



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo original

Papel local dos androgênios no desenvolvimento de folículos pré-antrais de primatas não humanos cultivados individualmente em matriz tridimensional



Jhenifer Kliemchen Rodrigues^{a,b,c,*}, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro^b, Mary Beth Zelinski^a, Richard L. Stouffer^a e Jing Xu^a

^a Oregon National Primate Research Center (ONPRC), Oregon Health & Science University (OHSU), Beaverton, Estados Unidos

^b Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Brazilian Oncofertility Consortium (BOC)/Rede Brasileira de Oncofertilidade (ReBOC), Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 20 de janeiro de 2015

Aceito em 1 de abril de 2015

On-line em 22 de junho de 2015

Palavras-chave:

Foliculogênese

Androgênios

Cultivo folicular 3D

Primatas

Esteroides

Testosterona

Dihidrotestosterona

R E S U M O

Objetivos: Avaliar os efeitos da ablação da produção de esteroides e o papel da testosterona e da diidrotestosterona no desenvolvimento de folículos secundários de primatas não humanos (*Macaca mulatta*) em matriz 3D.

Métodos: O córtex ovariano (n = 8 fêmeas adultas) foi cortado em cubos e os folículos secundários foram isolados e cultivados individualmente durante 40 dias em matriz a base de alginato. Experimento 1: Ablação da produção de esteroides, com uso do trilostano (TRL) e reposição de testosterona. Folículos de quatro animais foram distribuídos nos grupos: controle (veículo), TRL (TRL desde o início do cultivo), testosterona (T) baixa (TRL e testosterona 10 ng/mL) e testosterona (T) alta (TRL e testosterona 50 ng/mL). Experimento 2: Ablação da produção de esteroides, com uso do trilostano (TRL) e reposição de diidrotestosterona (DHT). Folículos de quatro animais foram distribuídos nos grupos: controle (veículo), TRL (TRL desde o início do cultivo), DHT (DHT 50 ng/mL) e DHT + TRL (TRL e DHT 50 ng/mL). Foram analisados: sobrevida, crescimento, formação de antro, produção de hormônios esteroides e grau de maturação e qualidade oocitária.

Resultados: A porcentagem de folículos sobreviventes em cultivo, o crescimento e a formação de antro foi menor em presença de TRL em todos os experimentos, em comparação com o grupo controle. A reposição de T e DHT, na presença de TRL, recuperou a sobrevida, o crescimento, a formação de antro, a produção hormonal e a qualidade e maturidade oocitária, comparáveis com o grupo controle. A DHT adicionada ao meio de maturação padrão promoveu aumento da percentagem de sobrevida e formação de antro quando comparada com o grupo controle.

* Autor para correspondência.

E-mail: jhenifer.kr.pesquisa@gmail.com (J.K. Rodrigues).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.05.002>

1413-2087/© 2015 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Conclusões: Este estudo apresentou evidências do papel local dos androgênios desde o início da foliculogênese em primatas e fortaleceu a existência de mecanismos moleculares que regulam a atividade androgênica e de novas interações entre os androgênios e os hormônios esteroides. Nossos achados mostraram que a T e a DHT podem recuperar sobrevivência, crescimento, formação de antro, produção hormonal e viabilidade oocitária de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* expostos a ablação da produção de esteroides. A DHT adicionada ao meio de maturação padrão promoveu aumento da porcentagem de sobrevivência e formação de antro folicular quando comparada com o grupo controle e abriu perspectivas de se avaliar se a suplementação desse androgênio poderia melhorar o desenvolvimento folicular *in vitro*. Os conhecimentos obtidos contribuem para ampliar o entendimento da dinâmica da foliculogênese em primatas, ainda pouco compreendida, e auxilia na identificação das condições ótimas para o cultivo folicular, o que poderá futuramente ser aplicado à assistência a pacientes oncológicas que desejam preservar sua fertilidade futura

© 2015 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

Local role of androgens in the development of preantral follicles from nonhuman primates cultured individually a in three-dimensional matrix

A B S T R A C T

Keywords:

Folliculogenesis

Androgens

3D follicle culture

Primates

Steroids

Testosterone

Dihydrotestosterone

Objectives: To evaluate the effects of ablation of steroid production and the role of testosterone and dihydrotestosterone in the development of secondary follicles of nonhuman primates (*Macaca mulatta*) in 3D matrix.

Methods: The ovarian cortex (n=8 adult females) was diced and secondary follicles were isolated and cultured individually for 40 days on alginate matrix. Experiment 1: Ablation of steroid production with use of trilostane (TRL) and testosterone replacement. Follicles of 4 animals were assigned to 4 groups: control (vehicle), TRL (TRL from the start of culture), Low testosterone (T) (TRL testosterone and 10 ng/mL), high T (TRL testosterone and 50 ng/mL); Experiment 2: Ablation of steroid production with use of trilostane (TRL) and replacement of dihydrotestosterone (DHT). Follicles of 4 animals were assigned to 4 groups: control (vehicle), TRL (TRL from the start of culture), DHT (DHT 50 ng/mL), DHT + TRL (TRL and DHT 50 ng/mL). It were analyzed: survival, growth, antrum formation, steroid hormone production, and degree of maturation and quality of oocytes.

Results: The percentage of surviving follicles in culture, growth and antrum formation was lower in the presence of TRL in all experiments, compared with the control group. Replacement of T and DHT in the presence of TRL, recovered survival, growth, antrum formation, hormone production, and the quality and maturity of oocytes comparable to the control group. DHT added to standard maturation media promoted an increase in the percentage of survival follicles and antrum formation compared to the control group.

Conclusions: This study provided evidence of the role of androgens since the beginning of folliculogenesis in primates, reinforcing the existence of molecular mechanisms regulating androgenic activity, and new interactions between androgens and steroid hormones. Our findings show that T and DHT can recover survival, growth, antrum formation, hormone production and oocyte viability of *in vitro* cultured preantral follicles exposed to ablation of steroid production. DHT added to standard maturation media promoted an increase in the percentage of follicle survival and antrum formation compared to the control group, opening perspectives to evaluate whether this androgen supplementation could improve follicular development *in vitro*. The knowledge obtained contribute to a understanding of the dynamics of folliculogenesis in primates, still poorly understood, and assists in identifying the optimal conditions for growing follicle, which may in future be applied to assist cancer patients who wish to preserve their future fertility

© 2015 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

All rights reserved.

Introdução

Além do reconhecido papel dos androgênios como precursores do hormônio esteroide, estradiol, e possíveis ações endócrinas no sexo feminino, evidências consideráveis sugerem que os androgênios têm ações parácrinas e autócrinas no ovário, particularmente no folículo em desenvolvimento.¹⁻⁵ Estudos recentes que reportaram a expressão de receptores de androgênio (ARs) em folículos em desenvolvimento^{2,3} sugerem seu papel na fisiologia reprodutiva do sexo feminino.^{4,6,7} Evidências da presença e atividade de ARs em todos os estágios do crescimento folicular em diferentes espécies^{4,5} incluindo murinos,⁸⁻¹¹ suínos,^{12,13} bovinos,¹⁴⁻¹⁶ primatas não humanos¹⁷⁻²⁰ e humanos²¹⁻²³ sugerem que os androgênios têm efeitos ao longo do desenvolvimento folicular. Por meio de observações em camundongos fêmeas, foi descoberto que a inativação de ARs resulta em falência ovariana prematura (FOP). Isso indica que o processo de foliculogênese normal requer ação androgênica mediada por receptores androgênicos.^{2,9,10} Em ovários humanos, pode ser observada a expressão proteica de ARs nas células da granulosa, células da teca e células do estroma durante quase todos os estágios do ciclo menstrual. Contudo, existe uma diferença entre as observações em relação à intensidade imuno-histoquímica observada nos estudos que comprovam esse fato,²¹ o que pode estar relacionado a uma expressão variável desses receptores, que depende do status do desenvolvimento folicular.²⁴

Por um lado, evidências sugerem que os androgênios promovem crescimento folicular precoce.²⁵⁻²⁸ Em sistemas de cultivo *in vitro* de folículos de camundongo, a exposição a androgênios contribuiu para o desenvolvimento de folículos pré-antrais²⁹ e aumentou o diâmetro folicular.³⁰ Outros estudos também observaram que doses farmacológicas de testosterona promovem desenvolvimento precoce em folículos de bovinos³¹ e macacos.³²⁻³⁴ Estes dados reforçam os esforços clínicos em determinar se o pré-tratamento com testosterona transdérmica contribui para o aumento da resposta ovariana a gonadotrofinas em pacientes má-respondedoras em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV).³⁵⁻⁴⁰

Por outro lado, os androgênios podem se tornar prejudiciais em folículos antrais e apresentar efeitos antimaturação e anticrescimento nesse estágio.^{25,27,28,41} Estudos com mulheres portadoras da síndrome dos ovários policísticos (SOP) frequentemente sugerem que a hiperandrogenemia afeta negativamente o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária.^{7,42} Dessa forma, é provável que a ação androgênica nos folículos seja estágio e/ou dose dependente. Os androgênios podem ser, a depender do estágio folicular, promotores ou inibidores do crescimento folicular.^{17,43}

Estudos mais detalhados são necessários para definir os efeitos diretos dos androgênios nos folículos^{31,33,34} e seus oócitos⁴⁴ em estágios específicos da foliculogênese, principalmente em primatas, o que estimulou a feitura do presente estudo. O sistema de cultivo tridimensional (3D), que usa folículos individuais encapsulados no biomaterial alginato,⁴⁵⁻⁴⁷ pode contribuir para estudos sobre as ações diretas de hormônios e fatores locais na foliculogênese em primatas. Recentemente esse sistema de cultivo foi usado por

nosso grupo para o desenvolvimento de folículos de primatas (macacos rhesus) a partir do estágio pré-antral (secundário) até estágio antral de pequeno diâmetro, com a obtenção de função esteroidogênica e maturação oocitária.⁴⁸⁻⁵⁰

O presente estudo teve como objetivo avaliar, pela primeira vez, as ações dos androgênios no desenvolvimento folicular (sobrevida, formação de antro, produção hormonal e maturação oocitária), em folículos pré-antrais individuais de primatas (*Macaca mulatta* – macacos rhesus), com o uso do sistema de cultivo em matriz 3D, por meio da ablação da produção de esteroides^{51,52} e reposição de testosterona (T) e dihidrotestosterona (DHT).

Métodos

Animais e coleta ovariana

A habitação e o cuidado com os animais, macacos rhesus, foram fornecidos pela Divisão de Recursos Animais, no Oregon National Primate Research Center (ONPRC). Os animais foram mantidos dentro de gaiolas, em pares, a temperatura (22 °C) e luminosidade (12 horas claro/escuro) controladas. A dieta oferecida foi a ração Purina (Ralston Purina, Richmond, IN, EUA), ideal para alimentação de macacos, fornecida duas vezes ao dia, acrescida de frutas frescas ou vegetais, uma vez por dia e água *ad libitum*. Os animais foram tratados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, dos Estados Unidos, e os protocolos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados aos Animais do Centro de Pesquisas com Primatas da Universidade do Oregon (Oregon National Primate Research Center, Oregon Health and Science University).

Oito fêmeas adultas de *Macaca mulatta* (idade média nove anos) que exibiam ciclos menstruais regulares de 28 dias, sendo o primeiro dia de menstruação considerado o dia 1 do ciclo, foram usadas neste estudo. A ooforectomia foi feita sob anestesia, por laparoscopia, durante a fase folicular precoce do ciclo (entre os dias 1 e 4), como previamente descrito.⁵³ Os ovários, após removidos, foram imediatamente transferidos para meio Hepes buffered holding media (CooperSurgical, Inc., Trumbull, CT, USA), suplementado com 0,2% de soro humano proteico (SPS, CooperSurgical, Inc.) e 10 µg/ml de antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e mantidos a 37 °C até o momento do isolamento folicular.^{50,54}

Os meios de cultivo e os reagentes usados foram adquiridos da Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO, USA), exceto quando indicado, e o Trilostano (Vetoryl-trilostane Capsules Letter), da FDA (U.S. Food and Drug Administration). O Trilostano foi preparado como uma solução estoque, em que 2,5 mg de trilostano foram diluídos em 10 mL de etanol (veículo), armazenada a 4 °C, que era diluída em meio de cultivo folicular, semanalmente na ocasião da preparação dos meios para o cultivo, de modo que sua concentração fosse 250 ng/mL.

Isolamento folicular, encapsulamento e cultivo

O isolamento, o encapsulamento e o cultivo *in vitro* dos folículos individuais foram feitos conforme já previamente descrito.⁵⁰ O córtex ovariano foi cortado em pequenos cubos

de $1 \times 1 \times 1$ mm e os folículos foram mecanicamente isolados em meio de manipulação (Hepes buffered holding media) com o uso de agulhas calibre 31. Foram selecionados para o encapsulamento folículos secundários de diâmetros entre 125-225 μ m que apresentavam as seguintes características: (i) membrana basal intacta, (ii) duas a três camadas de células da granulosa e (iii) um oócito saudável visível que fosse arredondado e localizado centralmente no interior do folículo, sem a presença de vacúolos ou citoplasma escuro. Os folículos obtidos individualmente de cada um dos animais foram divididos randomicamente entre os grupos de tratamento com 12/24 folículos por grupo.

Os folículos foram transferidos individualmente para gotículas de 5 μ L 0,25% (w/v) de alginato de sódio estéril (FMC BioPolymers, Philadelphia, PA, USA) e solução tamponada PBS (phosphate-buffered saline - 137 mM NaCl, 10 M phosphate, 2,7 mM KCl, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As gotas foram colocadas sobre uma tela de polipropileno (0,1 mm de abertura; McMaster-Carr, Atlanta, GA), que foi então invertida e suavemente batida sobre uma solução *cross-linking* (50 mM CaCl₂, 140 mM NaCl e 10 nM HEPES solution - pH 7,2). Isso fez com que as gotas caíssem na solução e fossem mantidas nela por 30 segundos. Cada folículo encapsulado em alginato foi transferido para poços individuais em uma placa de 48 poços com 300 μ L do meio α MEM (*alpha minimum essential medium* - Invitrogen) suplementado com 0,3% (v/v) de soro sintético substituto (SSS), 0,5 mg/ml de fetuína bovina purificada, 5 μ g/ml de insulina, 5 μ g/ml de transferrina e 5 ng/ml de selenito de sódio (Sigma-Aldrich).

Os folículos foram cultivados a 37 °C e 5% de oxigênio (em 6% CO₂/89% N₂), com FSH recombinante humano (rh) (NV Organon, Oss, Netherlands) a uma dose de 3 ng/mL durante os primeiros 20 dias de cultivo e 0,3 ng/mL pelo período de cultivo restante. Folículos que atingiram o estágio antral foram tratados com gonadotrofina coriônica humana recombinante (hCG) (Merck Serono, Geneva, Switzerland) (100 ng/ml) por 34 horas para iniciar a maturação meiótica do oócito. Após esse período, os oócitos foram coletados com a finalidade de se determinar o grau de maturação e competência oocitária. Amostras de meios de cultivo (150 μ L) foram coletadas, repostas a cada dois dias e armazenadas a -20 °C para posterior análise de hormônios esteroides ovarianos e hormônio anti-Mülleriano (AMH).

Experimento 1: reposição de testosterona

Para avaliar o papel da testosterona na foliculogênese, foi feito um experimento, por meio da reposição de duas diferentes doses de testosterona (T; 10 ou 50 ng/mL, grupos T baixa e T alta) em meio de cultivo com trilostano (TRL - 250 ng/mL, que atua no bloqueio da ação da enzima 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase -3- β HSD) usado desde o início do cultivo até o fim (40 dias).

Folículos secundários obtidos de quatro animais foram cultivados em meio padrão contendo: (1) veículo por 40 dias (grupo controle; n = 85); (2) TRL na dose de 250 ng/mL por 40 dias (grupo TRL; n = 82); (3) TRL e 10 ng/mL de testosterona por 40 dias (grupo T baixa; n = 84); (4) TRL e 50 ng/mL de testosterona por 40 dias (grupo T alta; n = 86).

Experimento 2: reposição de dihidrotestosterona

Com o intuito de confirmar o papel androgênico na foliculogênese de primatas, independentemente de uma possível conversão a estrógeno, um segundo experimento foi feito, por meio da adição de dihidrotestosterona (DHT) (50 ng/mL) ao meio de cultivo com TRL (usado desde o início até o fim do cultivo - 40 dias) ou DHT isoladamente.

Folículos secundários de quatro animais foram cultivados em meio padrão contendo: (1) veículo (grupo controle; n = 72); (2) TRL na dose de 250 ng/mL desde o início até o fim do cultivo (40 dias) (grupo TRL; n = 66); (3) DHT isoladamente (50 ng/mL) (grupo DHT; n = 69); (4) DHT acrescido de TRL (grupo TRL + DHT; n = 66).

Sobrevida folicular, crescimento e formação de antro

A sobrevida folicular, o diâmetro e a formação de antro foram avaliados por meio de um microscópio invertido Olympus CK40 (Tóquio, Japão) com luz transmitida e objetivas de fase e uma câmera digital Olympus DP11 anexada (Olympus Imaging America Inc., Center Valley, PA, USA) e software de imagem ImageJ 1.44 p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).⁵⁴ Os folículos foram medidos a partir da camada externa de células e as medidas incluíram uma medida no maior diâmetro do folículo e uma segunda medição perpendicular à primeira. A média desses valores foi calculada e considerada como o diâmetro do folículo. Os folículos foram considerados degenerados e em processo de atresia quando o oócito estava escuro ou não estava cercado por células da granulosa, as células da granulosa se tornaram escuras e fragmentadas ou o diâmetro do folículo estava diminuído.^{49,50}

Classificação do crescimento folicular

Os folículos foram divididos em três categorias de acordo com o seu padrão de crescimento até a quinta semana de cultivo:^{50,54} (1) crescimento rápido: aqueles que atingiram um diâmetro de 500 μ m ou mais; (2) crescimento lento: aqueles que atingiram entre 230 e 500 μ m de diâmetro; (3) sem crescimento: aqueles que não excederam um diâmetro de 230 μ m no fim da quinta semana de cultivo.

Dosagem de esteroides ovarianos

Amostras de meio coletadas semanalmente durante todo o período de cultivo foram analisadas para a determinação das concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) para os experimentos 1 e 2. As análises das concentrações de E2 e P4 foram feitas pelo laboratório de ensaios hormonais do ONPRC, Endocrine Technology Support Core,^{50,54} por meio do método de quimiluminescência, com o uso de um Immulite 2000, com técnica previamente validada para meios de cultivo folicular de macacos, reportados previamente.⁴⁹

Coleta de oócitos, maturação e fertilização

Os oócitos coletados foram fotografados e classificados de acordo com o estágio de maturação nuclear.⁵⁴ Foi feita coleta de sêmen e fertilização *in vitro* convencional nos oócitos em

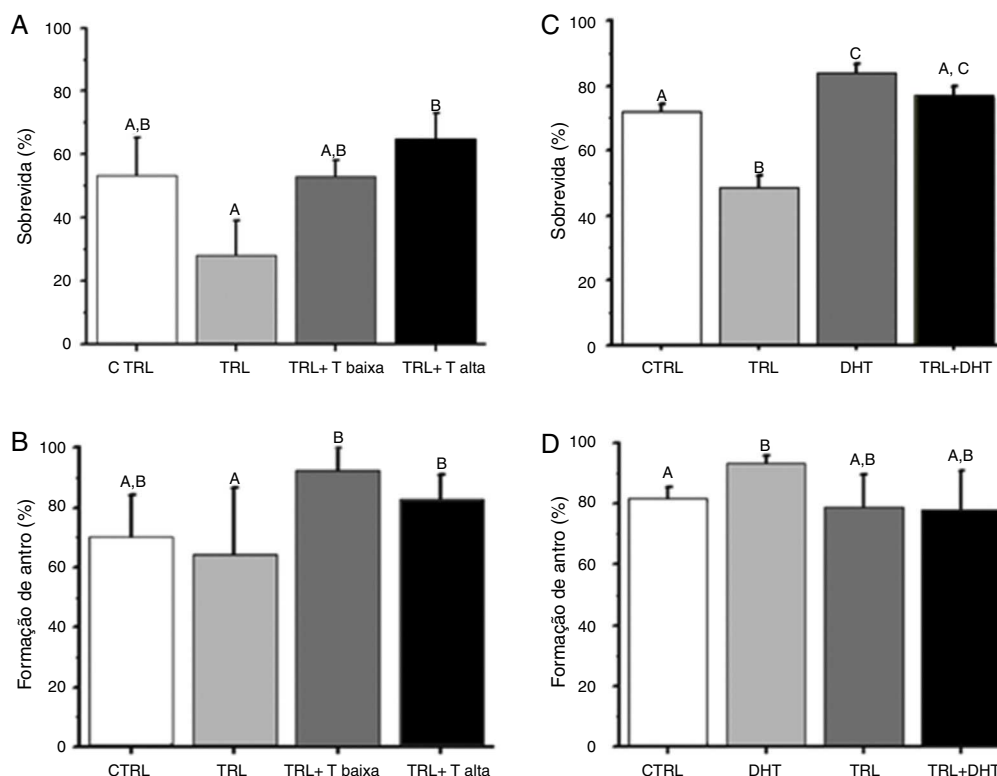


Figura 1 – Efeito da reposição de T e DHT sobre a sobrevida e formação de antro de folículos secundários de *Macaca mulatta* cultivados individualmente em matriz 3 D por 40 dias.

Nota: A. Sobrevida – Reposição de T; B. Formação de antro – Reposição de T; C. Sobrevida – Reposição de DHT; D. Formação de antro – Reposição de DHT.

CTRL: controle (veículo); TRL: trilostano (250 ng/mL desde o início do cultivo); TRL + T baixa (250 ng/mL de trilostano + 10 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); TRL + T alta (250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); DHT: 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; TRL + DHT: 250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; Diferentes letras (A, B, C) indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

metáfase II (MII) dos experimentos de Reposição de T e DHT, pelo Laboratório de Reprodução Assistida (Assisted Reproductive Technology (ART)/Embryonic Stem Cell Support Core) no ONPRC.⁵⁴ A fertilização *in vitro* convencional foi feita nos oócitos MII como previamente descrito.^{54,55} O zigoto resultante foi transferido para 500 μ L de meio de cultura embrionária hamster-9 com 5% de FBS e cultivado a 37° C a 6% CO₂, 5% O₂ e 89% de N₂.⁵⁶ O embrião foi fotografado diariamente durante seu desenvolvimento. Reagentes e protocolos para a cultura de embriões foram fornecidos pelo núcleo ART/ONPRC.^{57,58}

Análise estatística

A significância estatística foi analisada por meio do software R 2.15.3, com o uso de uma regressão binomial logística para as análises de sobrevida e formação de antro e regressão marginal log-linear para a análise de hormônios esteroides. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e valores foram representados como média $\pm$ erro padrão. A sobrevida folicular e a formação de antro representaram quatro animais individualmente para cada grupo de tratamento em ambos os experimentos. O crescimento folicular,

a produção de esteroides e a maturação oocitária foram analisados para cada folículo individualmente.

Resultados

Experimento 1: reposição de testosterona

A) Efeito sobre a sobrevida folicular e a formação de antro.

A adição de dose alta de T ao TRL aumentou a sobrevida comparada ao grupo TRL (fig. 1A). Alguns folículos atingiram a formação de antro no grupo TRL (fig. 1B), porém a porcentagem de folículos antrais no grupo T alta + TRL ($83 \pm 8\%$) foi maior em relação ao grupo que recebeu TRL isoladamente ($65 \pm 22\%$, $p < 0,05$). Além disso, a porcentagem de folículos antrais no grupo T baixa + TRL ($92 \pm 8\%$) também foi maior do que no grupo TRL.

B) Efeito sobre o crescimento folicular

A porcentagem de folículos sem crescimento foi maior no grupo TRL, em relação aos grupos TRL + T baixa e TRL + T alta (tabela 1, Reposição de T). Contudo, também foi evidente a observação de folículos de crescimento rápido nesse grupo. Folículos sem crescimento não foram observados nos grupos

Tabela 1 – Efeito da reposição de T e DHT sobre as características de crescimento folicular de folículos secundários de *Macaca mulatta* cultivados individualmente em matriz 3 D por 40 dias

Cultivo folicular	Total	Sem crescimento	Crescimento lento	Crescimento rápido
Reposição de T				
CTRL	47	3 (6%) ^{a,b}	31 (66%) ^{a,b}	13 (28%) ^{a,b}
TRL	23	5 (22%) ^b	13 (57%) ^b	5 (21%) ^a
TRL+T baixa	47	0 (0%) ^a	29 (62%) ^{a,b}	18 (38%) ^b
TRL+T alta	53	0 (0%) ^a	37 (70%) ^a	16 (30%) ^{a,b}
Reposição de DHT				
CTRL	51	9 (18%) ^a	22 (43%) ^a	20 (39%) ^a
TRL	30	5 (17%) ^{a,b}	16 (53%) ^b	9 (30%) ^{b,c}
DHT	58	4 (7%) ^c	35 (60%) ^c	19 (33%) ^b
TRL+DHT	51	11 (22%) ^d	26 (51%) ^{b,d}	14 (27%) ^c

Nota: CTRL: controle (veículo); TRL: trilostano (250 ng/mL desde o início do cultivo); TRL + T baixa (250 ng/mL de trilostano + 10 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); TRL + T alta (250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); DHT: 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; TRL + DHT: 250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; Diferentes letras (a, b, c) dentro da mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

de reposição de baixa ou alta dose de T e a porcentagem de folículos que apresentam crescimento rápido atingiu, pela primeira vez, mais do que 30% da população folicular total em ambos os grupos com reposição de T e apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos TRL (21%) e TRL + T baixa (38%). O diâmetro folicular dos folículos de crescimento lento, tanto no grupo de reposição de baixa quanto no de alta dose de T (350 ± 15 ou $361 \pm 14 \mu\text{m}$), foi maior em relação ao grupo TRL ($260 \pm 12 \mu\text{m}$, $p < 0,05$) e comparável à média do diâmetro encontrado no grupo controle ($318 \pm 14 \mu\text{m}$). Em contraste, a alta dose de T diminuiu ($p < 0,05$) o diâmetro de folículos de crescimento rápido ($572 \pm 42 \mu\text{m}$) comparado com o diâmetro no grupo controle ($773 \pm 56 \mu\text{m}$).

C) Efeito sobre a produção de esteróides ovarianos

O TRL adicionado isoladamente diminuiu os níveis de P4 produzidos por folículos de crescimento lento (dados não mostrados) e rápido (fig. 2A). Inesperadamente, a adição de baixa dose de T restabeleceu os níveis de P4 para níveis semelhantes aos do grupo controle, especialmente para folículos de crescimento rápido. Em contraste, os níveis de P4 apresentaram-se diminuídos ($p < 0,05$) no grupo T alta em relação ao grupo controle a concentrações que se assemelham às encontradas no grupo TRL.

Quando E2 foi mensurado como um marcador de função folicular esteroidogênica, observou-se que o TRL administrado isoladamente reduziu a concentração de E2 em relação ao grupo controle (63 ± 13 vs. $247 \pm 47 \text{ pg/mL}$, $p < 0,05$) em folículos de crescimento lento. Mas a exposição a doses baixa ou alta de T na presença de TRL marcadamente elevaram os níveis de E2 (2734 ± 338 e $18723 \pm 1758 \text{ pg/mL}$) respectivamente. Os resultados para folículos de crescimento rápido exibiram uma tendência similar (fig. 2B), exceto que o TRL adicionado isoladamente não diminuiu os níveis de E2, aumentados em 14 vezes em comparação com os folículos de crescimento lento. Apesar disso, observou-se um aumento dependente da dose ($p < 0,05$) nos níveis de E2, com a adição de T, em relação ao grupo TRL.

D) Efeitos sobre o grau de maturação, qualidade oocitária e fertilização

Poucos folículos antrais e seus oócitos foram analisados após exposição ao hCG durante a exposição ao TRL (tabela 2;

Reposição de T). Porém, a exposição a T durante o tratamento com TRL recuperou a formação de folículos antrais, que de forma consistente deram origem a oócitos saudáveis, embora sua maioria se encontrasse no estágio de vesícula germinativa (GV). Ambos os grupos T baixa e controle apresentaram folículos que deram origem a um oócito MI e os grupos T alta e controle apresentaram folículos que deram origem a oócitos MII após a exposição ao hCG. Os diâmetros de ambos os oócitos MII obtidos eram superiores a $130 \mu\text{m}$. Após FIV, a fertilização foi confirmada pela presença de dois corpúsculos polares e dois pró-núcleos (dados não mostrados). Entretanto, os zigotos mantiveram-se sem apresentar divisão celular.

Experimento 2: reposição de dihidrotestosterona

A) Efeito sobre a sobrevivência folicular e a formação de antro

A adição de DHT em presença do TRL recuperou a porcentagem de folículos sobreviventes para os níveis encontrados no grupo controle (fig. 1C); a resposta foi similar ao observado após adição de T (fig. 1A). Notavelmente, a administração de DHT isoladamente contribuiu para o aumento da porcentagem de folículos que sobreviveram para mais do que 80%, acima ($p < 0,05$) do que foi observado para o grupo controle.

Além disso, a porcentagem de folículos antrais no grupo que recebeu DHT isoladamente (grupo DHT) ($93 \pm 3\%$) foi superior ($p < 0,05$) à porcentagem encontrada no grupo controle ($82 \pm 4\%$) (fig. 1D). B) Efeito sobre o crescimento folicular

Diferentemente do que foi observado no Experimento 1, a exposição ao TRL isoladamente não alterou as porcentagens de folículos sem crescimento ou que apresentam crescimento lento ou rápido e a reposição de DHT não apresentou um efeito positivo aparente (tabela 1; Reposição de DHT). Entretanto, a adição isolada de DHT reduziu o número/porcentagem (7%) de folículos sem crescimento, comparado com os grupos controle, TRL e TRL + DHT. O TRL novamente diminuiu o diâmetro de folículos de crescimento lento em relação aos folículos controle (315 ± 13 vs. $357 \pm 16 \mu\text{m}$, $p < 0,05$), porém essa diferença desapareceu quando o tratamento com TRL foi combinado com a adição de DHT ($373 \pm 14 \mu\text{m}$). DHT administrada isoladamente não apresentou efeito no diâmetro de folículos de crescimento lento (dados não mostrados), mas contribuiu

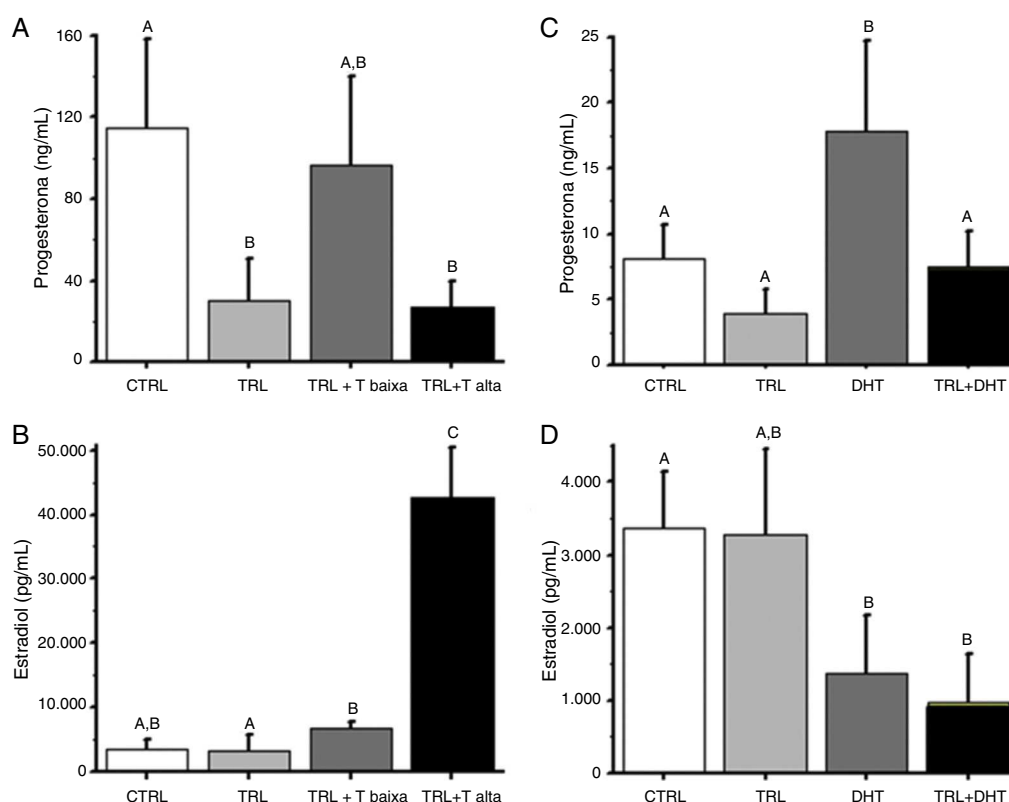


Figura 2 – Efeito da reposição de T e DHT sobre a produção de progesterona e estradiol por folículos secundários de *Macaca mulatta* cultivados individualmente em matriz 3 D por 40 dias.

Nota: A e B. Reposição de T; C e D. Reposição de DHT; CTRL: controle (veículo); TRL: trilostano (250 ng/mL desde o início do cultivo); TRL + T baixa (250 ng/mL de trilostano + 10 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); TRL + T alta (250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); DHT: 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; TRL + DHT: 250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; Diferentes letras (A, B, C) indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Efeito da reposição de T e DHT nas características de oócitos coletados de folículos antrais no fim do cultivo (34 h após administração de hCG)

Cultivo folicular	Número (n) de						Diâmetro (μm)*		
	Folículos analisados	Oócitos coletados	Oócitos degenerados	Oócitos saudáveis			Oócitos VG	Oócitos MI	Oócitos MII
				VG	MI	MI			
Reposição de T									
CTRL	15	15	2	12	1	1	119 ± 5 ^a	143	131
TRL	4	4	2	2	0	0	117 ± 2 ^a	-	-
TRL+T baixa	16	16	1	13	1	0	119 ± 14 ^a	131	-
TRL+T alta	13	13	0	12	0	1	102 ± 14 ^a	-	147
Reposição de DHT									
CTRL	21	21	6	13	0	2	110 ± 2 ^a	-	123 ± 3
TRL	8	8	6	2	0	0	112 ± 2 ^{a,b}	-	-
DHT	10	10	4	6	0	0	116 ± 4 ^{a,b}	-	-
TRL+DHT	13	13	3	9	0	1	118 ± 2 ^b	-	117

Nota: CTRL: controle (veículo); TRL: trilostano (250 ng/mL desde o início do cultivo); TRL + T baixa (250 ng/mL de trilostano + 10 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); TRL + T alta (250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de testosterona, desde o início do cultivo); DHT: 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; TRL + DHT: 250 ng/mL de trilostano + 50 ng/mL de dihidrotestosterona, desde o início do cultivo; VG: vesícula germinativa; MI: metáfase I; MII: metáfase II. * Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, com cada diâmetro oocitário como um dado individual; Diferentes letras (a, b, c) dentro da mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$); O número de folículos que atingiram o diâmetro médio de 1 mm e receberam hCG.

para a diminuição do tamanho de folículos de crescimento rápido comparado com os controles (607 ± 29 vs. $726 \pm 50 \mu\text{m}$, $p < 0,05$).

C) Efeito sobre a produção de esteroides ovarianos

Como no Experimento 1, TRL diminuiu ($p < 0,05$) os níveis de P4 produzidos por folículos de crescimento lento e a reposição com DHT recuperou os níveis produzidos e os tornou similares aos níveis encontrados no grupo controle (dados não mostrados). Da mesma forma, nem a adição de DHT (fig. 2C) ou T (fig. 2A) alterou a produção de P4 quando combinados com o TRL. Contudo, a adição de DHT isoladamente aumentou os níveis de P4 produzidos por folículos de crescimento lento (dados não mostrados) e de crescimento rápido (fig. 2C). Diferentemente da adição de T (fig. 2B), a adição de DHT + TRL reduziu significativamente o E2 produzido por folículos de crescimento lento (dados não mostrados) e de crescimento rápido (fig. 2D) quando comparados com o grupo controle. Além disso, DHT administrado de forma isolada replicou esse mesmo efeito, também quando comparado ao grupo controle.

D) Efeitos sobre o grau de maturação, qualidade oocitária e fertilização

Como notado para o Experimento 1, poucos oócitos saudáveis foram coletados a partir de folículos antrais no grupo TRL comparados com os do grupo controle (tabela 2; Reposição de DHT). Em contraste, o grupo de reposição de DHT apresentou folículos que deram origem tipicamente a oócitos saudáveis (10 de 13), incluindo um oócito em estágio MII. Notavelmente, o diâmetro dos oócitos VG obtidos a partir do grupo de reposição de DHT (grupo TRL + DHT) foi maior ($p < 0,05$) do que os obtidos no grupo controle. A exposição a DHT isoladamente (grupo DHT) deu origem a oócitos com características semelhantes àqueles obtidos no grupo controle ou de reposição de DHT, exceto que nenhum oócito MII foi observado.

Discussão

A proposta do presente estudo foi investigar pela primeira vez, o papel dos androgênios no desenvolvimento folicular (sobrevida, formação de antro, produção hormonal e maturidade oocitária) de folículos pré-antrais frescos de primatas não humanos cultivados individualmente, em sistema de cultivo *in vitro* em matriz 3D por meio da ablação da produção de esteroides e reposição de T e DHT.

Nossos achados mostraram claramente que a T e a DHT podem recuperar a sobrevivência, o crescimento, a formação de antro, a produção hormonal e a viabilidade oocitária de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* em matriz 3D de alginato, expostos a ablação da produção de esteroides.

A exposição ao TRL desde o início do cultivo para a sustentação de um ambiente pobre em esteroides afeta a sobrevivência, o crescimento e a formação de antro dos folículos. Os efeitos do bloqueio da esteroidogênese também puderam ser observados na qualidade oocitária e grau de maturação. Os efeitos da ablação da produção de esteroides podem dever-se a perda da ação local dos progestagênios, androgênios ou estrogênios, individualmente ou em conjunto. Além dos ARs,^{19,21,59,60} há evidências da presença de PRs,⁶¹⁻⁶³ e ERs^{64,65} em folículos de primatas com possíveis ações locais (progestagênios^{63,66,67}; estrogênios^{68,69}). Os resultados deste

estudo são consistentes com achados obtidos em estudos *in vivo* com macacas, que mostraram que um dos efeitos da ação do TRL parece ser a inibição da produção/ação da progesterona, uma vez que a administração do TRL conjunta com o hCG bloqueou a ovulação, enquanto que a administração concomitante de progestina (R5020) preveniu a ação antiovatória.⁷⁰ Estudos prévios *in vitro* também mostraram que a administração do TRL efetivamente inibiu a produção de P4 e reduziu o número de células positivas para receptores de progesterona (PRs).⁷¹

A adição de testosterona ao meio de cultivo desprovido de esteroides contribuiu marcadamente para o aumento da sobrevivência e a formação de antro de folículos pré-antrais individuais de primatas não humanos cultivados *in vitro*. A adição de testosterona em presença de TRL também deu origem a oócitos maduros e saudáveis. Um maior número de folículos antrais foi formado tanto quando uma dose baixa (remanescente aos níveis circulantes em primatas) ou uma dose alta (como encontrado no fluido folicular de folículos maduros de primatas) de testosterona foi adicionada no meio de cultivo, em relação ao número de folículos antrais formados no grupo TRL. O crescimento também foi recuperado para o padrão observado no grupo controle. Oócitos saudáveis foram produzidos após exposição a T durante o tratamento com TRL, nos estágios VG, MI e MII, e dois embriões foram formados. Esses dados sugerem que a reposição de androgênios pode promover a maturação e a viabilidade oocitária e que a ação androgênica no folículo pode estar relacionada a interações entre o oócito e células somáticas via fatores secretados pelo oócito.²⁴

O E2 apresentou-se marcadamente aumentado na exposição a doses baixa e alta de T em presença de TRL, presumidamente devido à aromatização de T por células da granulosa de folículos antrais.⁷² Efeitos locais do E2 nos folículos têm sido reportados e parecem ser espécie-dependentes. O E2 parece ser importante em eventos envolvidos na foliologênese, especialmente em roedores,^{50,65,68,73} porém seu papel em folículos de primatas ainda está pouco claro.^{64,73} A recuperação da sobrevivência, a formação de antro e o crescimento nos grupos com reposição de T podem ser devidos em parte à possível conversão de T em E2 pela aromatase P450 e sinalização estrogênio-receptor no folículo. Experimentos anteriores, nos quais altas doses de T foram administradas,^{74,75} permitiram que fosse proposto que os efeitos “androgênicos” eram mediados por estrogênios que foram convertidos por meio de ERs, e não por meio de ARs. Contudo, os androgênios também podem ser produzidos pelo ovário e a testosterona repostada poderia ser convertida em dihidrotestosterona pela enzima 5 α -redutase nas células da granulosa ou ter efeitos diretos sobre os folículos, responsáveis em parte pela restauração da sobrevivência, formação de antro e pelo crescimento observados em nosso experimento *in vitro*. Com o intuito de testar essa hipótese, a DHT, um androgênio não aromatizável, foi adicionado ao cultivo dos folículos, conforme descrito no Experimento 2.

Assim como para a exposição a T, a DHT em conjunto com TRL recuperou a habilidade dos folículos em se desenvolver e produzir oócitos maduros. A adição de DHT com TRL recuperou a porcentagem de folículos sobreviventes aos níveis encontrados no grupo controle. Como esperado, o diâmetro de folículos com crescimento lento foi reduzido na presença

de TRL administrado isoladamente, comparado aos controles, mas a diferença desapareceu quando DHT foi adicionada ao cultivo, como aconteceu quando T foi adicionada. Para folículos que cresceram rapidamente, a DHT (isoladamente) diminuiu o tamanho dos folículos comparado com controles, o que foi similarmente observado quando uma dose alta de T foi administrada em presença de TRL. Os níveis de P4 foram encontrados reduzidos em folículos de crescimento lento quando TRL foi adicionado isoladamente e os níveis foram restaurados aqueles encontrados no grupo controle quando DHT foi reposta, de forma similar como o que foi observado quando uma dose baixa de T foi adicionada ao cultivo para folículos de crescimento rápido. Da mesma forma, foi observado um efeito positivo em relação à qualidade oocitária quando os folículos foram expostos a DHT. A maioria dos oócitos coletados de folículos antrais quando DHT foi reposta foi saudável, incluindo um oócito MII. É importante ressaltar que o diâmetro dos oócitos VG saudáveis foi superior no grupo DHT comparado com os controles e a exposição a DHT isoladamente deu origem a oócitos com características similares às observadas no grupo controle ou de reposição de DHT, exceto que oócitos MII não foram observados. Esses resultados embasam fortemente a ideia de que as ações dos androgênios promovem crescimento folicular precoce, esteroidogênese e desenvolvimento oocitário em folículos de primatas desde o início da foliculogênese.

Diferentemente da adição de T, a combinação de DHT com TRL não contribuiu para o aumento da produção de E2 por folículos de crescimento lento e rápido comparados com os grupos controle e TRL (isoladamente), o que base à conclusão de que a T, e não a DHT, é aromatizada no folículo. Como notado, muitas mudanças causadas por T foram mimetizadas por DHT. Dessa forma, muitos dos efeitos positivos no desenvolvimento folicular encontrados após a reposição de T provavelmente não são devidos à ação estrogênica. Sendo assim, é possível inferir que os androgênios apresentam um papel local essencial durante o desenvolvimento e a maturação folicular em primatas não humanos. Corroborando nossos resultados em folículos de primatas, o tratamento de folículos de camundongo com hidroxiflutamida ou bicalutamida, dois componentes antiandrogênicos, reduziu o crescimento folicular durante o estágio pré-antral, alterou a função esteroidogênica e impediu a maturação meiótica de oócitos em resposta ao hCG.³

Nossos resultados apoiam a evidência de que ação dos androgênios no folículo pode ser estágio e/ou dose-dependente. Estudos têm evidenciado o papel dos androgênios no estágio folicular pré-antral.^{2,3} Contudo, como frequentemente observado em estudos *in vivo* com pacientes com SOP,^{7,42} os androgênios podem apresentar efeitos negativos sobre os folículos, a depender de seus níveis intrafoliculares, especialmente se eles são altos, e afetar o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária.^{17,43,76} Particularmente perplexo nesse experimento é a evidência de que uma dose baixa de T (e DHT), mas não uma dose alta de T, restaurou os níveis de P4 aos níveis encontrados no grupo controle, apesar da presença de TRL. Nesse caso, a T demonstra um efeito dose dependente, no qual uma baixa dose de T contribui para a manutenção de níveis adequados de P4 e uma dose alta afeta negativamente a produção de P4. Entretanto, os possíveis mecanismos envolvidos na conversão ativa

de androgênios em progesterona, ou na sinalização de receptores androgênicos que promovem a produção de 3- β -HSD independentemente da progesterona, não são claros.

A administração isolada de DHT replicou muitos dos efeitos observados quando T ou DHT foi adicionado em conjunto com TRL. A porcentagem de folículos sobreviventes e a porcentagem de formação de folículos antrais foi maior do que o observado no grupo controle. Em relação aos efeitos no crescimento de folículos de crescimento rápido, DHT administrada isoladamente diminuiu o tamanho dos mesmos, o que também foi observado quando uma dose alta de T foi adicionada em presença de TRL. A adição isolada de DHT também reduziu a porcentagem de folículos sem crescimento, comparado com controles ou quando DHT estava presente em conjunto com TRL. Em contraste ao observado quando DHT e T foram adicionados com TRL, a adição de DHT isoladamente aumentou os níveis de P4 produzidos por folículos de crescimento lento e rápido. Esses resultados também são consistentes com a ideia de que os androgênios são essenciais na foliculogênese.

Apesar de outros androgênios estarem presentes no ovário, apenas a T e seu metabólito DHT têm atividade androgênica direta por meio de ARs.⁷⁷⁻⁷⁹ Diversos estudos documentam a expressão de ARs em ovários de mamíferos,^{8-13,15-23,59} e a ação dos androgênios durante a foliculogênese ovariana e mostram que são indispensáveis para um processo de foliculogênese normal.⁸⁰⁻⁸²

Este estudo *in vitro* apresentou novas evidências do papel local essencial dos androgênios desde os estágios iniciais da foliculogênese de primatas não humanos, fortaleceu a existência de mecanismos moleculares que regulam a atividade de ARs, a atividade androgênica^{3,77} e novas possíveis interações entre androgênios com outros hormônios esteroides. A DHT adicionada ao meio de maturação padrão promoveu aumento da porcentagem de sobrevivência e formação de antro folicular quando comparada com o grupo controle e abriu perspectivas de se avaliar se a suplementação desse androgênio poderia melhorar o desenvolvimento folicular *in vitro*. Novos conhecimentos obtidos por meio deste estudo podem ajudar no entendimento da dinâmica do processo do desenvolvimento folicular, que ainda é muito pouco compreendida, principalmente em primatas.⁸³ Além disso, desempenharia um papel crucial no entendimento da etiopatogênese de distúrbios ovulatórios humanos, com destaque para a SOP, além de favorecer a identificação das condições ótimas para o crescimento de folículos de primatas *in vitro*, com inúmeras aplicabilidades clínicas, como para a obtenção de oócitos maduros saudáveis após cultivo *in vitro* de tecido ovariano criopreservado em pacientes oncológicas.⁸⁴⁻⁸⁹

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001;121(5):647-53.

2. Kimura S, Matsumoto T, Matsuyama R, Shiina H, Sato T, Takeyama K, Kato S. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(5):183–9.
3. Lenie S, Smits J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 2009;80(4):685–95.
4. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Androgen actions and the ovary. *Biol Reprod.* 2008;78(3):380–9.
5. Walters KA, Middleton LJ, Joseph SR, Hazra R, Jimenez M, Simanainen U, Allan CM, Handelsman DJ. Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility. *Biol Reprod.* 2012;87(6):151, 27.
6. Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum Reprod Update.* 2010;16(5):543–58.
7. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(12):828–37.
8. Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol.* 1995;145:535–43.
9. Sen A, Hammes SR. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *Mol Endocrinol.* 2010;7:1393–403.
10. Xue K, Kim JY, Liu JY, Tsang BK. Insulin-like 3 induced rat preantral follicular growth is mediated by growth differentiation factor 9. *Endocrinology.* 2014;155(1):156–67.
11. Xue K, Liu JY, Murphy BD, Tsang BK. Orphan nuclear receptor NR4A1 is a negative regulator of DHT-induced rat preantral follicular growth. *Mol Endocrinol.* 2012;26(12):2004–15.
12. Campo SM, Carson RS, Findlay JK. Distribution of specific androgen binding sites within the ovine ovarian follicle. *Mol Cell Endocrinol.* 1985;39:255–65.
13. Cárdenas H, Pope WF. Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle. *Mol Reprod.* 2002;62(1):92–8.
14. Braw-tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicular growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 1997;109:165–71.
15. Hampton JH, Manikkam M, Lubahn DB, Smith MF, Garverick HA. Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol.* 2004;27:81–8.
16. Glister C, Satchell L, Knight PG. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. *Reproduction.* 2010;140(5):699–712.
17. Hillier SG, Tetsuka M. Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1997;11(2):249–60.
18. Weil SJ, Vendola K, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, Okafor J, Bondy CA. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(7):2479–85.
19. Duffy DM, Abdelgadir SE, Stott KR, Resko JA, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB. Androgen receptor mRNA expression in the rhesus monkey ovary. *Endocrine.* 1999;11(1):23–30.
20. McEwan IJ, McGuinness D, Hay CW, Millar RP, Saunders PT, Fraser HM. Identification of androgen receptor phosphorylation in the primate ovary in vivo. *Reproduction.* 2010;140(1):93–104.
21. Horie K, Takakura K, Fujiwara H, Suginami H, Liao S, Mori T. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. *Hum Reprod.* 1992;7:184–90.
22. Suzuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod.* 1994;9:1589–95.
23. Kim SS. General overview of ovarian cryobanking. In: Donnez J, Kim SS, editors. *Principles and practice of fertility preservation.* 1st ed. Cambridge University Press; 2011. p. 328–41.
24. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:16.
25. Hillier SG, de Zwart FA. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology.* 1981;109(4):1303–5.
26. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2951–6.
27. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, Grootegoed JA, Uilenbroek JT, Themmen AP. Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre-ovulatory follicles in the rat. *Hum Reprod.* 2000;15(12):2504–11.
28. Young JM, Henderson S, Souza C, Ludlow H, Groome N, Activin McNeilly AS. B is produced early in antral follicular development and suppresses thecal androgen production. *Reproduction.* 2012;143(5):637–50.
29. Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fertil.* 1998;113(1):27–33.
30. Wang H, Andoh K, Hagiwara H, Xiaowei L, Kikuchi N, Abe Y, Yamada K, Fatima R, Mizunuma H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology.* 2001;142(11):4930–6.
31. Yang MY, Fortune JE. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Biol Reprod.* 2006;75(6):924–32.
32. Harlow CR, Hillier SG, Hodges JK. Androgen modulation of follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell steroidogenesis in the primate ovary. *Endocrinology.* 1986;119(3):1403–5.
33. Harlow CR1, Shaw HJ, Hillier SG, Hodges JK. Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity. *Endocrinology.* 1988;122(6):2780–7.
34. Vendola K, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod.* 1999;14(9):2328–32.
35. Balasch J, Fábregues F, Peñarrubia J, Carmona F, Casamitjana R, Creus M, Manau D, Casals G, Vanrell JA. Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Human Reproduction.* 2006;21(7):1884–93.
36. Fábregues F, Peñarrubia J, Creus M, Manau D, Casals G, Carmona F, Balasch J. Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: a randomized, clinical trial. *Hum Reprod.* 2009;24:349–59.
37. Sönmezer M, Cil AP, Oktay K. Ongoing pregnancies from early retrieval of prematurely developing antral follicles after DHEA supplementation. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(6):816–9.
38. Sönmezer M, Ozmen B, Cil AP, Ozkavukçu S, Taşçı T, Olmuş H, Atabekoğlu CS. Dehydroepiandrosterone supplementation

- improves ovarian response and cycle outcome in poor responders. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(4):508–13.
39. Wiser A, Gonen O, Ghetler Y, Shavit T, Berkovitz A, Shulman A. Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: a randomized prospective study. *Hum Reprod*. 2010;25(10):2496–500.
 40. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment? *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:116.
 41. Billig H1, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133:2204–12.
 42. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*. 2008;63(1):39–48.
 43. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest*. 1998;101:2622–9.
 44. Vendola K. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod*. 1999;61:353–7.
 45. Kreeger PK, Deck JW, Woodruff TK, Shea LD. The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials*. 2006;27(5):714–23.
 46. Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng*. 2006;12(10):2739–46.
 47. West ER, Shea LD, Woodruff TK. Engineering the follicle microenvironment. *Semin Reprod Med*. 2007;25(4):287–99.
 48. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, Woodruff TK. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Human Reproduction*. 2009;24:2531–40.
 49. Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biology of Reproduction*. 2009;81:587–94.
 50. Xu J, Bernuci MP, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB, Stouffer RL. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction*. 2010;140(5):685–97.
 51. Potts GO, Creange JE, Harding HR, Schane HP. Trilostane, an orally active inhibitor of steroid biosynthesis. *Steroids*. 1978;32:257.
 52. Schane HP, Potts GO, Creange JE. Inhibition of ovarian, placental and adrenal steroidogenesis in the rhesus monkey by trilostane. *Fertility and Sterility*. 1979;32(4):464–7.
 53. Duffy DM, Stouffer RL. Follicular administration of a cyclooxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2825–31.
 54. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau KY, Barrett SL, Zelinski MB, Stouffer RL. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Hum Reprod*. 2011;26:1061–72.
 55. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Molskness TA, Ting AY, Stouffer RL, Zelinski MB. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Hum Reprod*. 2013;28(8):2187–200.
 56. Schramm RD, Paprocki AM. Birth of rhesus monkey infant after transfer of embryos derived from in-vitro matured oocytes: short communication. *Hum Reprod*. 2000;15:2411–4.
 57. Meng L, Wolf DP. Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1997;12(5):1062–8.
 58. Meng L1, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod*. 1997;57(2):454–9.
 59. Campo SM, Carson RS, Findlay JK. Acute effect of PMSG on ovarian androgen-binding sites in the intact immature female rat. *Reprod Fertil Dev*. 1985;4:55–65.
 60. Hild-Petito S, West NB, Brenner RM, Stouffer RL. Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biol Reprod*. 1991;44(3):561–8.
 61. Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesterone-binding protein with gamma aminobutyric acidA receptor-like features. *Biol Reprod*. 1998;58:1131–7.
 62. Gava N, Clarke CL, Byth K, Arnett-Mansfield RL, DeFazio A. Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*. 2004;145:3487–94.
 63. Peluso JJ. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol Reprod*. 2006;75:2–8.
 64. Chian RC, Asangla A, Clarke HJ, Tulandi T, Tan SL. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during in vitro culture. *Fertil Steril*. 1999;71:61–6.
 65. Bishonga C, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M, Ishikawa A. In vitro growth of mouse ovarian preantral follicles and the capacity of their oocytes to develop to the blastocyst stage. *J Vet Med Sci*. 2001;63:619–24.
 66. Duleba AJ, Spaczynski R, Olive DL, Behrman HR. Divergent mechanisms regulate proliferation/survival and steroidogenesis of theca-interstitial cells. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:193–8.
 67. Słomczyńska M, Krok M, Pierściński A. Localization of the progesterone receptor in the porcine ovary. *Acta Histochem*. 2000;102(2):183–91.
 68. Drummond AE, Findlay JK. The role of estrogens in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;151:57–64.
 69. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 2001;45:116–24.
 70. Hibbert ML, Stouffer RL, Wolf DP, Zelinski-Wooten MB. Midcycle administration of a progesterone synthesis inhibitor prevents ovulation in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(5):1897–901.
 71. Duffy DM, Molskness TA, Stouffer RL. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in luteinized granulosa cells of rhesus monkeys are regulated in vitro by gonadotropins and steroids. *Biol Reprod*. 1996;54(4):888–95.
 72. Xing D, Oparil S, Yu H, Gong K, Feng W, Black J, Chen YF, Nozell S. Estrogen modulates NF(B signaling by enhancing I(B) levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor-β. *PLoS One*. 2012;7(6):e36890.
 73. Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL, Durrant BS. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology*. 2006;65:1037–47.
 74. Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol Reprod*. 1979;20(2):261–8.

75. Nandedkar TD, Munshi SR. Effect of dihydrotestosterone on follicular development, ovulation and reproductive capacity of mice. *J Reprod Fertil.* 1981;62:21-4.
76. Cardenas H, Pope WF. Administration of testosterone from day 13 of the estrous cycle to estrus increased the number of corpora lutea and conceptus survival in gilts. *J Anim Sci.* 1997;75:202-7.
77. Kirilovas D, Naessen T, Bergström M, Bonasera TA, Bergström-Pettermann E, Holte J, Carlström K, Simberg N, Långström B. Effects of androgens on aromatase activity and 11C-vorozole binding in granulosa cells in vitro. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(3):209-15.
78. Hickey TE, Marrocco DL, Gilchrist RB, Norman RJ, Armstrong DT. Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. *Biol Reprod.* 2004;71(1):45-52.
79. Hickey TE1, Marrocco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod.* 2005;73(4):825-32.
80. Cárdenas H, Herrick JR, Pope WF. Increased ovulation rate in gilts treated with dihydrotestosterone. *Reproduction.* 2002;123:527-33.
81. Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao HT, Tsai MY, Chang C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:11209-14.
82. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptordeficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:224-9.
83. Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. Inhibin and premature ovarian failure. *Human Reproduction Update.* 2010;16:39-50.
84. Woodruff TK. The emergence of a new interdiscipline: oncofertility. *Cancer Treat Res.* 2007;138:3-11.
85. Shea LD, Woodruff TK, Lowe MP. Perspectives on oncofertility: preserving fertility for young cancer patients. *Endocrine News.* 2008;33:14-9.
86. West ER, Zelinski MB, Kondapalli LA, Gracia C, Chang J, Coutifaris C, Critser J, Stouffer RL, Shea LD, Woodruff TK. Preserving female fertility following cancer treatment: current options and future possibilities. *Ped Blood Cancer.* 2009;53(2):289-95.
87. Donnez J, Dolmans MM. Preservation of fertility in females with haematological malignancy. *Br J Haematol.* 2011;154(2):175-84.
88. Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Molecular Human Reproduction.* 2012;18:59-67.
89. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril.* 2013;99:1523-33.