



Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos

The Role of Androgens in Mammals Folliculogenesis

Livia Brunetti Apolloni, Jamily Bezerra Bruno, Benner Geraldo Alves & José Ricardo de Figueiredo

ABSTRACT

Introduction: Steroid hormones production is a physiological process termed steroidogenesis. An important stage of this process is the conversion of androgens into estrogens through aromatase enzyme. Furthermore, androgens are important in the process of folliculogenesis, promoting follicular growth in different species. Thus, the aim of this review was to present the process of synthesis, mechanism of action, and importance of androgens in folliculogenesis. Additionally, the main results of *in vitro* culture of ovarian cells in the presence of these hormones were emphasized.

Review: Folliculogenesis begins in prenatal life in most of species and can be defined as the process of formation, follicular growth, and oocyte maturation. Preantral follicles represent 95% of the follicular population and assisted reproductive technologies have been developed (e.g., Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles - MOEPF) in order to avoid the great follicle loss that occurs naturally *in vivo* by atresia. The MOEPF aim to obtain a large number of competent oocytes from preantral follicles and then subject to *in vitro* maturation, fertilization, and culture for embryo production. However, the development of an efficient medium to ensure the follicular survival and oocyte maturation is the major challenge of this biotechnology. To achieve the success on *in vitro* culture, the effects of substances as androgens on follicular development have been evaluated. Androgens are steroid hormones produced in theca cells (TC) that are fundamental for follicular growth. These cells provide all the androgens required by the developing follicles for conversion into estrogens by the granulosa cells (GC). Androgens receptors (AR) are localized in cell cytoplasm of all follicular categories, being more expressed in preantral follicles. The androgen pathway initiates through its connection to its receptor, making a complex androgen-AR, that in the nucleus helps on the process of gene transcription related with follicular survival. This mechanism is androgen receptor genomic activity. In addition to genomic action, there is an androgen receptor non-genomic activity. This occurs through activation of AR and its interaction with different signaling molecules located on the cell membrane, triggering events that aid in the follicular development. Regardless of the androgens actions, ovarian cells of several species subjected to *in vitro* culture have shown the importance of these hormones on the follicle development. Recent studies demonstrated that androgens addition on the culture medium stimulated the activation of preantral follicles (bovine and caprine), antrum formation (swine), survival (non-primate), and oocyte maturation (antral follicles; bovine). Also, some studies suggest that the addition of these hormones on *in vitro* culture is dose-dependent and species-specific.

Conclusion: This review shows the role of androgens in different stages of follicular development and its action as a substrate for steroidogenesis and transcription of genes related to follicular survival and oocyte maturation. However, when these hormones should be added during *in vitro* follicular culture and which concentration is required remains unclear, being necessary more studies to elucidate these aspects.

Keywords: follicles, *in vitro* culture, androgens, steroidogenesis.

Descritores: folículos, cultivo *in vitro*, andrógenos, esteroidogênese.

I. INTRODUÇÃO

II. FOLICULOGÊNESE E “OVÁRIO ARTIFICIAL”

III. SÍNTESE E IMPORTÂNCIA DOS ANDRÓGENOS NA FOLICULOGÊNESE OVARIANA

IV. RECEPTORES DE ANDRÓGENOS (AR)

V. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANDRÓGENOS

VI. PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NO CULTIVO FOLICULAR *IN VITRO* NA PRESENÇA DE ANDRÓGENOS

VII. CONCLUSÃO

I. INTRODUÇÃO

A foliculogênese é um evento fisiológico complexo e responsável pela formação, crescimento e maturação folicular [95]. Durante este processo, diversos hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos, tais como as gonadotrofinas (LH e FSH) e os hormônios esteróides (andrógenos e estrógenos) [45].

Estudos avaliando o cultivo folicular *in vitro*, demonstraram que a adição de hormônios [46,77], fatores de crescimento [10,56] entre outras substâncias [73,82] auxiliam no desenvolvimento de folículos pré-antrais nas espécies mamíferas. Dentre os hormônios estudados, os andrógenos destacam-se por sua importância no ovário mamífero e nos processos reprodutivos das fêmeas.

Apesar de existirem trabalhos relacionados com o estudo dos andrógenos em diferentes espécies [74,91,107], alguns aspectos relativos à sua ação direta no desenvolvimento folicular ainda permanecem pouco esclarecidos e contraditórios. Nesta revisão serão abordados tópicos envolvendo a importância dos andrógenos no desenvolvimento folicular, bem como sua síntese e expressão de seus receptores, além do seu mecanismo de ação, dando ênfase nos principais resultados envolvendo a utilização destes hormônios no meio de cultivo *in vitro* de células ovarianas.

II. FOLICULOGÊNESE E “OVÁRIO ARTIFICIAL”

A foliculogênese é um evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies e 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 [95]. Durante este processo, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito

crece e as células da granulosa e tecais circundantes se diferenciam. De acordo com seu grau de evolução, os folículos podem ser divididos em pré-antrais (não cavitários; ou primordiais, primários e secundários) ou antrais (cavitários; ou terciários e pré-ovulatórios) [7], sendo que os folículos pré-antrais representam cerca de 90-95% de toda a população folicular [28].

Os folículos primordiais são constituídos por um oócito quiescente, esférico ou oval, circundado por células da granulosa de formato pavimentoso ou pavimentoso e cuboidais [71]. Seu núcleo é relativamente grande e ocupa uma posição central a excêntrica mostrando um nucléolo evidente. A zona pelúcida nesse estágio ainda não é observada, verificando-se apenas uma justaposição do oócito e células da granulosa, sem nenhuma junção específica [49]. Acredita-se que a ativação dos folículos primordiais seja regulada por um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios originários tanto do ovário quanto de outras glândulas endócrinas [95]. Sendo assim, uma vez ativado o folículo caracteriza-se como primário e apresenta uma única camada de células da granulosa de formato cúbico circundando o oócito. A partir desse estágio o oócito passa a manter um estreito contato com essas células mediado por endocitose [9].

Na continuação do desenvolvimento folicular, os folículos secundários são caracterizados por possuírem um oócito circundado por duas camadas de células da granulosa de formato cubóide. Com o desenvolvimento dos folículos, aumenta o número de microvilos e inicia-se a formação da zona pelúcida, bem como das células da teca externa, a partir do estroma intersticial [95]. A partir do crescimento destes folículos e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro [9], sendo que a partir deste estágio os folículos passam a ser chamados de terciários ou antrais, os quais evoluem para folículos pré-ovulatórios ou De Graaf.

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância [95] sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como da manutenção da fertilidade [23]. Porém, os sinais que interrompem a latência do folículo primordial quiescente e induzem o início do seu crescimento em direção à ovulação ou atresia ainda não são completamente conhecidos.

É sabido que o número de folículos por ovário varia entre espécies e indivíduos, sendo aproximadamente 1.500 na camundonga [79], 235.000 na vaca [6], 35.000 na cabra [48] e 2.000.000 na mulher [25]. Porém 99,9% desta grande população folicular presente no ovário mamífero não chega à ovulação pois sofre um processo natural denominado atresia [28], reduzindo significativamente o número de oócitos à serem ovulados e diminuindo assim o potencial reprodutivo das fêmeas. Recentemente pesquisadores propuseram a existência de formação de novas células germinativas em mulheres [11] e camundongas [41] durante a vida adulta, sugerindo pela primeira vez a existência da neogênese (formação de novos ovócitos), desafiando assim o “dogma” instituído pela literatura sobre a existência finita de uma reserva de oócitos ao nascimento. Outros estudos realizados por Zou *et al.* [110] e White *et al.* [105] comprovaram a existência de células-tronco presentes na superfície do epitélio ovariano capazes de serem transformadas em oócitos tanto em camundongas quanto em mulheres.

Visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, têm sido desenvolvidos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e antrais que tem possibilitado o estudo dos fatores que controlam este processo, além de auxiliarem na compreensão da foliculogênese *in vitro*. Dentre eles destaca-se a MOIFOPA (Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais) também conhecida como “Ovário artificial”, uma biotécnica de reprodução assistida que vem sendo desenvolvida como alternativa para a recuperação de folículos pré-antrais, visando à obtenção de um grande número de oócitos competentes maturados *in vitro* para a produção de embriões. Esta biotécnica encontra-se em desenvolvimento e vem sendo aprimorada nos últimos anos, contribuindo significativamente para a pesquisa fundamental [2,8,74,75,91,92,107] por meio da elucidação da foliculogênese inicial, uma vez que permite acompanhar o desenvolvimento folicular a partir da fase pré-antral.

A partir da MOIFOPA é possível a conservação de folículos isolados [8,16,73,77] ou inclusos em tecido ovariano [46,72] visando à estocagem por curto [39] ou longo período [26,50] e/ou descongelamento/aquecimento para posterior utilização no cultivo folicular *in vitro* [51]. Associada à criopreservação e transplante de tecido ovariano [3,20,80] pode auxiliar

na preservação da fertilidade de mulheres que são submetidas a tratamentos quimio/radioterápicos [27]. Na medicina veterinária, apesar da mesma ainda não ter sido transferida para o sistema reprodutivo, no futuro poderá contribuir para o aumento da produtividade de animais de alto valor genético, além de auxiliar na preservação de animais ameaçados de extinção [81].

No tocante ao cultivo folicular, este pode ser realizado de duas maneiras, a saber: o cultivo *in situ*, no qual os folículos são cultivados inclusos no tecido ovariano [10] ou o cultivo de folículos isolados, nos quais os mesmos são isolados enzimaticamente [96] e/ou mecanicamente [8] a partir de fragmentos do córtex ovariano.

O cultivo *in situ* tem como vantagem preservar a integridade tridimensional dos folículos, através da presença das células do estroma, assemelhando-se às condições *in vivo* [4]. Já o cultivo de folículos isolados proporciona a obtenção de um grande número de folículos primários e/ou secundários intactos, o acompanhamento individual dos folículos, além de favorecer uma maior perfusão do meio durante o cultivo [1]. Vale ressaltar que a eficiência do cultivo folicular *in vitro* pode ser avaliada através de diferentes técnicas, tais como: (i) histologia clássica [72]; (ii) microscopia eletrônica de transmissão [24]; (iii) microscopia de fluorescência [8]; (iv) produção hormonal [74] e (v) biologia molecular [16].

O sistema de cultivo que apresenta melhores resultados é conhecido como cultivo “em dois passos”, no qual foi relatado o nascimento de 53 camundongos a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro* [63]. Neste modelo é efetuado inicialmente o cultivo *in situ*, com o objetivo de maximizar a ativação folicular e o crescimento dos folículos primordiais até o estágio secundário, sendo posteriormente realizado o isolamento dos mesmos para o cultivo *in vitro* dos folículos isolados até a fase antral [93]. No entanto, apesar dos avanços observados, a produção de nascimentos a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* ainda não foi alcançada em espécies domésticas, se limitando apenas a produção de pequeno número de embriões na espécie caprina [55] e ovina [52].

Nota-se que, nas espécies domésticas, a composição do meio é um importante fator para obtenção de sucesso no cultivo folicular *in vitro*. Neste contexto, trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar

os efeitos da adição de diferentes substâncias ao meio de cultivo, tais como hormônios [16,46,55,73] e fatores de crescimento [10,56] que atuam regulando a ativação e o crescimento folicular, com a finalidade de proporcionar um ambiente favorável para o completo desenvolvimento destes folículos até a fase pré-ovulatória.

Estudos demonstram ainda que a adição de piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (insulina, transferrina e selênio), aumentam o percentual de folículos morfológicamente normais e estimulam o crescimento folicular [19,83]. Além destes, tem-se observado que o ácido ascórbico atua benéficamente sobre a foliculogênese, com o papel de reduzir as taxas de apoptose de folículos pré-antrais em camundongos [61] e estimular a manutenção da viabilidade em caprinos, após cultivo de longa duração [82].

Entretanto, a adição de andrógenos ao meio de cultivo têm apresentado resultados contraditórios, uma vez que o hiperandrogenismo induz alterações na morfologia e função de oócitos em desenvolvimento, bem como diminui as taxas de sobrevivência de folículos secundários em roedores [91]. Porém Tasaki *et al.* [92] observaram que a adição de um andrógeno (androstenediona) ao meio de cultivo de folículos porcinos, proporcionou o aumento nas taxas de formação de antro. Além disso, Rodrigues *et al.* [74] demonstraram que a adição de outro andrógeno (dihidrotestosterona) ao meio de cultivo de folículos secundários de macacas, teve efeito benéfico sobre a taxa de sobrevivência folicular após 40 dias de cultivo.

Assim, a proposta desta revisão foi abordar a síntese e importância da adição dos andrógenos ao meio de cultivo folicular, bem como os principais resultados obtidos nos estudos realizados até o momento, para melhor esclarecimento do mecanismo de ação e atuação na foliculogênese destes hormônios.

III. SÍNTESE E IMPORTÂNCIA DOS ANDRÓGENOS NA FOLICULOGÊNESE OVARIANA

A ideia que os andrógenos podem regular o desenvolvimento folicular inicial teve início em meados dos anos 90, com estudos que observaram a expressão de receptores de andrógenos (AR) no ovário [70]. Estes estudos mostraram a expressão de AR em células da teca (CT), células da granulosa (CG) e no oócito de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento nas mais variadas espécies [12,15,34,42,43,103].

É sabido que, durante a foliculogênese, os andrógenos aromatizáveis (androstenediona, testosterona) produzidos no ovário são sintetizados pelas CT sob ação do hormônio luteinizante (LH) em um processo chamado esteroidogênese [59], que tem como resultado final a conversão de andrógenos em estrógenos (estrona e estradiol) [89]. Este processo inicia-se com a captação do colesterol circulante para dentro da mitocôndria da CT através da enzima StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese), onde encontra-se a desmolase (P450_{scc}), que converte o colesterol em pregnenolona sendo esta última convertida em progesterona (P4) por meio da enzima 3 β -hidroxidesidrogenase (3 β -HSD) [31,94]. A P4, por sua vez, poderá exercer suas funções biológicas no organismo ou servir como substrato para a produção de outros andrógenos. Seguindo pela esteroidogênese, a androstenediona (A4) é produzida a partir da P4 pela ação da enzima CYP17 (citocromo P450-17-hidroxilase) que, assim como a P4, poderá exercer suas funções no organismo ou ser convertida em testosterona (T), sob ação da 17 β -hidroxidesidrogenase (17 β -HSD). A testosterona tem três caminhos, a saber: atuar no organismo, converter-se em dihidrotestosterona através da 5 α -redutase ou ser convertida em estradiol (E2) pela P450 aromatase (CYP19), nos quais ambas as conversões são realizadas na CG [45]. Outra via para a produção de E2 seria a aromatização da A4 em estrona nas CG pela CYP19, e esta em E2 pela 17 β -HSD, finalizando assim este processo [99] (Figura 1).

Os andrógenos são os esteroides predominantes produzidos durante o desenvolvimento folicular inicial e estão presentes em altas concentrações no fluido folicular [53], porém dependendo do estágio de desenvolvimento do folículo, a esteroidogênese na CG pode aumentar ou diminuir, devido a atividade da P450 aromatase [45]. A ligação andrógeno-receptor regula a produção e expressão de alguns genes, como por exemplo o IGF-1 que, por sua vez, estimula a proliferação das CG e aumenta os efeitos do FSH que induz a expressão da P450 aromatase [98].

Os hormônios esteróides estão envolvidos tanto na morte quanto na sobrevivência celular [74,91]. Narkwichean *et al.* [62] administraram *in vivo* a desidroepiandrostenediona (andrógeno oriundo das células adrenais) em ovelhas e observaram que este pode ser útil no tratamento clínico do envelhecimento ovariano, aumentando o número de folículos responsivos a go-

nadotrofinas e estimulando assim o desenvolvimento folicular. Outro estudo demonstrou que a suplementação oral de desidroepiandrostenediona aumenta os níveis de IGF-1, gerando um efeito positivo sobre o desenvolvimento folicular e a qualidade oocitária em mulheres [13].

Em espécies poliovulatórias, estudos com camundongos *knockout* para receptores de andrógenos (*ARknockout*) indicaram um papel estimulador dos andrógenos sobre o crescimento e desenvolvimento folicular [100,102]. Ojala *et al.* [66] cultivaram fragmentos ovarianos humanos na presença de andrógenos, estradiol e uma substância inibitória aos estímulos androgênicos (casodex) e observaram que na presença dos andrógenos houve uma redução nas taxas de apoptose, o que não foi alcançado com a adição de estradiol. Já na presença do casodex, este efeito positivo não foi encontrado, o que confirma a importância dos andrógenos no cultivo folicular.

O cultivo foliculos pré-antrais de camundongos na presença de um anticorpo anti-andrógeno associado ou não a androstenediona demonstrou que, no tratamento com o anti-andrógeno, o crescimento e diferenciação folicular foram inibidos, porém esses efeitos foram restaurados com a adição da androstenediona [60]. Em ratas tratadas *in vivo* com androstenediona no pós-parto, foi observada uma redução nos níveis de apoptose folicular [33].

Apesar destes resultados, os andrógenos podem exercer efeitos antagonistas na função folicular quando presentes em altas concentrações, inibindo o desenvolvimento folicular e aumentando as taxas de apoptose [109]. O hiperandrogenismo está associado a síndrome do ovário policístico [30], tendo como características a anovulação e infertilidade, que também estão relacionadas a um aumento nas anormalidades metabólicas, o que pode levar a obesidade, resistência à insulina, doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2 [29,32,68]

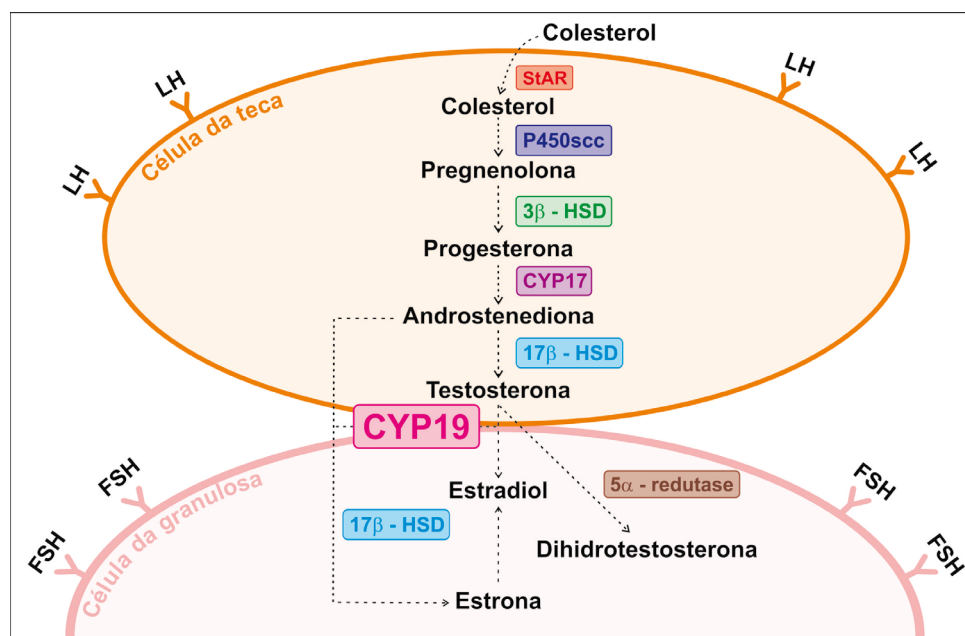


Figura 1. Representação esquemática da esteroidogênese nas células ovarianas. Nas células da teca, os andrógenos (androstenediona e testosterona) são produzidos em resposta ao estímulo do hormônio luteinizante (LH) através da captação do colesterol circulante. Após difundir-se para as células da granulosa, os andrógenos são convertidos em estrógenos (estrona e estradiol) pela enzima aromatase sob a ação do FSH.

IV. RECEPTORES DE ANDRÓGENOS (AR)

Receptores de andrógenos (AR) são proteínas, membros da superfamília de receptores nucleares esteroidais que consistem em receptores de mineralocorticóides, glicocorticóides, estrogênios e progesterona [36,58]. Os AR estão agrupados dentro da classe I, os quais incluem receptores do hormônio da tireóide,

receptores de ácido retinóico, receptores ativado por proliferador de peroxissoma e receptores de vitamina D [21].

Quando não associados ao seu ligante, os AR estão localizados no citoplasma de algumas células, onde se associam com as proteínas de choque térmico [35,47], proteínas do citoesqueleto [97] e outras

chaperonas [47,67]. A ligação específica hormônio-receptor ocorre através da presença de um andrógeno, que difunde-se através da membrana plasmática e liga-se ao seu receptor no citoplasma, podendo agir localmente, mimetizando a ação de alguns fatores de crescimento, ou dirigir-se para o núcleo das células. Para a realização desta translocação, o AR sofre uma alteração conformacional e transloca-se para o núcleo, carregando o hormônio específico [14]. Dentro do núcleo, a ligação hormônio-receptor acopla-se ao DNA como um homodímero e melhora a transcrição de genes relacionados à maturação oocitária e ovulação, como por exemplo o gene anfregulina (AREG) e o ciclooxigenase-2 (COX-2) [108], agindo por interação direta com a maquinaria de transcrição basal ou através de co-ativadores.

No ovário, as CG são altamente responsivas aos andrógenos, no entanto, apenas a testosterona (T) e a dihidrotestosterona (DHT; andrógeno puro, não aromatizável) se ligam diretamente aos AR enquanto que a androstenediona pode mediar sua ação através da sua conversão intrácrina a um andrógeno mais potente (T ou DHT) que tem maior afinidade aos AR, para então, exercer seus efeitos androgênicos [99]. Esta ligação andrógeno-receptor está intimamente envolvida com a fertilidade feminina [108], sendo que a conservação evolutiva da expressão destes receptores em ovários mamíferos suporta a ideia que a ação dos andrógenos é mediada por AR e influencia o desenvolvimento folicular ovariano [99]. No entanto, isso só foi confirmado na última década, por meio de modelos de camundongos AR knockout (ARKO). Esses animais apresentaram deficiência reprodutiva, com redução nas taxas de fertilidade, desenvolvimento folicular anormal bem como redução nas taxas de ovulação [17,101].

Os AR foram localizados em folículos primordiais e primários de roedores [43], ovinos [42], suínos [12] e bovinos [34]. Foram observados nas CG e CT de folículos pré-antrais de ratos [43], bovinos [76], ovinos [42], equinos [57], primatas não humanos [37] e humanos [38]. Em folículos antrais de ratas foi observada sua presença nas CG e células do cúmulus [87]. Em ovinos [42], bovinos [76] e suínos [84] os AR foram localizados em CG e CT, sendo mais predominante nas CG dos folículos antrais. A imunocoloração para os AR também esteve presente em CG e CT humanas de folículos antrais e pré-ovulatórios [86].

V. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANDRÓGENOS

Os andrógenos podem agir de duas maneiras: via receptores intracelulares, que estão localizados no citoplasma das células, ou através da modificação da atividade gênica nuclear [22].

Inicialmente o AR encontra-se inativo e acoplado a uma proteína de choque térmico (HSP) no citoplasma das células. Após a ligação do andrógeno ao AR, o complexo é ativado e dissocia-se da HSP. Outras proteínas tais como a importina- α e a proteína 70 associada ao AR (ARA70) são recrutadas para ajudar a estabilizar o AR e promover sua translocação nuclear. Uma vez localizado no núcleo, este complexo forma um dímero com uma segunda molécula de AR ativada, que se liga então a uma sequência específica no DNA conhecida como ARE (elementos responsivos aos andrógenos) [5]. Acredita-se que a ligação do AR ao ARE estabilize os fatores de transcrição nos promotores dos genes alvo, induzindo assim um alto nível de iniciação de transcrição [40,64]. Esta resposta clássica é denominada de genômica, uma vez que envolve a transcrição de genes (Figura 2).

Wu *et al.* [104] relataram o aumento da expressão do receptor homólogo do fígado -1 (LRH-1), que funciona como um fator de transcrição para a enzima CYP19, na presença de testosterona em CG murina. Além deste estudo, tem-se relatos de alguns fatores de transcrição que ativam as enzimas esteroidogênicas na presença de outros hormônios, como o fator esteroidogênico-1 (SF-1), que se liga na região promotora da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR) bem como na mesma região da CYP17, promovendo maior expressão dessas enzimas na presença de LH em CT bovinas. Outro fator de transcrição que estimula a expressão das enzimas citadas anteriormente é o GATA-6, representante da família de fatores de transcrição GATA [59].

Estudos relataram que a proteína “patient SE translocation” (SET) pertencente a uma família de proteínas de multitarefas, envolvida na apoptose e montagem do nucleossoma, também funciona como um fator de transcrição para a CYP17 e 3β -HSD, promovendo uma super expressão das mesmas em CT de ratas transfectadas com a proteína em questão [18,106]. Li *et al.* [44] demonstraram que o receptor nuclear órfão (NR4A1) tem função transcricional sobre todas as enzimas esteroidogênicas encontradas nas CT de camundongas.

Além da ação genômica clássica dos andrógenos via receptor intracelular, existe ainda a atividade não genômica de receptores de andrógenos. O AR pode iniciar respostas não genômicas através da sua ativação e interação com moléculas sinalizadoras, tais como PI3K e RTK localizadas na membrana plasmática que ativam as vias AKT e MAPK, respectivamente. Estas moléculas sinalizadoras também podem fosforilar os AR, prevenindo a degradação dos mesmos (independente da ligação de seus ligantes) e promovendo sua translocação nuclear. Além disso, uma vez ativadas, essas vias também sinalizam cascatas que regulam outros receptores nucleares (RN) e fatores de transcrição (FT) e/ou eventos sinalizadores citoplasmáticos, tais como a liberação de cálcio (Ca^{2+}) intracelular pelo retículo endoplasmático e mitocôndria [5] (Figura 3).

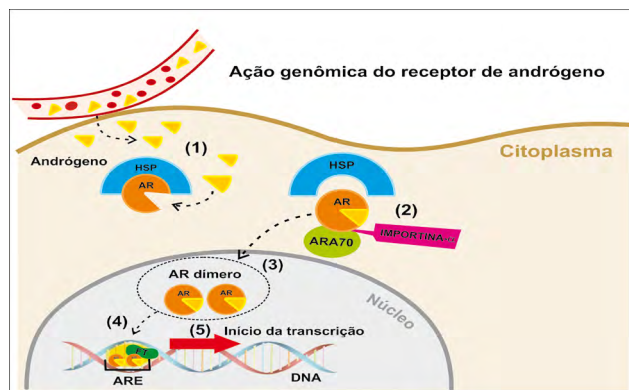


Figura 2. Ação genômica do receptor de andrógeno. (1) Ligação do andrógeno ao seu receptor (AR) no citoplasma celular; (2) Dissociação da proteína de choque térmico (HSP) do complexo e recrutamento da importina- e proteína 70 associada ao receptor de andrógeno (ARA70) para translocação do complexo para o núcleo; (3) Formação de um dímero de complexos ligantes-receptores; (4) Ligação dos dímeros a sequência do DNA responsiva aos andrógenos (ARE) e; (5) Início da transcrição gênica dos genes alvos.

VI. PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NO CULTIVO FOLICULAR *IN VITRO* NA PRESENÇA DE ANDRÓGENOS

Os efeitos dos andrógenos sobre a foliculogênese estão sendo avaliados com o auxílio da biotécnica de MOIFOPA, a partir de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* em diferentes espécies mamíferas (Tabela 1).

O cultivo de folículos secundários isolados de primatas não humanos, com a adição de dihidrotestosterona (50 ng/mL) mostrou um aumento na produção de estradiol, mesmo na presença de um inibidor da síntese de esteróides, e uma taxa de sobrevivência folicular significativamente superior ao controle após 40 dias de cultivo [74]. Outro estudo avaliou o efeito deste mesmo hormônio no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados de

Machelon *et al.* [54] demonstraram que a adição de androstenediona causou um aumento rápido de cálcio citosólico em CG luteinizadas humanas, envolvendo os canais de cálcio dependentes da voltagem e fosfolipase C. A mobilização do cálcio intracelular é seguida por um influxo de cálcio do meio extracelular, sendo que o mesmo funciona como um segundo mensageiro intracelular proporcionando proliferação e diferenciação das células. Outro estudo demonstrou que a adição de andrógenos no meio de cultivo de CG promoveu a ativação da via MAPK, que por sua vez fosforilou uma proteína sinalizadora de vias intra e extranucleares (paxilina), promovendo a expressão de um microRNA antiapoptótico (miRNA-125b) [78]. Apesar desses estudos, a base molecular dos efeitos AR não genômicos ainda não foi totalmente esclarecida.

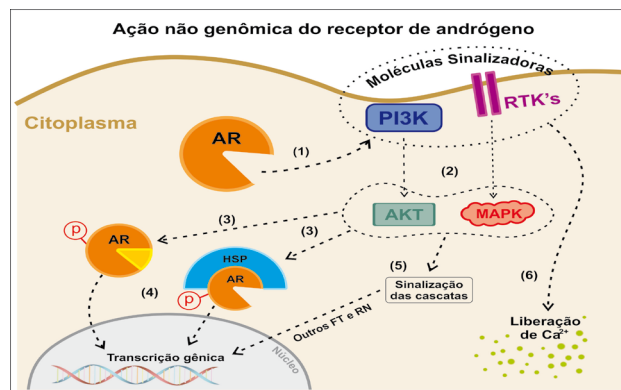


Figura 3. Ação não-genômica do receptor de andrógeno. (1) Ativação do AR e interação com moléculas sinalizadoras (PI3K e RTK) localizadas na membrana plasmática; (2) Ativação das vias AKT e MAPK pela PI3K e RTK, respectivamente. (3) Fosforilação dos AR pelas moléculas sinalizadoras (independente da ligação de seus ligantes) (4) Translocação nuclear dos AR. (5) Sinalização de cascatas através vias AKT e MAPK que regulam receptores nucleares (RN) e fatores de transcrição (FT) e/ou; (6) Eventos sinalizadores citoplasmáticos, tais como a liberação de cálcio (Ca^{2+}) intracelular pelo retículo endoplasmático e mitocôndria.

camundongas, revelando um aumento significativo no diâmetro folicular bem como maiores taxas de formação de antro no tratamento com 10^{-6} M de dihidrotestosterona, quando comparado ao controle. Além dos resultados de desenvolvimento folicular, esses autores obtiveram altas taxas de maturação oocitária (75-80%) em todos os tratamentos na presença do andrógeno [90].

Sen *et al.* [78] avaliaram a ação da dihidrotestosterona no ovário de camundongos e observaram que a mesma aumenta a expressão de um microRNA responsável por reduzir as taxas de apoptose, além de proporcionar um aumento significativo no diâmetro folicular e maiores taxas de folículos antrais na associação desse andrógeno ao FSH.

Tabela 1. Efeito dos andrógenos no desenvolvimento folicular *in vitro*.

Referência	Animal	Metodologia	Principais resultados
Murray <i>et al.</i> [60]	Roedor	Cultivo de 6 dias de folículos pré-antrais na presença de: (i) um anticorpo anti-andrógeno em associação ou não com 1 µg/mL A4; (ii) um antagonista do AR (casodex) em associação ou não com 1µg/mL DHT	Adição do anticorpo anti-andrógeno inibiu o crescimento folicular, efeito este que foi revertido com a adição de A4. No tratamento com o casodex, o crescimento folicular também foi inibido e revertido posteriormente com a adição de DHT
Spears <i>et al.</i> [85]	Roedor	Cultivo de 6 dias de folículos pré-antrais na presença de FSH em associação ou não com 1 µg/mL de A4	O tratamento com FSH promoveu o crescimento folicular o qual foi melhorado na presença de A4
Romero & Smitz [75]	Roedor	Cultivo de 13 dias de folículos pré-antrais na presença de: (i) 20 ou 200 nM de A4 associada ou não ao FSH; (ii) 20, 200 nM ou 2 µM de T associada ou não ao FSH	As concentrações superiores a 200 nM de ambos os andrógenos prejudicaram a maturação oocitária
Okutsu <i>et al.</i> [65]	Roedor	Cultivo de 10 dias de folículos pré-antrais na presença de 10 ⁻⁵ M de A4	A4 promoveu uma luteinização precoce nas células da granulosa
Tarumi <i>et al.</i> [90]	Roedor	Cultivo de 12 dias de folículos pré-antrais na presença de 10 ⁻¹⁰ , 10 ⁻⁸ e 10 ⁻⁶ M de DHT e E2	O tratamento com DHT (10 ⁻⁶ M) apresentou maior diâmetro folicular. Uma redução na produção de P4 e danos na retomada da meiose foram observados nos folículos cultivados com 10 ⁻⁶ M de E2
Sen <i>et al.</i> [78]	Roedor	Expressão do microRNA-125b, sobrevivência folicular e formação de antro foram analisadas no cultivo de ovário inteiro e folículos pré-antrais na presença de DHT e FSH em diferentes concentrações	Na presença de DHT a expressão do microRNA-125b, o diâmetro folicular e a formação de antro apresentaram um aumento
Taketsuru <i>et al.</i> [88]	Bovino	Folículos antrais iniciais foram cultivados por 14 dias na presença de 0,10 e 100 ng/mL de A4 ou E2	Na presença de A4 as taxas de maturação foram similares ao controle <i>in vivo</i>
Yang & fortune <i>et al.</i> [107]	Bovino	Fragmentos do córtex ovariano foram cultivados por 10 dias na presença de: 10 ⁻⁷ e 10 ⁻⁶ M de T ou 10 ⁻⁶ M de E2; (ii) 10 ⁻⁷ M de T em associação flutamida	T promoveu um aumento na transição de folículos primários para secundários, a qual foi inibida na presença de flutamida e não ocorreu no tratamento com E2
Lima-verde <i>et al.</i> [46]	Caprino	Fragmentos do córtex ovariano foram cultivados por 7 dias na presença de 1, 10, 50, 100 ng/mL de A4 associada ou não com FSH	A4 (50 ng/mL) promoveu um aumento nos diâmetros folicular e oocitário. As concentrações 50 ou 100 ng/mL de A4 associadas ao FSH apresentaram 93.3% de folículos viáveis
Rodrigues <i>et al.</i> [74]	Primata não humano	Cultivo de 40 dias de folículos pré-antrais encapsulados na presença de: (i) 50 ng/mL de DHT associada ou não ao TRL; (ii) 10 ou 50 ng/mL de T associadas ao TRL	O tratamento com DHT aumentou a sobrevivência folicular em mais de 80% quando comparado ao controle. Entretanto, uma diminuição na produção de E2 foi observada

A4: androstenediona; DHT: dihidrotestosterona; E2: estradiol; P4: progesterona; T: testosterona; TRL: trilostano.

Yang & Fortune [107] observaram que o cultivo de fragmentos ovarianos bovinos com adição de 10^{-7} e 10^{-10} M de testosterona promoveu maior transição de folículos primários para secundários após 10 dias. Considerando que Hampton *et al.* [34] detectaram a expressão do mRNA para AR em folículos primários bovinos, concluiu-se que a testosterona exerce um papel estimulatório na foliculogênese inicial.

O cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano caprino com a adição de androstenediona (10 ng/mL) e FSH manteve o desenvolvimento folicular entre os dias 1 e 7 de cultivo. Além disso, 50 e 100 ng/mL de androstenediona associada ao FSH apresentaram uma percentagem de 93,3% de folículos viáveis ao longo de 7 dias de cultivo [46].

Taketsuru *et al.* [88] observaram que a adição de 10 e 100 ng/mL de androstenediona no cultivo de folículos antrais bovinos, resultou em taxas de maturação de 67% e 65%, respectivamente, sendo similares ao controle *in vivo* (86%). Porém a adição de androstenediona e testosterona (em concentrações de 200 nM) no cultivo de folículos pré-antrais de roedores reduziram as taxas de extrusão do primeiro corpúsculo polar em 32% e 48%, respectivamente [75]. Este achado sugere que altas concentrações de andrógenos durante a foliculogênese podem prejudicar a formação do fuso meiótico durante a retomada da meiose.

Trabalhos têm mostrado que a exposição de folículos pré-antrais a altas concentrações de andrógenos induz a luteinização precoce nas células da granulosa [65] e reduz o crescimento e a viabilidade folicular

[91], o que pode ser comparado a síndrome do ovário policístico em mulheres.

Além destes efeitos, o hiperandrogenismo pode levar a uma secreção prematura de estradiol, aumentando a responsividade dos folículos em desenvolvimento ao FSH, levando à inibição da secreção deste hormônio e consequente parada no desenvolvimento folicular [69], o que reforça o fato da adição de andrógenos ser concentração hormônio-dependente.

VII. CONCLUSÃO

A presente revisão mostra o relevante papel dos andrógenos nos diferentes estádios de desenvolvimento folicular, atuando através de seus receptores em CG e CT, servindo como um substrato para a esteroidogênese ou agindo na transcrição de genes relacionados a sobrevivência folicular, além de auxiliarem na maturação oocitária. Estes hormônios são essenciais no processo reprodutivo das fêmeas, regulando a foliculogênese e modulando os efeitos de outros hormônios, como por exemplo, o FSH. No entanto, apesar dos estudos já realizados enfocando a ação dos andrógenos nos folículos ovarianos, a forma como estes hormônios devem ser adicionados no cultivo folicular *in vitro*, bem como a concentração a ser utilizada, ainda permanecem pouco esclarecidas, sendo indispensáveis mais estudos para elucidar estes aspectos.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Abir R., Nitkse S., Ben-Harous A. & Fisch B. 2006. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*. 21(8): 887-898.
- 2 Almeida A.P., Saraiva M.V.A., Alves Filho J.G., Silva G.M., Gonçalves R.F.B., Brito I.R., Silva A.W.B., Lima A.K.F., Cunha R.M.S., Silva J.R.V. & Figueiredo J.R. 2012. Gene expression and immunolocalization of fibroblast growth factor 2 in the ovary and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(1): 20-25.
- 3 Andersen C.Y., Rosendahl M., Byskov A.G., Loft A., Ottosen C., Dueholm M., Schmidt K.L.T., Andersen A.N. & Ernst E. 2008. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*. 23(10): 2266-2272.
- 4 Araújo V.R. 2013. Estudo dos fatores que afetam a eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e bovinos: efeito do regime de troca, meios de cultivo de base e suplementos. 290f. Fortaleza, CE. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 5 Bennett N.C., Gardiner R.A., Hooper J.D., Johnson D.W. & Gobe G.C. 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42(6): 813-827.

- 6 **Betteridge K.J., Smith C., Stubbings R.B., Xu K.P. & King W.A. 1989.** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility.* 38: 87-98.
- 7 **Bristol-Gould S., Woodruff T.K. 2006.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology.* 66(1): 5-13.
- 8 **Brito I.R., Silva C.M.G., Duarte A.B.G., Lima I.M.T., Rodrigues G.Q., Rossetto R., Sales A.D., Lobo C.H., Bernuci M.P., Rosa-E-Silva A.C.J.S., Campello C.C., Xu M. & Figueiredo J.R. 2014.** Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Molecular Reproduction & Development.* 81(7): 636-645.
- 9 **Bruno J.B. 2006.** Utilização de soro no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. 66f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 10 **Bruno J.B., Celestino J.J., Lima-Verde I.B., Lima L.F., Matos M.H., Araújo V.R., Saraiva M.V., Martins F.S., Campello C.C. & Figueiredo J.R. 2009.** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. *Reproduction, Fertility, and Development.* 21(5): 679-687.
- 11 **Bukovski A., Caudle M.R., Svetlikova M. & Upadhyaya N.B. 2004.** Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproduction Biology and Endocrinology.* 2(20): 1-30.
- 12 **Cárdenas H. & Pope W.F. 2002.** Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle. *Molecular Reproduction and Development.* 62(1): 92-98.
- 13 **Casson P.R., Santoro N. Elkind-Hirsch K., Carson S.A., Hornsby P.J., Abraham G. & Buster J.E. 1998.** Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: a six-month trial. *Fertility and Sterility.* 70(1): 107-110.
- 14 **Cato A.C.B. & Peterziel H. 1998.** The androgen receptor as mediator of gene expression and signal transduction pathways. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 9(4): 150-154.
- 15 **Chadha S., Pache T. D., Huikeshoven F. J. M., Brinkmann A. O. & Van der Kwast T. H. 1994.** Androgen receptor expression in human ovarian and uterine tissue of long term androgen-treated transsexual women. *Human Pathology.* 25(11): 1198-1204.
- 16 **Chaves R.N., Duarte A.B.G., Rodrigues G.Q., Celestino J.J.H., Silva G.M., Lopes C.A.P., Almeida A.P., Donato M.A.M., Peixoto C.A., Moura A.A.A., Lobo C.H., Locatelli Y., Mermillod P., Campello C.C. & Figueiredo J.R. 2012.** The effects of insulin and follicle-stimulating hormone (FSH) during *in vitro* development of ovarian goat preantral follicles and relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. *Biology of Reproduction.* 87(3): 69-80.
- 17 **Cheng X.B., Jimenez M., Desai R., Middleton L.J., Joseph S.R., Ning G., Allan C.M., Smith J.T., Handelsman D.J. & Walters K.A. 2013.** Characterizing the neuroendocrine and ovarian defects of androgen receptor-knockout female mice. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism.* 305(6): 717-726.
- 18 **Compagnone N.A., Zhang P., Vigne J.L. & Mellon S.H. 2000.** Novel role for the nuclear phosphoprotein SET in transcriptional activation of P450c17 and initiation of neurosteroidogenesis. *Molecular Endocrinology.* 14(6): 875-888.
- 19 **Demeestere I., Centner J., Gervy Y. & Delbaere A. 2005.** Impact of various endocrine and paracrine factors on culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction.* 130(2): 147-156.
- 20 **Demeestere I., Simon P., Emiliani S., Delbaere A. & Englert Y. 2007.** Fertility preservation: Successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist.* 12(12): 1437-1442.
- 21 **Detera-Wadleigh S.D. & Fanning T.G. 1994.** Phylogeny of the steroid receptor superfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 3(3): 192-205.
- 22 **Dode M.A. & Graves C.N. 2003.** Role of estradiol-17 on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Animal Reproduction Science.* 78(1-2): 99-110.
- 23 **Drummond A. E. 2006.** The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 4(16): 1-11.
- 24 **Duarte A.B.G., Araújo V.R., Chaves R.N., Silva G.M., Magalhães-Padilha D.M., Satrapa R.A., Donato M.A.M., Peixoto C.A., Campello C.C., Matos M.H.T., Barros C.M. & Figueiredo J.R. 2011.** Bovine dominant follicular fluid promotes the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Reproduction, Fertility, and Development.* 24(3): 490-500.

- 25 Erickson G.F. 1986. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reproduction Endocrinology.* 4(3): 233-254.
- 26 Fatehi R., Ebrahimi B., Shahhosseini M., Farrokhi A. & Fathi R. 2013. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. *Theriogenology.* 81(2): 302-308.
- 27 Faustino L.R., Rossetto R., Lima I.M., Silva C.M., Saraiva M.V., Lima L.F., Silva A.W., Donato M.A., Campello C.C., Peixoto C.A., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P. 2011. Expression of keratinocyte growth factor in goat ovaries and its effects on preantral follicles within cultured ovarian cortex. *Reproductive Sciences.* 18(12): 1222-1229.
- 28 Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R., Amorim C.A. & Silva J.R.V. 2008. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R. & Freitas V.J.F. (Eds). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* 2.ed. São Paulo: Roca, pp.303-327.
- 29 Franks S. 1995. Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine.* 333(13): 853-861.
- 30 Gilling-Smith C., Willis D.S., Beard R.W. & Franks S. 1994. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 79(4): 1158-1165.
- 31 Giometti I.C., Castilho A.C.S., Sá-Filho O.G., Papa P.C. & Buratini Jr. J. 2009. Controle local e endócrino do desenvolvimento e da regressão do corpo lúteo bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 33(1): 34-52.
- 32 Goodarzi M.O., Dumesic D.A., Chazenbalk G. & Azziz R. 2011. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology.* 7(4): 219-231.
- 33 Goyeneche A.A., Calvo V., Gibori G. & Telleria C.M. 2002. Androstenedione interfere in luteal regression by inhibiting apoptosis and stimulating progesterone production. *Biology of Reproduction.* 66(5): 1540-1547.
- 34 Hampton J.H., Manikkam M., Lubahn D.B., Smith M.F. & Garverick H.A. 2004. Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary. *Domestic Animal Endocrinology.* 27(1): 81-88.
- 35 He B., Kempainen J.A., Voegel J.J., Gronemeyer H. & Wilson E.M. 1999. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry.* 274(52): 37219-37225.
- 36 Heinlein C.A. & Chang C. 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrinology Review.* 23(2): 175-200.
- 37 Hild-Petito S., West N. B., Brenner R. M. & Stouffer R. L. 1991. Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biology of Reproduction.* 44(3): 561-568.
- 38 Horie K., Takakura K., Imai K., Liao S. & Mori T. 1992. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium. *Human Reproduction.* 7(10): 1461-1466.
- 39 Isachenko V., Isachenko E., Weiss J.M., Todorov P. & Kreienberg R. 2009. Cryobanking of human ovarian tissue for anti-cancer treatment: comparison of vitrification and conventional freezing. *Cryoletters.* 30(6): 449-454.
- 40 Jenster G. 1998. Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 143(1-2): 1-7.
- 41 Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee H.J., Adams G.B., Niikura Y., Tschudy K.S., Tilly J.C., Cortes M.L., Forkert R., Spitzer T., Iacomini J., Scadden D.T. & Tilly J.L. 2004. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell.* 122(2): 303-315.
- 42 Juengel J.L., Heath D.A., Quirke L.D. & McNatty K.P. 2006. Oestrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localization within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction.* 131(1): 81-92.
- 43 Lenie S. & Smitz J. 2009. Functional AR signaling is evident in an *in vitro* mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biology of Reproduction.* 80(4): 685-695.
- 44 Li M., Xue K., Ling J., Diao F.Y., Cui Y.G. & Liu J.Y. 2010. The orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transcription of key steroidogenic enzymes in ovarian theca cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 319(1-2): 39-46.
- 45 Lima-Verde I.B., Rossetto R. & Figueiredo J.R. 2011. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Revista Brasileira Reprodução Animal.* 35(4): 472-482.
- 46 Lima-Verde I.B., Rossetto R., Matos M.H.T., Celestino J.J.H., Bruno J.B., Silva C.M.G., Faustino L.R., Mororó M.B.S., Araújo V.R., Campello C.C. & Figueiredo J.R. 2010. Androstenedione and follicle stimulating hormone involvement in the viability and development of goat preantral follicles *in vitro*. *Animal Reproduction.* 7(2): 80-89.

- 47 Loy C.J., Sim K.S. & Yong E.L. 2003. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *PNAS.* 100(8): 4562-4567.
- 48 Lucci C.M., Amorim C.A., Bão S.N., Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R., Silva J.R. & Gonçalves P.B.D. 1999. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science.* 56(1): 39-49.
- 49 Lucci C.M., Silva R.V., Carvalho C.A., Figueiredo J.R. & Bão S.N. 2001. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research.* 41(1): 61-69.
- 50 Lunardi F.O., Araújo V.R., Faustino L.R., Carvalho A.A., Gonçalves R.F.B., Bass C.S., Bão S.N., Name K.P.O., Campello C.C., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P.R. 2012. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Small Ruminant Research.* 107(3): 121-130.
- 51 Lunardi F.O., Chaves R.N., Lima L.F., Araújo V.R., Brito I.R., Souza C.E.A., Donato M.A.M., Peixoto C.A., Dinnyes A., Campello C.C., Figueiredo J.R. & Rodrigues A.P.R. 2015. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of *in vitro* culture. *Cell and Tissue Research.* 362(1): 241-251.
- 52 Luz V.B., Araújo V.R., Duarte A.B.G., Silva G.M., Chaves R.N., Brito I.R., Serafim M.K.B., Campello C.C., Feltrin C., Bertolini M., Almeida A.P., Santos R.R. & Figueiredo J.R. 2013. Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the *in vitro* development of ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research.* 115(2-3): 99-102.
- 53 Macaulay A.D., Hamilton C.K., King W. A. & Bartlewski P.M. 2013. Influence of physiological concentrations of androgens on the developmental competence and sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. *Reproductive Biology.* 13(1): 41-50.
- 54 Machelon V., Nome F. & Tesarik J. 1998. Nongenomic effects of androstenedione on human granulosa luteinizing cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 83(1): 263-269.
- 55 Magalhães D.M., Duarte A.B.G., Araújo V.R., Brito I.R., Soares T.G., Lima I.M.T., Lopes C.A.P., Campello C.C., Rodrigues A.P.R. & Figueiredo J.R. 2011. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology.* 75(1): 182-188.
- 56 Matos M.H.T., Van den Hurk R., Lima-Verde I.B., Luque M.C.A., Santos K.D.B., Martins F.S., Bão S.N., Lucci C.M. & Figueiredo J.R. 2007. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs.* 186(2): 112-120.
- 57 Mlodawska W. & Okolski A. 2014. Immunolocalization of androgen receptors and assessment of steroidogenic activity of the ovaries in prepubertal and pubertal mare. *Journal of Equine Veterinary Science.* 34(1): 113-114.
- 58 Montgomery J.S., Price D.K. & Figg W.D. 2001. The androgen receptor gene and its influence on the development and progression of prostate cancer. *Journal of Pathology.* 195(2):138-146.
- 59 Murayama C., Miyazaki H., Miyamoto A. & Shimizu T. 2012. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 350(1): 1-9.
- 60 Murray A. A., Gosden R. G., Allison V. & Spears N. 1998. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility.* 113(1): 27-33.
- 61 Murray A.A., Molinek M.D., Baker S.J., Kojima F.N., Smith M.F., Hillier S.G. & Spears N. 2001. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction.* 121(1): 89-96.
- 62 Narkwichean A., Jayaprakasan K., Maalouf W.E., Hernandez-Medrano J.H., Pincott-Allen C. & Campbell B.K. 2014. Effects of dehydroepiandrosterone on *in vivo* ovine follicular development. *Human Reproduction.* 29(1): 146-154.
- 63 O'Brien M.J., Pendola J.K. & Eppig J.J. 2003. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction.* 68(5): 1682-1686.
- 64 O'malley B.W. & Tsai M.J. 1992. Molecular pathway of steroid receptor action. *Biology of Reproduction.* 46(2): 163-167.
- 65 Okutsu Y., Itoh M.T., Takahashi N. & Ishizuka B. 2010. Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. *Fertility and Sterility.* 93(3): 927-935.
- 66 Ojala M., Makinen S., Tuuri T., Sjoberg J., Pentikainen V., Matikainen T. & Dunkel L. 2004. Effects of testosterone, dihydrotestosterone, and 17 β -estradiol on human ovarian tissue survival in culture. *Fertility and Sterility.* 82(3): 1077-1085.

- 67 Ozanne D.M., Brady M.E., Cook S., Gaughan L., Neal D.E. & Robson C.N. 2000.** Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Molecular Endocrinology.* 14(10): 1618-1626.
- 68 Pasquali R., Stener-Victorin E., Yildiz B.O., Duleba A.J., Hoeger K., Mason H., Homburg R., Hickey T., Franks S., Tapanainen J.S., Balen A., Abbott D.H., Diamati-Kandarakis E. & Legro R.S. 2011.** PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clinical Endocrinology.* 74(4): 424-433.
- 69 Pradeep P.K., Li X., Peegel H. & Menon K.M. 2002.** Dihydrotestosterone inhibits granulosa cell proliferation by decreasing the cyclin D2 mRNA expression and cell cycle arrest at G phase. *Endocrinology.* 143(8): 2930-2935.
- 70 Prizant H., Gleicher N. & Sen A. 2014.** Androgen actions in the ovary: balance is key. *Journal of Endocrinology.* 222(3): 141-151.
- 71 Ricarte A.R.F. & Silva A.R. 2010.** Morfofisiologia da reprodução de caprinos: revisão. *Acta Veterinaria Brasílica.* 4(1): 8-13.
- 72 Rocha R.M.P., Lima L.F., Alves A.M.C.V., Celestino J.J.H., Matos M.H.T., Lima-Verde I.B., Bernuci M.P., Lopes C.A.P., Bão S.N., Campello C.C., Rodrigues A.P.R. & Figueiredo J.R. 2013.** Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology.* 44(1): 1-9.
- 73 Rodrigues G.Q., Silva C.M.G., Faustino L.R., Bruno J.B., Pinto L.C., Lopes C.A.P., Campello C.C. & Figueiredo J.R. 2010.** Efeito de diferentes concentrações de hormônio folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. *Acta Veterinaria Brasileira.* 4(3): 144-152.
- 74 Rodrigues J.K., Navarro P.A., Zelinski M.B., Stouffer R.L. & Xu J. 2015.** Direct actions of androgens on the survival, growth and secretion of steroids and anti-Mullerian hormone by individual macaque follicle during three-dimensional culture. *Human Reproduction.* 30(3): 1-11.
- 75 Romero S. & Smitz J. 2010.** Exposing cultured mouse ovarian follicles under increased gonadotropin tonus to aromatizable androgens influences the steroid balance and reduces oocyte meiotic capacity. *Endocrinology.* 38(2): 243-253.
- 76 Salvetti N.R., Alfaro N.S. & Velázquez M.M. 2012.** Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction.* 144(6): 723-735.
- 77 Saraiva M.V.A., Celestino J.J.H., Araújo V.R., Chaves R.N., Almeida A.P., Lima-Verde I.B., Duarte A.B.G., Silva G.M., Martins F.S., Bruno J.B., Matos M.H.T., Campello C.C., Silva J.R.V. & Figueiredo J.R. 2010.** Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Zygote.* 19(3): 205-214.
- 78 Sen A., Prizant H., Light A., Biswas A., Hayes E., Lee H.J., Barad D., Gleicher N. & Hammes S.R. 2014.** Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *PNAS.* 111(8): 3008-3013.
- 79 Shaw J.M., Oranratnachai A. & Trounson A.O. 2000.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 53(1): 59-72.
- 80 Silber S.J., DeRosa M., Pineda J., Lenahan K., Grenia D., Gorman K. & Gosden, R.G. 2008.** A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Human Reproduction.* 23(7): 1531-1537.
- 81 Silva C.M.G. 2013.** Utilização do hormônio luteinizante (LH), fator de crescimento epidermal (EGF) e ativina-A no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados. 191f. Fortaleza, CE. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 82 Silva C.M.G., Castro S.V., Faustino L.R., Rodrigues G.Q., Brito I.R., Saraiva M.V.A., Rossetto R., Silva T.F.P., Campello C.C. & Figueiredo J.R. 2011.** Moment of addition of LH to the culture medium improves *in vitro* survival and development of secondary goat pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals.* 46(4): 579-584. F.I: 1.151
- 83 Silva J.R.V., van den Hurk R., van Tol H.T.A., Roelen B.A.J. & Figueiredo J.R. 2004.** Gene expression and protein localization for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *Journal of Endocrinology.* 183(1): 405-415.
- 84 Slomczynska M. & Tabarowski Z. 2001.** Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary. *Animal Reproduction Science.* 65(1-2): 127-134.
- 85 Spears N., Murray A. A., Allison V., Boland N.I. & Gosden R.G. 1998.** Role of gonadotropins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility.* 113(1): 19-26.

- 86 Suzuki T., Sasano H., Kimura N., Tamura M., Fukaya T., Yajima A. & Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Human Reproduction.* 9(9): 1589-1595.
- 87 Szoltys M. & Slomczynska M. 2000. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes.* 108(3) 228-234.
- 88 Taketsuru H., Hirao Y., Takenouchi N., Kosuke I. & Miyano T. 2011. Effect of androstenedione on the growth and meiotic competence of bovine oocytes from early antral follicles. *Zygote.* 20(4): 407-415.
- 89 Taniguchi F., Couse J.F., Rodriguez K.F., Emmen J.M.A., Poirier D. & Korach K.S. 2007. Estrogen receptor-mediated an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17 1 (cytochrome P450, steroid 17 -hydroxylase/17,20 lyase) expression. *FASEB J.* 21(2): 586-595.
- 90 Tarumi W., Itoh M.T. & Suzuki N. 2014. Effects of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on the mouse ovarian follicle development and oocyte maturation. *PLoS ONE.* 9(6): 1-7.
- 91 Tarumi W., Tsukamoto S., Okutsu Y., Takahashi N., Horiuchi T., Masanori T.I. & Ishizuka B. 2012. Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. *Fertility and Sterility.* 97(2): 469-476.
- 92 Tasaki H., Iwata H., Sato D., Monjy Y. & Kuwayama T. 2013. Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology.* 79(5): 809-814.
- 93 Telfer E.E., McLaughlin M., Ding C. & Thong K.J. 2008. A two-step serum free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction.* 23(5): 1151-1158.
- 94 Valdez K.E., Cuneo S.P., Gorden P.J. & Turzillo A.M. 2005. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *Journal of Animal Science.* 83(3): 597-603.
- 95 Van Den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63(6): 1717-1751.
- 96 Vanacker J., Camboni A., Dath C., Langendonck A.V., Dolmans M.M., Donnez J. & Amorim C.A. 2011. Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: protocol for application in a clinical setting. *Fertility Preservation.* 96(2): 379-383.
- 97 Veldscholte J., Berrevoets C.A., Zegers N.D., van der Kwast T.H., Grootegoed J.A. & Mulder E. 1992. Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry.* 31(32): 7422-7430.
- 98 Vendola K., Zhou J., Wang J. & Bondy C.A. 1999. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Human Reproduction.* 14(9): 2328-2332.
- 99 Walters K.A. 2015. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction and Fertility.* 149(4): 193-218.
- 100 Walters K.A., Allan C.M. & Handelsman D.J. 2008. Androgen actions and the ovary. *Biology of Reproduction.* 78(3): 380-389.
- 101 Walters K.A., Middleton L.J., Joseph S.R., Hazra R., Jimenez M., Simanainen U., Allan C.M. & Handelsman D.J. 2012. Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility. *Biology of Reproduction.* 87(6): 151-162.
- 102 Wang R.S., Chang H.Y., Kao H.S., Kao C.H., Wu Y.C., Yeh S., Tzeng C.R. & Chang C. 2015. Abnormal mitochondrial function and impaired granulosa cell differentiation in androgen receptor knockout mice. *International Journal of Molecular Sciences.* 16(5): 9831-9849.
- 103 Weil S., Vendola K., Zhou J. & Bondy C.A. 1999. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *Journal of Clinical Endocrinology.* 84(8): 2951-2956.
- 104 Wu Y.G., Bennett J., Talla D. & Stocco C. 2011. Testosterone, not 5 α -Dihydrotestosterone, stimulates LRH-1 leading to FSH-independent expression of Cyp19 and P450scc in granulosa cells. *Molecular Endocrinology.* 25(4): 656-668.
- 105 White Y.A.R., Woods D.C., Ishihara Y.T.O., Seki H. & Tilly. J.L. 2012. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature Medicine.* 18(3): 413-421.
- 106 Xu B., Gao L., Cui Y., Gao L., Dai X., Li M., Zhang Y., Ma X., Diao F. & Liu J. 2013. SET protein up-regulated testosterone production in the cultured preantral follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 11(9): 1-7.

- 107 Yang M.Y. & Fortune J.E. 2006.** Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction.* 75(6): 924-932.
- 108 Yazawa T., Kawabe S., Kanno M., Mizutani T., Imamichi Y., Ju Y., Matsumura T., Yamazaki Y., Usami Y., Kuribayashi M., Shimada M., Kitano T., Umezawa A. & Miyamoto K. 2013.** Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 369(1-2): 42-51.
- 109 Zeleznik A.J., Little-Ihrig L. & Ramasawamy S. 2004.** Administration of dihydrotestosterone to rhesus monkeys inhibits gonadotropin-stimulated ovarian steroidogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 89(2): 860-866.
- 110 Zou K., Yuan Z., Yang Z., Luo H., Sun K., Zhou L., Xiang J., Shi L., Yu Q., Zhang Y., Hou R. & Wu J. 2009.** Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology.* 11(5): 631-636.