J, Emery BR, Carrel DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol. Reprod.*, v.64, p.375–81, 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. *Molecular Human Reproduction*, v.5, p.726–31, 1999

### 3 JUSTIFICATIVA

A MOIFOPA é uma biotécnica que tem permitido a recuperação de dezenas a milhares de folículos primordiais a partir de um único ovário, com o intuito de evitar a grande perda folicular que, normalmente, ocorre *in vivo*. Tais folículos poderão ser utilizados em programas de maturação e fecundação *in vitro*, transferência de embriões e/ou criopreservação. Sabendo-se do grande valor econômico que a espécie caprina representa para o Nordeste brasileiro, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de ativar esses folículos e assegurar seu posterior crescimento e maturação, otimizando o aproveitamento do potencial oocitário desses animais e incrementando a eficiência da reprodução animal. Neste contexto, diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo de folículos pré-antrais tanto de animais de laboratório como animais domésticos como vaca, cabra, ovelha. Apesar dos fatores reguladores da foliculogênese inicial ainda não serem totalmente conhecidos, sabe-se que fatores endócrinos e, principalmente, fatores parácrinos estão envolvidos nessa fase. O FSH é um crítico regulador da função ovariana e embora os seus receptores não estejam presentes em folículos primordiais, esse hormônio atua indiretamente no desenvolvimento folicular inicial. O efeito do FSH no cultivo de folículos pré-antrais é bastante controverso, tal fato pode, em parte, ser devido à origem e ao grau de pureza do hormônio utilizado (FSH). Desta forma, torna-se essencial um estudo que compare diferentes origens e pureza do FSH no cultivo de folículos pré-antrais.

Este trabalho será direcionado para o estudo da população de folículos pré-antrais, os quais compreendem cerca de 90 a 95% da população folicular do ovário. Todavia, para que os folículos primordiais entrem na fase de crescimento, é necessário que sejam ativados, isto é, ocorra a retomada da proliferação das células da granulosa e o aumento do volume citoplasmático do oócito. Neste sentido, é de suma importância o desenvolvimento de sistemas de cultivo eficientes capazes de ativar os folículos e assegurar o seu crescimento. A contribuição deste trabalho é o estudo do papel das diferentes origens de FSH (recombinante e hipofisário) e pureza deste hormônio na foliculogênese inicial. Para este fim, além da técnica de histologia clássica, será empregada a microscopia eletrônica de transmissão para determinar a qualidade de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* e, conseqüentemente, melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivos testados.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

A origem e a pureza do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) influenciam na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

## **5 OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

- Avaliar o efeito de diferentes origens, pureza e concentrações do FSH no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do FSH hipofisário e recombinante na sobrevivência, ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos;
- Analisar morfológica e ultra-estruturalmente os folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ* com FSH de diferentes origens e pureza.

## 6 CAPÍTULO 2

Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*

Diferentes origens do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) influenciam a viabilidade e o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos

Magalhães, D.M.<sup>a\*</sup>; Araújo, V.R.<sup>a</sup>; Lima-Verde, I.B.<sup>a</sup>, Msc; Matos, M.H.T.<sup>a</sup>, Phd; Silva, R.C.<sup>b</sup>, Lucci, C.M.<sup>b</sup>, Phd; Bão, S.N.<sup>b</sup>, Phd; Campello, C.C.<sup>a</sup>, Phd; Figueiredo, J.R.<sup>a</sup>, Phd

<sup>a</sup> Faculty of Veterinary Medicine, LAMOFOPA, PPGCV, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil, <sup>b</sup>Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

\*Corresponding address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)  
Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)  
Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi.  
Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60740-000  
Tel.: +55.85.33101.9840; Fax: +55.85.33101.9840  
E-mail address: [dmmvet@hotmail.com](mailto:dmmvet@hotmail.com) (D.M. Magalhães)

(Artigo submetido para o periódico Brazilian Journal of Veterinarian Science and Animal Research)

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of pituitary (pFSH) or recombinant (rFSH) FSH on the survival and growth of caprine preantral follicles. Caprine ovarian tissues were *in vitro* cultured for one or seven days in Minimum Essential Medium (MEM) containing 0, 10, 50, 100 and 1000 ng/ml of pFSH or rFSH. Control tissues (non-cultured) and those cultured were processed for histological and ultrastructural studies. In addition, follicular and oocyte diameter were analysed. After seven days of culture, only 50 ng/ml of rFSH maintained the percentage of normal follicles similar to control. Moreover, 10 ng/ml of pFSH and all the concentrations of rFSH promoted primordial follicle activation. In addition, the presence of 50 ng/ml of rFSH promoted the highest follicular diameter at day seven of culture. In conclusion, 50 ng/ml of rFSH maintained the ultrastructural integrity of caprine preantral follicles, promoted primordial follicle activation and further growth of cultured follicles.

Keywords: caprine; FSH; growth; preantral follicles

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do FSH pituitário (pFSH) ou recombinante (rFSH) sobre a sobrevivência e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos. O tecido ovariano foi cultivado *in vitro* por um ou sete dias em Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo 0, 10, 50, 100 e 1000 ng/ml de pFSH ou rFSH. O grupo controle (não cultivado) e aqueles cultivados foram processados para análises histológica e ultra-estrutural. Além disso, os diâmetros folicular e oocitário foram avaliados. Após sete dias de cultivo, apenas 50 ng/ml de rFSH manteve o percentual de folículos normais semelhante ao controle. Além disso, 10 ng/ml de pFSH e todas as concentrações de rFSH promoveram ativação de folículos primordiais. A presença de 50 ng/ml de rFSH promoveu o maior diâmetro folicular após sete dias de cultivo. Em conclusão, 50 ng/ml de rFSH manteve a integridade de folículos pré-antrais caprinos e promoveu a ativação e o crescimento dos folículos cultivados.

Palavras-chaves: caprinos, FSH, crescimento folicular, folículos pré-antrais

## 1. Introduction

Reproductive techniques, as preantral follicles *in vitro* culture, are important to the achievement of a large amount of oocytes to be used in *in vitro* embryo production system. Some authors showed that it is possible to produce live offspring<sup>1</sup> or embryos of rat<sup>2</sup>, porcine<sup>3</sup> and bubalines<sup>4</sup> through the culture of oocytes from preantral follicles. Although the factors that regulate early folliculogenesis are not yet completely established, it is well-known that paracrine and endocrine factors are involved in this phase. Among the endocrine factors, Follicle Stimulating Hormone (FSH) is a heterodimeric glycoprotein synthesized and secreted by the anterior pituitary gland. It is composed by two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , being the  $\beta$ -subunit that confers biological specificity to the hormone<sup>5</sup>. The oligosaccharides attached to the FSH molecule form a variety of isoforms and the acidic isoforms were found to have a reduced bioactivity compared with the less acidic ones<sup>6</sup>. Although FSH receptors are expressed in granulosa cells<sup>7</sup> from primary follicles stage onward<sup>8</sup>, this hormone may act indirectly in the primordial follicles through paracrine factors secreted by larger follicles or stroma cells.

Some *in vitro* studies have demonstrated that the addition of FSH to the culture medium promotes the maintenance of viability and preantral follicles growth in caprine<sup>9</sup>, as well as antrum formation in different species<sup>10,11,12</sup>. However, the effect of FSH in the *in vitro* follicular culture depends on differences among some factors, such as species, purity degree of commercial preparations of FSH and different *in vitro* culture systems. Furthermore, it was hypothesized that not only the quantity but also the source and the quality of FSH, in terms of isoforms and purity, plays an important role in the early follicular phase<sup>6</sup>.

FSH can be extracted from (1) the urine of postmenopausal women, consisting in human menopausal gonadotropin (hMG), (2) pituitary extract of domestic animals, essentially swine (pFSH) and ovine (oFSH), followed by hormone purification, and (3) recombinant technology using Chinese hamster ovary cells<sup>13</sup>. Recombinant DNA technology for FSH production has been successfully used in the programs of controlled ovarian stimulation in human assisted reproduction<sup>14</sup>. Although its high cost, recombinant FSH (rFSH) is a more pure and homogeneous hormone<sup>13</sup>, which could propitiate a higher efficacy in the results of follicular growth. Regarding pFSH, even after purification, its final product has a small percentage of contamination by others pituitary hormones, such as Luteinizing (LH) and Thyroid Stimulating Hormone (TSH)<sup>15</sup>. Recently, authors demonstrated that rFSH is more efficient than urinary FSH in the growth of *in vitro* cultured murine preantral follicles<sup>16</sup>. Other study reported that rFSH increases oocyte maturation rates due to a better affinity to their

receptors<sup>17</sup>. In addition, authors verified that, in the presence of rFSH, there was a larger cumulus expansion and a better embryos quality after maturation than using pFSH<sup>13</sup>. However, the effects of different commercial preparations of FSH on the survival, activation and growth of caprine preantral follicles are not known. Furthermore, for evaluation of the preantral follicles morphology, most studies are based on histological evaluation, being important the use of ultrastructural analysis to confirm follicular integrity. Then, the present study aims to compare the effect of different sources (pituitary or recombinant) of FSH on the survival, activation and growth of preantral follicles enclosed in caprine ovarian cortex after *in vitro* culture.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Source and preparation of ovarian tissue

Ovaries (n = 8) from 4 adult (1 – 3 years old), mixed-breed goats were obtained at a local slaughterhouse. Immediately after slaughter, the ovaries were removed, washed in 70% alcohol followed by two times in minimum essential medium (MEM) supplemented with 100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The material was transported in thermo flasks at 4 °C to the laboratory within 1 hour.

### 2.2. Caprine ovarian tissue culture

Our organ culture system was described in detail earlier (Matos et al. 2007). Ovarian tissue samples from each ovarian pair were cut in 21 fragments of approximately 3 × 3 mm (1 mm thick). One fragment (non-cultured control) was immediately fixed in Carnoy's fluid for 12 h for histological studies, while a smaller fragment (1 mm<sup>3</sup>) was randomly collected and subsequently fixed in paraformaldehyde 2% and glutaraldehyde 2.5% in sodium cacodylate buffer 0.1 M (pH 7.2) for ultrastructural examination. The other fragments of ovarian cortices were individually *in vitro* cultured in 1 ml of culture medium for one or seven days at 39°C with 5% CO<sub>2</sub> in air using a 24-well culture dish. The control medium was MEM supplemented with ITS (insulin 6.25 µg/ml, transferrin 6.25 µg/ml and selenium 6.25 ng/ml), 0.23 mM pyruvate; 2 mM glutamine; 2 mM hypoxanthine and 1.25 mg/ml BSA, called MEM<sup>+</sup>. This control medium was tested alone (cultured control) or supplemented with different concentrations (10, 50, 100 or 1000 ng/ml) of pFSH (Folltropin<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil) or recombinant bovine FSH (rFSH<sup>®</sup>, Nanocore, Brasil). All chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co., unless otherwise indicated. Every 2 days,

the culture medium was replaced by fresh medium and each treatment was repeated four times.

### 2.3. Histological examination and assessment of *in vitro* follicle growth

To evaluate the morphology of caprine follicles after one or seven days of culture, after fixation, the tissue fragments were dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. For each piece of ovarian cortex, 7  $\mu\text{m}$  sections were mounted on slides, stained with periodic acid Schiff and hematoxylin and examined by light microscopy (Zeiss, Jena) at 100 $\times$  and 400 $\times$  magnification.

The follicles were classified as described by Hulshof et al.<sup>18</sup> in primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) and growing follicles i.e. primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte) or secondary (oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells). Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, which have a pyknotic nucleus and/or are surrounded by disorganized granulosa cells, which are detached from the basement membrane. From each medium and each culture period, 120 follicles were randomly evaluated. To evaluate follicular activation and growth, only intact follicles with a visible oocyte nucleus were recorded and the proportion of primordial and growing follicles were calculated at day 0 (control) and after one or seven days of culture in the various media tested. To avoid counting a follicle more than once, preantral follicles were counted only when the oocyte nucleus was visible. Oocyte and follicle diameters before and after culture were analysed with the aid of an ocular micrometer.

### 2.4. Ultrastructural analyses

For ultrastructural analysis, after fixation, the fragments were washed with sodium cacodylate buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM  $\text{CaCl}_2$  in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Subsequently, samples were in bloc contrasted with uranyl acetate, dehydrated in a graded series of acetone and embedded in Spurr's epoxy resin. The follicles classified as histologically normal in the semi-thin sections stained with toluidin blue (3  $\mu\text{m}$ ) were submitted to ultrastructural analysis. For that purpose, ultra-thin sections (70 nm) were cut on an ultramicrotome (Reichert Supernova, German) and examined using a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron microscope, operating at 80 kV.

### 2.5. Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests were applied to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Analysis of variance was made using GLM procedure of SAS (1999) and Dunnett's test was applied for comparison of control

groups against each treatment tested. Student Newman Keuls' (SNK) test was used to compare percentages of surviving primordial or growing follicles among treatments and days of culture. Because of the higher coefficient of variation observed on follicles and oocytes diameters, Duncan's test was applied to compare treatments tested, whilst Student's t-test was used to compare means between days of culture. Differences among groups were considered significant when  $p < 0.05$  and results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD).

## Results

### Effect of FSH source and culture periods on preantral follicle survival

A total of 2.280 caprine preantral follicles were analysed to verify follicular morphology. The percentage of viable follicles in non-cultured and cultured ovarian cortices is shown in Figure 1. After one day of culture, it was observed a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of normal follicles in treatments tested compared to control (80%), except when follicles were cultured in 10 and 50 ng/ml of rFSH ( $P > 0.05$ ). In addition, after seven days of culture, the percentage of histologically normal follicles was similar ( $P > 0.05$ ) to control only when 50 ng/mL of rFSH (70.83%) was used. Furthermore, only 10 and 50 ng/ml of rFSH showed percentages of normal follicles significantly higher ( $P < 0.05$ ) than MEM (52.5%) at day seven. With the progression of the culture from one to seven days, there was a decrease ( $P < 0.05$ ) in follicular viability in MEM<sup>+</sup> alone, pFSH 50 and 1000 ng/ml, as well as in rFSH 10 and 1000 ng/ml. Figure 2 presents normal caprine preantral follicles after seven days of culture with 50 ng/ml of rFSH, showing oocyte and granulosa cells integrity.

### Goat primordial follicle activation during *in vitro* culture

The percentages of primordial and growing follicles in non-cultured cortices were 83.3 and 16.7%, respectively (Figure 3). After one day of culture, a significant reduction in the percentage of primordial follicles (Figure 3A;  $P < 0.05$ ) concomitant with a significant increase in the percentage of growing follicles (Figure 3B;  $P < 0.05$ ) were observed in all hormone-treated fragments when compared to control. On the other hand, it has not occurred to samples culture with MEM<sup>+</sup> alone. Comparing results obtained after one and seven days of culture, MEM<sup>+</sup> alone or the addition of 10 ng/ml of pFSH and all the concentrations of rFSH significantly decreased the percentage of primordial follicles (Figure 3A;  $P < 0.05$ ) and increased the percentage of growing follicles (Figure 3B;  $P < 0.05$ ). Furthermore, when comparisons were done among treatments at day seven, all rFSH concentrations had higher percentages of growing follicles ( $P < 0.05$ ) than MEM<sup>+</sup> alone.

### *In vitro* growth of goat preantral follicles with FSH

Follicular and oocyte diameters are shown in Table 1. After seven days of culture, a significant increase ( $P < 0.05$ ) in follicular diameter was seen in follicles cultured with MEM<sup>+</sup> alone or containing 50 or 100 ng/ml of rFSH when compared to non-cultured tissue (control). In addition, the presence of 50 ng/ml of rFSH promoted the highest follicular diameter ( $P < 0.05$ ) at day seven of culture. Furthermore, only follicles cultured in the presence of 50 ng/ml rFSH increased follicular diameter from day one to seven ( $P < 0.05$ ). With the increase of the culture period from day one to day seven, there was a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in oocyte diameter after culture with 100 ng/ml of pFSH ( $P < 0.05$ ). At day seven, oocyte diameters were significantly higher in 1000 ng/ml pFSH and 50 rFSH when compared to all other pFSH concentrations, 1000 ng/ml rFSH and MEM<sup>+</sup> alone.

### Ultrastructural analysis of *in vitro* cultured goat preantral follicles

Based on histological results, TEM studies were performed in non-cultured follicles (control, Figure 4A) and in follicles cultured for seven days in MEM<sup>+</sup> plus 50 ng/ml rFSH (Figure 4B). Follicles cultured for seven days in MEM<sup>+</sup> plus 50 ng/ml rFSH had ultrastructure very similar to control follicles. Both follicles showed intact basal and nuclear membranes, nucleus with descondensed chromatin, some vesicles and organelles uniformly distributed in the cytoplasm, with predominantly mitochondrias. The granulosa cells were normal, with alongated nucleus and a high proportion nucleus-cytoplasm. However, cortical tissues cultured with 50 ng/ml rFSH for seven days, showed granulosa cells discreetly detached from the oocyte.

### Discussion

In this study, different sources of FSH (pituitary and recombinant) were compared to evaluate the influence of this hormone on caprine preantral follicles survival and growth *in vitro*. Although the two preparations are produced from different origins, they were tested in the same concentrations (10, 50, 100 or 1000 ng/ml). Our results demonstrated that, after seven days of culture, only rFSH at 50 ng/ml did not differ from control (non-cultured tissues) in relation to the percentage of normal follicles. On the other hand, in all concentrations tested, pFSH reduced the percentage of normal follicles after seven days. This result may be due to the fact that pFSH, a pituitary hormone, used in this study has trace contaminants of LH activity (approximately 5.25:1) and rFSH is a pure preparation. One of the most important factors that alter hormone bioactivity is the purity degree after the preparation<sup>15</sup>. Thus, this experiment showed that the higher the FSH purity the better the

efficiency of this hormone in the maintenance of preantral follicle viability after *in vitro* culture. According to some authors, LH alone or associated with FSH resulted in degeneration of caprine preantral follicles cultured *in vitro*<sup>19</sup>. Some authors also observed that rFSH<sup>20,21</sup> and pFSH<sup>9</sup> maintained viability and inhibit apoptosis of *in vitro* cultured preantral follicles in different species. Adversely to the benefic effects of FSH on follicular development, authors showed that pFSH induced degeneration in small bovine preantral follicles<sup>22</sup>. These contradictions may be due to differences between species, hormone sources and concentrations, as well as experimental design used in the culture.

In our study, addition of any concentration of rFSH, as well as 10 ng/ml of pFSH, increased the primordial follicle activation rates from day one to seven of culture. It is well-known that FSH is essential for normal follicular development until the preovulatory stages as well as for inducing its own receptors and LH receptors in granulosa cells<sup>23</sup>. Authors reported that FSH stimulates the expression of some growth factors<sup>24</sup> such as Kit Ligand<sup>25</sup>, which is important for the regulation of early folliculogenesis. In the present study, the best results of activation obtained with rFSH may be due to the hormone purity, providing a higher efficacy. Moreover, evidences showed that different isoforms have differential capability to bind to target-cell receptors and to evoke biological responses<sup>26</sup>. Thus, rFSH has less acidic isoforms, which bind to FSH receptors with a higher affinity, resulting in the increase in hormone bioactivity<sup>16</sup>. Other studies demonstrated that rFSH, when compared to urinary FSH, induces better proliferation of granulosa cells<sup>16</sup> as well as estradiol production<sup>27</sup>.

In the present study, the highest increase in follicular diameter was obtained when the follicles were cultured in the presence of 50 ng/ml of rFSH. Others authors also demonstrated that rFSH increased bovine follicular and oocyte diameters after culture for thirteen days<sup>28</sup>. In addition, others authors reported that the expression of FSH receptors developed progressively during the transition from primordial to primary and secondary follicles<sup>8</sup>. The presence of FSH receptors in granulosa cells suggests that FSH can promote follicular development and growth. Furthermore, the results from this study are important to assisted reproduction programs since FSH has been extensively used in female infertility treatment. Although its high cost, clinicians and couples may still prefer to use rFSH for reasons such as improvement in follicular growth and viability. On the other hand, in our study, pFSH (100 ng/ml) promoted a reduction in follicular diameter from day one to seven of culture. We suggest that this occurs due to oocyte degeneration from large preantral follicle during the culture period, since in the preantral phase, the oocyte is more sensitive to degeneration than granulosa cells<sup>29</sup>.

Transmission electron microscopy was used as a qualitative and supplementary technique to evaluate follicular integrity after *in vitro* culture. In the present study, preantral follicles of non-cultured control and those cultured for seven days with rFSH 50 ng/ml appeared ultrastructurally normal, which confirmed the results obtained in the histological studies, although cortical tissues cultured with 50 ng/ml rFSH for seven days showed granulosa cells separated from the oocyte. This find was also observed in porcine preantral follicle cultured *in vitro* (Lucci, personal communication), and it does not necessarily indicate follicular degeneration.

In conclusion, this study showed that 50 ng/ml of rFSH maintained the ultrastructural integrity of caprine preantral follicles and promoted primordial follicles activation and further growth of follicles cultured for seven days.

#### Acknowledgment

Deborah de Melo Magalhães is a recipient of a grant from CNPq (Brazil). This work was supported by CNPq, FINEP, RENORBIO and Pronex. The authors thank Tecnopec for the kindly donation of pituitary FSH tested in this study and Nanocore for donation of recombinant FSH.

#### References

1. Eppig JJ, Schroeder AC: Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. **Biology Reproduction**, v.41, p.268-76, 1989.
2. Daniel SAJ, Armstrong DT, Gorelangton RE: Growth and development of rat oocytes *in vitro*. **Gamete Research**, v.24, p.109-21, 1989.
3. Wu J, Emery BR, Carrel DT: *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology Reproduction**, v.64, p.375–81, 2001.
4. 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.
5. Borromeo V, Amsterdam A, Berrini A, Gaggioli D, Dantes A, Secchi C: Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. **General and Comparative Endocrinology**, v.139, p.179-89, 2004.

6. Smeenk MJ, Braat DM, Kremer AM, Sweep CGJ, Thomas MG: Follicle-stimulating hormone isoforms are not useful as pretreatment predictors of outcome in in vitro fertilization: a pilot study. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1519-22, 2006.
7. O'Shaughnessy PJ, Dudley K, Rajapaksha WR: Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.125, p.169–75, 1996.
8. Oktay K, Briggs D, Gosden RG: Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.82, p.3748–51, 1997.
9. Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia Jr JE, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bao 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.173-82, 2007.
10. Spears N, Murray AA, Alisson V, Boland NI, Gosden RG: Role of gonadotropins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.19–26, 1998.
11. Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli, M: In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology Reproduction**, v.60, p. 594–601, 1999.
12. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R: Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology Reproduction**, v.62, p1322-28, 2000.
13. 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. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.14, p.1-12, 2003.
14. Out JH, Mannaerts BMJL, Driessen SGAJ, Bennink HJTC: Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: More oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. **Human Reproduction**, v.2, p.162–71, 1996.
15. Closset J, Hennen G: Biopotency of highly purified porcine FSH and human LH on gonadal function. **Journal of Endocrinology**, v.120, p.89–96, 1989.
16. 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. **Fertility and Sterility**, *in press*, 2007.

17. Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR: Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. **Endocrinology**, v.132, p.351-56, 1993.
18. Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF: Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.
19. Saraiva MVA, Celestino JJH, Chaves RN, Martins FS, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MHT, Silva GM, Porfirio EP, Bão SN, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR: Influence of different concentrations of LH and FSH on caprine primordial ovarian follicle development in vitro. **Small Ruminant Research** 78, p. 87-95, 2008.
20. Baker SJ, Spears N: Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles in vitro. **Jornal of Reproduction and Fertility Abstr Ser**, v. 19, p. 21, 1997.
21. Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC: Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. **Human Reproduction**, v.12, p.759-68, 1997.
22. 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.
23. Chen L, Rusell P, Larsen W: Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. **Biology Reproduction**, v.51, p.290-95, 1994.
24. Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ: Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, v.214, p.342-53, 1999.
25. Eppig JJ: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v.122, p.829-38, 2001.
26. Walton WJ, Nguyen VT, Butnev VY, Singh V, Moore WT, Bousfield GR: Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated  $\beta$ -subunit in addition to the conventional glycosylated  $\beta$ -subunit. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.3675-85, 2001.
27. 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. **Molecular Human Reproduction**, v.5, p.726-31, 1999.

28. Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H: Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology Reproduction**, v.67, p.1099–105, 2002.
29. Silva JRV, Ferreira MAL, Costa SHF, Santos RR, Carvalho FCA, Rodrigues APR, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v.43, p.203-9, 2002.

### Figure captions

Figure 1. Percentages (means  $\pm$  SD) of histologically normal preantral follicles in non-culture tissue (control) and in tissue cultured for one or seven days in MEM<sup>+</sup> and MEM<sup>+</sup> supplemented with different concentrations of pFSH or rFSH. \* $p < 0,05$ , significantly different from non-cultured ovarian cortex tissue (control/D0). *A, B* Different letters in the same column denote significant differences between culture periods within the same medium ( $p < 0.05$ ). (*a, b, c, d*) Different letters in the same column denote significant differences among treatments in the same period ( $p < 0.05$ ).

Figure 2. Histological section of (A) culture tissue with rFSH 50 ng/ml (seven days of culture) after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing normal follicles and (B) culture tissue with pFSH 100 ng/ml, showing degenerated follicles. **o**: oocyty; **n**: oocyte nucleus; **gc**: granulose cells (x400).

Figure 3. Percentages (mean $\pm$ SD) of primordial (A) and growing follicles (primary and secondary) (B) in non-cultured tissues and in tissues cultured for one or seven days in MEM<sup>+</sup> (control medium) and MEM<sup>+</sup> supplemented with various concentrations of pFSH or rFSH. Per treatment, 120 follicles were evaluated. \* $p < 0,05$ , significantly different from non-cultured ovarian cortex tissue (control/D0). *A, B* Different letters in the same column denote significant differences between culture periods (one or seven days) within the same medium ( $p < 0.05$ ). *a, b, c* Different letters in the same column denote significant differences among treatments in the same period ( $p < 0.05$ ).

Figure 4. Ultrastructural analysis of (A) a non cultured preantral follicle (5000X) and (B) a follicle cultured for seven days in medium containing 50 ng/ml rFSH (6000X). Note separation between granulosa cells and oocyte. **n**- nucleus, **gc**- granulosa cell, **nc**- nucleulus, **m**- mitochondria, **v**- vacuole, **arrow**- oocyte plasmatic membrane.

Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro* (p.6; line 147)

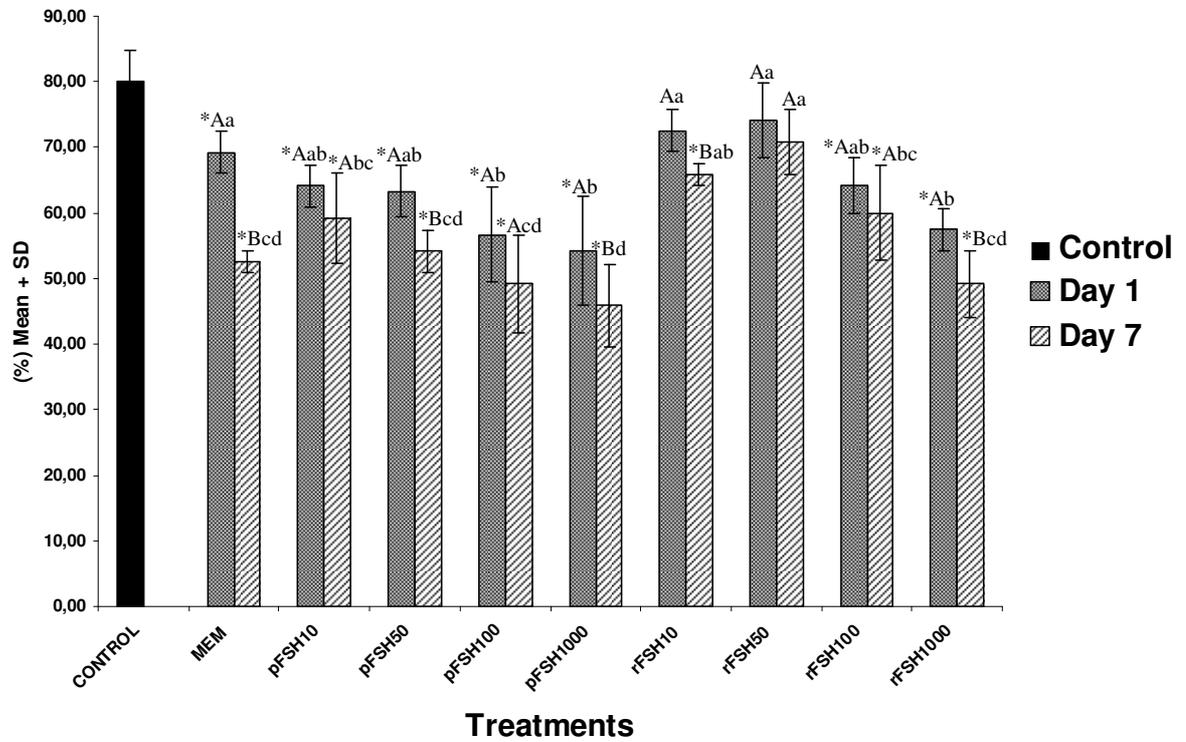
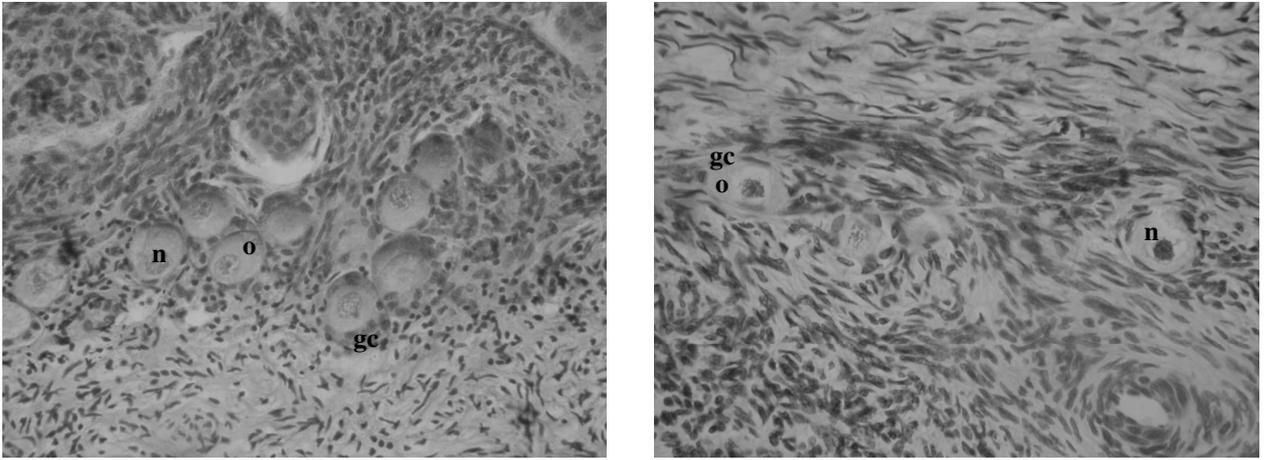


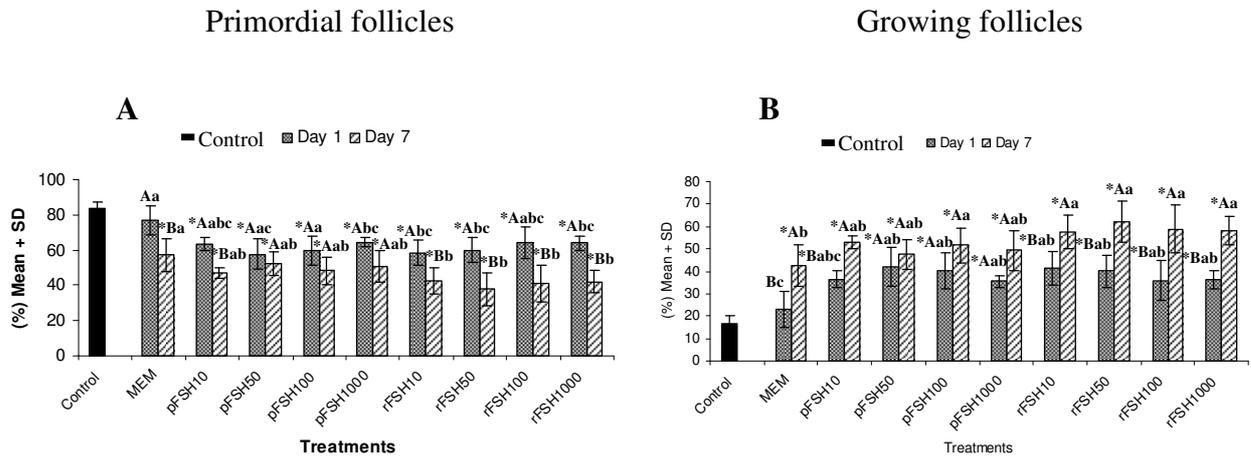
Figure 1.

Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro* (p.6; line 154)



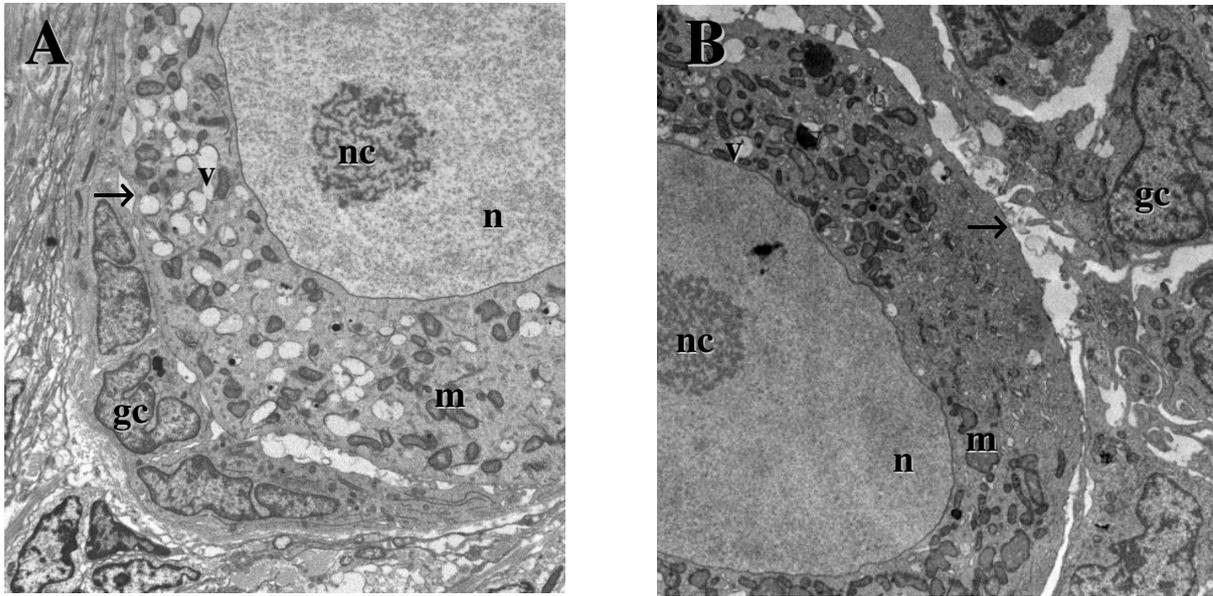
**Figure 2.**

Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro* (p.6; line 158)



**Figure 3.**

Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro* (p.7; line 176; 177)



**Figure 4.**

Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro* (p.7; line 167)

**Table 1. Oocyte and follicle diameters (mean±SD) in non-cultured tissues and in tissues cultured for one or seven days in MEM+ (control medium) and MEM+ supplemented with various concentrations of porcine and recombinant FSH (n = 120).**

	Oocyte diameter µm	Follicle diameter µm
Non-cultured (day 0)	55.00 ± 7.74	80.65 ± 11.73
Cultured (Day 1)		
MEM+	57.78 ± 4.38 Ac	86.21 ± 13.48 Aa
pFSH 10	64.58 ± 7.95*Aab	95.30 ± 14.47*Aa
pFSH 50	64.53 ± 8.45*Aab	93.01 ± 13.14*Aa
pFSH 100	66.71 ± 7.41*Aab	89.27 ± 14.10 Aa
pFSH 1000	68.17 ± 8.99*Aa	90.91 ± 14.10 Aa
rFSH 10	64.89 ± 8.14*Aab	93.51 ± 14.00*Aa
rFSH 50	67.98 ± 8.68*Aa	93.04 ± 12.71*Ba
rFSH 100	64.58 ± 8.96*Aab	89.45 ± 14.29 Aa
rFSH 1000	63.44 ± 8.26*Aab	91.93 ± 11.07*Aa
Cultured (day 7)		
MEM+	61.95 ± 7.86 Ab	93.51 ± 14.52*Ab
pFSH 10	59.79 ± 9.73 Ab	87.03 ± 12.77 Ab
pFSH 50	60.25 ± 8.36 Ab	86.84 ± 16.98 Ab
pFSH 100	61.18 ± 7.34 Bb	89.15 ± 15.89 Ab
pFSH 1000	69.06 ± 9.04*Aa	93.35 ± 13.05 Ab
rFSH 10	65.66 ± 8.56*Aab	92.70 ± 14.67 Ab
rFSH 50	69.28 ± 9.11*Aa	104.54 ± 16.63*Aa
rFSH 100	64.89 ± 8.45*Aab	93.63 ± 13.19*Ab
rFSH 1000	62.89 ± 8.67*Ab	92.01 ± 14.71 Ab

a,b,c Different letters in the same column denote significant differences among treatments in the same period (p<0.05). A,B Different letters in the same column denote significant differences between culture periods within the same medium (p<0.05). \*p<0,05, significantly different from non-cultured ovarian cortex tissue (control/D0).

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

- A origem, o grau de pureza e a concentração de FSH afetam a viabilidade e o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*, sendo o FSH recombinante superior ao hipofisário.
- Para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, recomenda-se a utilização de FSH recombinante na concentração de 50 ng/ml.

## **8 PERSPECTIVAS**

Tendo em vista os melhores resultados obtidos com o FSH recombinante neste trabalho, torna-se importante a utilização deste hormônio na concentração de 50 ng/ml no meio de cultivo de base, visando o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos. Além disso, devido as evidências do papel do FSHr na foliculogênese pré-antral de caprinos, demonstradas no presente trabalho, estudos associando o FSHr com outros hormônios e/ou fatores de crescimento poderão contribuir na elucidação da foliculogênese inicial, bem como no desenvolvimento de um meio de cultivo eficiente que promova a produção de oócitos maduros oriundos de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

## 9 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. **Histology and Histopathology**, v.21, p. 887-898, 2006. Review

ADASHI, E.Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 9, p. 815-827, 1994.

AGARWAL, R.; HOLMES, J.; JACOBS, H.S.; Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in *in vitro* fertilization cycles: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v.73, p. 338-43, 2000.

ALVAREZ, R. H.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C. Resposta Ovariana e Produção de Embriões de Vacas Superovuladas com Pluset ou Folltropin em Dose Única Subcutânea. **Acta Scientiae Veterinariae**, Nova Odessa-SP, v. 34(Suplemento 1), 2006.

AMORIM, E.A.M.; TORRES, C.A.A.; AMORIM, L.S.; FONSECA J.F.; BRUSCHI, J.H.; GUIMARÃES, J.D.; CARVALHO, G.R.; ALVES, N.G.; CECON, P.R. Follicular dynamics of lactating Toggenburg does treated with recombinant bovine somatotropin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p. 1500-1508, 2007.

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; VISINTIN, J.A.; SOARES, A.T. Superovulação em caprinos da raça Moxotó com FSH-p. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37, 2000.

BAERWALD, A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Characterization of Ovarian Follicular Wave Dynamics in Women. **Biology of Reproduction**, v.69, p. 1023–1031, 2003.

BAKER, S.J. & SPEARS, N. Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles *in vitro*. **Jornal of Reproduction and Fertility Abstr Ser**, v. 19, p. 21, 1997.

BALDASSARRE, H. AND KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p. 255–66, 2004.

BARNETT, K.R., SCHILLING, C., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 537-55, 2006.

BORROMEO, V.; AMSTERDAM, A.; BERRINI, A.; GAGGIOLI, D.; DANTES, A.; SECCHI, C. Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. **General and Comparative Endocrinology**, v.139, p.179-89, 2004.

BECKERS, J.F. Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle, **Theriogenology**, v.27, p. 213, 1987.

BÉNYEI, B. AND BARROS, C.C.W. Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importado de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p. 366 -71, 1999.

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.

BEZERRA, M.B.; RONDINA, D.; OLIVEIRA, L.C.; LIMA, A.K.F.; CECCHI, R.; LUCCI, C.M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J.R. Aspectos quantitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, 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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.

BRISTOL-GOULD, S. & WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

CALDER, M.D.; CAENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. 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*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 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. **Fertility and Sterility**, *in press*, 2007.

CAMP, T.A.; RAHAL J.O.; MAYO, K.E. 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. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, 1999.

CERPA-POLJAK, A.; BISHOP, L.A.; HORT, Y.J.; CHIN, C.K.; DEKROON, R.; MAHLER, S.M.; SMITH, G.M.; STUART, M.C.; SCHOFIELD, P.R. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. **Endocrinology**, v.132, p.351-56, 1993.

CHEN, L.; RUSELL, P.; LARSEN, W. Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. **Biology of Reproduction**, v.51, p.290–95, 1994.

CLOSSET J, HENNEN G: Biopotency of highly purified porcine FSH and human LH on gonadal function. **Journal of Endocrinology**, v.120, p.89–96, 1989.

COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p. 105-16, 1999.

COOMARASAMY, A.; AFNAN, M.; CHEEMA, D.; VAN DER VEEN, F.; BOSSUYT, P.M.M.; 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. **Human Reproduction**, v.23, p. 310-315, 2008.

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, p.759–68, 1997.

CORTVRINDT, R. & SMITZ, J.E.J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animal**, v.36, p. 3-9, 2001.

DANIEL, S.A.J.; ARMSTRONG, D.T.; GORELANGTON, R.E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. **Gamete Research**, v.24, 109-21, 1989.

DAYA, S.; GUNBY, J.; HUGHES, E.G. Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for *in vitro* fertilization cycles: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v.73, p. 517-20, 1995.

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.

DE PLACIDO, G.; ALVIGGI, C.; MOLLO, A.; STRINA, I.; VARRICCHIO, M.T.; 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.

DERRAR, N., PRICE, C.A., SIRARD, M.-A. 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, M.G.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, 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 and anti-HCG serum and subsequent chromatography. **Acta Endocrinol**, v.52, p.169-174, 1966.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 55-63, 1991.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v.4, p. 233-254, 1986.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. **Biology Reproduction**, v.41, p.268-76, 1989.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v.122, p.829-38, 2001.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 5, p. 845-858, 1995.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal** São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.

FILICORI, M.; TABARE, C.; CASADIO, P. et al. Interaction between menstrual cyclicity and gonadotropin pulsatility. **Hormone Research**, v.49, p. 169, 1998.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammal. **Biology Reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E., KITO, S, WANDJI, S.A. & SRSEN, V. Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. **Theriogenology**, v. 49, p. 441-449, 1998.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: **CAB International**: Raven Press, p. 4349, 1994.

GOUGEON, A. Rate of follicular growth in the human ovary. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> **Reinier De Graaf Symposium**. Amsterdam, 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, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, 57-63., 2008.

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**. 6<sup>o</sup> Edição. Editora Manoele. Capítulo 14. p. 319-333, 1995.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HSU, S. Y.; HSUEH. A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**, 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.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.

HURWITZ, A. & ADASHI, E.Y. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 84, p. 19-23, 1992.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1099–105, 2002.

JOYCE, I.M.; PENDOLA, F.L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, v.214, p.342–53, 1999.

KOLIBIANAKIS, E.M.; 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, J.Y.; 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. 669-78, 1994.

LEE, V.H. Expression of Rabbit Zona Pellucida-1 Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 401, 2000.

LENIE, S.; CORTVRINDT, R.; ADRIAENSSENS, SMITZ, J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 1730-1738, 2004.

LIU, H.C., HE, Z., ROSENWAKS, Z. *In vitro* culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. **Fertility Sterility**, v. 77, p. 373-383, 2002.

LUCCI, C.M., AMORIM, C.A., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R., GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V. CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUNENFELD, B.; MENZI, A.; VOLET, B. Clinical effects of human postmenopausal gpnadotropin. **Rass Clin Ter Sci Affini**, v.59, p. 213-217, 1960.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates on follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p.301-307, 1987.

MACMILLAN, K.L.; BURKE, C.R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.307-320, 1996.

MAGALHÃES, D.M.; ARAUJO, V.R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SILVA, R.C.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability *in vitro*. In: **II International Symposium on animal biology of reproduction**, 2008.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M.F.; MCCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effects of culturemedium, serumtype, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.67, 1197-203, 2002.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.H.; SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; ROCHA JR, C.M.C.; LIMA-VERDE, I.B.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Growth and Differentiation Factor -9 stimulates goat primordial follicles activation *in vitro* and the progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and development**, v. 20, p. 916-924, 2008.

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A.; MAIA Jr, J.E.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v.15, 173-82, 2007.

MCGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S.Y.; CHUN, S.Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A.J.W. 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. 2417-24, 1997.

MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; BALL, K.; MASON, A.; SIMMONS, M.H. Superovulation and embryo recovery in goats treated with Ovagen and Folltropin. **New Zealand Veterinary Journal**, v.37, p. 27-29, 1989.

MÉDURI, G., CHARNAUX, N., DRIANCOURT, M.-A., COMBETTES, L., GRANET, P., VANNIER, B., LOOSFELT, H.; MIGROM, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? The Journal of Clinical. **Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p.2266-2276, 2002.

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.

MOHAMED, A.M.D.; SBRACIA, M.M.D.; PACCHIAROTTI, A.M.D.; MICARA, G.B.S.; LINARI, A.B.S.; TRANQUILLI, D.B.S.; SALOMÉ, M. B.; ESPINOLA, B.S.; ARAGONA, C.M.D. Urinary follicle-stimulating hormone (FSH) is more effective than recombinant FSH in older women in a controlled randomized study. **Fertility and Sterility**, v.85, 20, p. 1398-1403, 2006.

MONNIAUX, D.; MARIANA, J.C.; COGNIÉ, Y.; et al. Controle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammiferes 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, 1235-45, 1996.

OKTAY, K., BRIGGS, D., GOSDEN, R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 3748–51, 1997.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R.G. Development of human primordial follicles to antral stages in *SCID/hpg* mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human Reproduction**, v.13, p.1133-38, 1998.

OUT, J.H.; MANNAERTS, B.M.J.L.; DRIESSEN, S.G.A.J.; BENNINK, H.J.T.C. Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: More oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. **Human Reproduction**, v.2, p.162–71, 1996.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J.K; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1682-1686, 2003.

OTALA, M.; ERKKILA, K.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; SUOMALAINEN, L.; SUIKKARI, A.M.; PENTIKAINEN, V.; DUNKEL, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. **Molecular Human Reproduction**, 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, J.A.; SKINNER, M.K. 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*. **Molecular Human Reproduction**, v.13, p. 3-9, 2007.

QVIST, R.; BLACKWELL, L.F.; BOURNE, H.; BROWN, J.B. Development of Mouse Ovarian Follicles from Primary to Ovulatory Stages *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 89, p. 169-180, 1990.

RACHID, M.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, V.A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 6, 2000.

RAGA, F.; BONILLA-MUSOLES, F.; CASAN, E.M.; 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, 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.

ROY SK, TREACY BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertil Steril.**, v.59, p.783-90, 1993.

SADEU, J. C., CORTVRINDT, R., RON-EL, R., KASTERTEIN, E., SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1130-1141, 2006.

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. ; BAO, S.N. ; CAMPELLO, C.C. ; SILVA, J.R.V. ; FIGUEIREDO, J.R. Influence of different concentrations of LH and FSH on caprine primordial ovarian follicle development in vitro. **Small Ruminant Research**, v.78, p. 87-95, 2008.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants, **Rec. Vét.**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Patter of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p.663-671, 1988.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Patter of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p.663-671, 1988.

SHAW, J.M. ; ORANRATNACHAI, A. ;TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59–72, 2000.

SILVA, J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; CARVALHO, F.C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v.43, p.203-9, 2002.

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, J.R.V. Growth factors in gota ovarios and the role of activina-A in the development of esrly-staged follicles. **Phd Thesis Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine**, p.142, 2005.

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.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by realtime ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308-317, 1988.

SMEENK, M.J.; BRAAT, D.M.; KREMER, A.M.; SWEEP, C.G.J.; THOMAS, M.G.

Follicle-stimulating hormone isoforms are not useful as pretreatment predictors of outcome in in vitro fertilization: a pilot study. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1519-22, 2006.

SPEARS, N., MURRAY, A.A., ALISSON, V., BOLAND, N.I., GOSDEN, R.G. Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 113, p. 19-26, 1998.

TAMILMANI, G.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; AMARNATH, D.; NAIK, B.R.; MUTHARAO, M.; RAO, V.H. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.60, p. 295-305, 2005.

TELFER, E. E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v.45, p. 101-110, 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.; LAPOLT, P.S.; HSUEH, A.J. Hormonal regulation of follicle stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v.130, p.1296–1302, 1992a.

TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; SCHOMBERG, D.W.; HSUEH, A.J.W. 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, 1992b.

TISDALL, D.J.; WATANABE, K.; HUDSON, N.L.; SMITH, P.; MCNATTY, K.P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. **J Endocrinol**, v.15, p.273–281, 1995.

- ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY JR., A.R.; BEITINS, I.Z.; PADMANABHAN, V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. **Endocr Rev.**, v.16, p.765–787, 1995.
- VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In vivo and *in vitro* development of follicles preantral. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.
- VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E.E.; BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v.5, p. 457-474, 2000.
- 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, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. 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, E. E.; HOVATTA, O. *In vitro* effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. **Journal of Assisted Reproduction Genetic**, v.21, p. 301-306, 2004.
- ZHAO, J. Development of rat preantral follicles in vitro. **PhD thesis**, Utrecht University, The Netherlands, 2000.
- 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. **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. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 235-242, 2005.

WALTON, W.J.; NGUYEN, V.T.; BUTNEV, V.Y.; SINGH, V.; MOORE, W.T.; BOUSFIELD, G.R. Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated  $\beta$ -subunit in addition to the conventional glycosylated  $\beta$ -subunit. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.3675-85, 2001.

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 Reprod.**, v.14, 1555–62, 1999.

WU, J.; CARREL, D.T.; WILCOX, A.L. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. **Biol. Reprod.**, v.65, 1579–85, 2001a.

WU, J.; EMERY, B.R.; CARREL, D.T. *In vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v.64, 375–81, 2001b.

YDING, C.; LEONARDBSEN, L.; ULLOA-AGUIRRE, A.; BARRIOS-DE-TOMASI, J.; MOORE, L.; BYSKOV, A. FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. **Molecular Human Reproduction**, v.5, p.726–31, 1999.

M188i Magalhães, Deborah de Melo  
Influência da origem e pureza do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) na sobrevivência e desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos / Deborah de Melo Magalhães. - Fortaleza, 2008.  
80p.: il.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. José Ricardo de Figueiredo.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) –  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1.Caprino. 2. Hormônio Folículo Estimulante (FSH). 3. Crescimento folicular. 4. Folículos pré-antrais. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária II. Título

CDD: 636.39

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)