

Cultivo *in vitro* de foliculos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras

In vitro culture of bovine preantral follicles: review, challenges, achievements and future perspectives

Camila Bizarro-Silva^{1,2}, Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal - REPROA¹, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, 86051-990, Cx. Postal: 10.011, Brasil

² Laboratório de Reprodução Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Toledo, PR, Brasil

Resumo

A reprodução animal incide diretamente na eficiência e rentabilidade econômica de um rebanho, sendo considerada um dos fatores de maior importância para os sistemas de produção. Consequentemente, o desenvolvimento e a utilização de biotecnologia são indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva, do melhoramento genético, da produção de alimentos e geração de riquezas. Nas últimas décadas várias foram as biotécnicas associadas à reprodução animal que apresentaram um grande potencial para a geração de genética, especialmente, ao que se referem aos avanços da reprodução assistida. Estes progressos possibilitaram a utilização de foliculos pré-antrais como fonte de oócitos para biotecnologias reprodutivas. Deste modo, a técnica de cultivo *in vitro* proporciona a retomada do desenvolvimento dos foliculos presente na reserva ovariana pela ativação *in vitro* forçada simulando a ocorrência de distúrbios na foliculogênese. Até então, apenas a espécie murina obteve descendentes vivos através dos foliculos primordiais cultivados *in vitro*. Infelizmente, não há relatos de sucesso em outras espécies, tornando o desenvolvimento de sistemas ideias de cultivo *in vitro* um desafio. Portanto, o objetivo desta revisão é descrever e discutir os principais avanços da situação atual da pesquisa com foliculos pré-antrais inclusos em foliculos ovarianos.

Palavras-chave: Foliculogênese, oócito, foliculos ovarianos, biotecnologia da reprodução.

Abstract

*Animal reproduction directly affects the efficiency and economic profitability of a herd, being considered one of the most important factors for production systems. Consequently, the development and use of biotechnology are indispensable for increasing reproductive efficiency, genetic improvement, food production and wealth generation. In the last few decades, biotechnologies associated with animal reproduction have shown great potential for the generation of genetics, especially with regard to advances in assisted reproduction. These advances have enabled the use of pre-antral follicles as a source of oocytes for reproductive biotechnologies. Thus, the *in vitro* culture technique provides the resumption of the development of follicles present in the ovarian reserve by forced *in vitro* activation, simulating the occurrence of disturbances in folliculogenesis. Until then, only the murine species obtained living descendants through primordial follicles cultivated *in vitro*. Unfortunately, there are no reports of success in other species, making the development of ideal *in vitro* culture systems a challenge. Therefore, the purpose of this review is to describe and discuss the main advances in the current research situation with preantral follicles included in ovarian follicles.*

Key-words: Folliculogenesis, oocyte, ovarian follicles, reproductive biotechnology.

Introdução

O termo reprodução assistida incorpora uma ampla gama de tecnologias que são usadas para aumentar a probabilidade de obter uma gestação após a coleta e o manuseio direto de oócitos, espermatozoides e/ou embriões resultantes da produção *in vitro*. A base destas biotécnicas reprodutivas são principalmente a fecundação *in vitro* e a transferência de embriões, no entanto outras biotécnicas podem ser inseridas neste contexto, tais como a clonagem, a transgenia animal e a manipulação de oócitos inclusos em foliculos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). Esta última apresenta como princípio o



isolamento, o desenvolvimento *in vitro* e/ou preservação de folículos ovarianos na fase pré-antral (Figueiredo et al., 2018). Até o momento, a espécie murina alcançou os resultados mais promissores com a utilização desta técnica ao obter nascimento de produtos vivos (O'Brien et al., 2003).

Apesar dos avanços conquistados e do acréscimo de pesquisas referentes à biotecnologia, a fisiologia ovariana ainda não está totalmente esclarecida (Leitão et al., 2014), o que a torna um assunto intensamente estudado pela sua importância na pesquisa fundamental, no incremento da produção zootécnica com fins comerciais e como modelo para diversas áreas da Medicina Humana. Neste contexto, a utilização da MOIFOPA, possibilitaria desvendar alguns paradigmas que envolvem o início da foliculogênese, os quais abrangem os folículos ovarianos localizados na fase de quiescência, ativação e crescimento inicial até a liberação de oócitos (Figueiredo et al., 2008; Figueiredo et al., 2018). Além da possibilidade de contribuir para os avanços na reprodução assistida de humanos, nos aspectos de preservação da fertilidade em pacientes destinadas ao tratamento de infertilidade ou enfermidades como o câncer (Figueiredo; Lima, 2017).

Assim, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais pode propiciar novas investigações quanto as diferentes substâncias associadas ao desenvolvimento folicular, além de permitir o aumento do potencial reprodutivo devido a diminuição da atresia folicular ocorrida *in vivo*. Do mesmo modo, o estabelecimento de um método para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais seria a chave para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do início da foliculogênese e no controle do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Figueiredo et al., 2018). Diante do exposto, torna-se essencial o desenvolvimento de um sistema eficiente de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos capaz de permitir o desenvolvimento e a maturação completa dos oócitos inclusos em folículos pré-antrais.

Esta revisão tem como objetivo descrever e discutir os principais avanços da situação atual da pesquisa com folículos pré-antrais inclusos em folículos ovarianos. Após uma breve revisão de literatura, apresentaremos perspectivas futuras do sistema de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

Morfologia ovariana em mamíferos

O ovário dos mamíferos exerce funções essenciais para o sistema reprodutivo de uma fêmea, sendo responsável por: 1) produção e secreção de hormônios, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento folicular, manutenção do trato reprodutivo, ciclo estral e outras funções hormonais (Hirshfield, 1991; Araújo et al., 2014) e; 2) produção, diferenciação e liberação de um oócito maduro para fecundação (Mcgee; Hsueh, 2000). O formato do ovário varia de acordo com a espécie animal e o estágio do ciclo estral. Nos ruminantes, especificamente nos bovinos, os ovários apresentam formato ovalado/elíptico com peso entre 10 a 20 g na idade adulta. O comprimento pode variar de 3,0 a 4,5 cm e a largura de 1,5 a 2,0 cm. Os ovários são constituídos por duas regiões, classificadas em córtex e medula ovariana, e está circunscrito por epitélio germinativo ou superficial que está apoiado sob uma membrana basal (Silva, 2004). A região cortical do ovário está localizada na porção mais externa representa a região funcional do ovário, nesta é encontrada diferentes tipos celulares, denominadas de células da granulosa, as quais se caracterizam em células do cúmulo ou murais, e, as células da teca se diferenciam em camada interna e externa (Erickson; Shimasaki, 2003). Além disso, esta região é composta por folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento ou em processo de atresia e por corpos lúteos (*corpus albicans* e corpos hemorrágicos), assim como, por tecidos conectivos (colágeno – do tipo I e III, fibras reticulares e fibroblasto) (Silva, 2004).

A região medular, na maioria das espécies, está localizada mais internamente e apresenta um arranjo irregular de tecido nervoso, vascular (sanguíneo e linfático), tecido fibroblástico e conjuntivo, o qual se comunica com o ovário através do hilo (Silva, 2004). Sua função consiste na sustentação e nutrição do ovário (Araújo et al., 2014). Consequentemente, durante a vida reprodutiva de uma fêmea a funcionalidade do ovário é influenciada pela interação exata entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos, que juntos, atuam no processo de desenvolvimento folicular e oocitário, conhecido como foliculogênese e oogênese, respectivamente (Monniaux et al., 1997; Atwood; Meethal, 2016).

Oogênese e Foliculogênese – Aspectos básicos do desenvolvimento folicular

A oogênese consiste na formação e modificação das células germinativas primordiais até

alcançarem o estágio de formação do oócito haploide (Fig. 1; Rüsse, 1983; Araújo et al., 2014). Este processo ocorre ainda durante a vida fetal juntamente com a foliculogênese e, apenas alguns dos oócitos presentes no *pool* de reserva (população folicular) conseguirão atingir o processo de desenvolvimento até a fecundação (Bessa; Dode, 2013). Sabe-se ainda, que as fêmeas nascem com um estoque de oócitos pré-estabelecido (Saumande, 1991). Sendo assim, durante a fase de embrião, as células germinativas primordiais, localizadas no saco vitelínico deslocam-se para as gônadas em desenvolvimento para se transformarem em oogônias, com remanejamento das organelas citoplasmáticas, proliferação celular acentuada e a perda das características de motilidade (Sadeu et al., 2006; Bessa; Dode, 2013). Após as múltiplas divisões mitóticas das células germinativas primordiais originam-se dois tipos diferentes de células. A primeira linhagem de células germinativas tem por início imediato sucessivas divisões mitóticas originando as células nomeadas de oogônias (Araújo et al., 2014). Enquanto que a segunda, permanece em interfase e darão origem às novas células germinativas que posteriormente se diferenciarão em oócitos (Hirshfield, 1991).

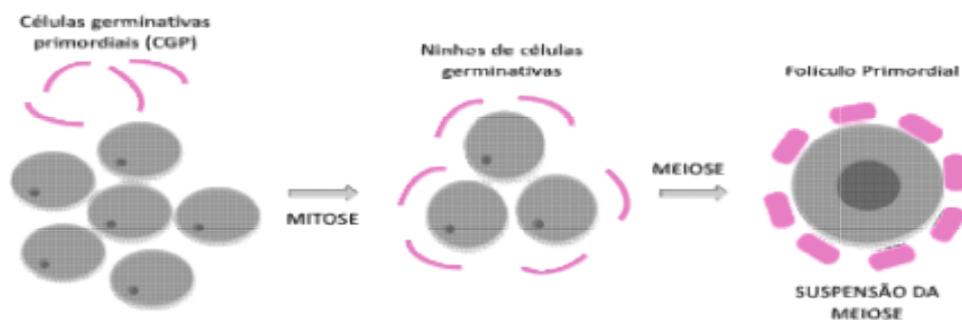


Figura 1. Representação esquemática da formação das células germinativas primordiais (CGP) e oogênese. Fonte: Adaptado de Sánchez, Smitz (2012).

Como continuação do processo de oogênese, as células que se encontram em estágio de primeira divisão meiótica apresentam a interrupção dessa divisão e a constituição de oócitos primários, que persistem neste estágio até a puberdade (Hirshfield, 1991). Ao iniciar a vida reprodutiva ocorrem estímulos que determinam o momento da ovulação, isso é possível pelo pico do hormônio luteinizante (LH) e declínio das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH), e neste momento, os oócitos retomam a meiose do estágio de prófase I. Posteriormente, acontece o rompimento da vesícula germinativa, na qual sucedem as seguintes etapas, metáfase I, anáfase I e telófase I, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e o desenvolvimento do oócito secundário (Betteridge et al., 1989).

Subsequentemente, inicia-se a segunda divisão meiótica, na qual o núcleo do oócito se desenvolve até atingir o estágio de metáfase II. Este é o momento da segunda interrupção da meiose. O oócito continua neste estágio até a chegada do espermatozoide para a fecundação. Caso haja a fecundação, o oócito prossegue a meiose (Betteridge et al., 1989) e finaliza a oogênese com a extrusão do segundo corpúsculo polar, culminando com a formação do oócito haploide fecundado.

Mesmo com os inúmeros estudos e o desenvolvimento de diversas técnicas reprodutivas, as informações existentes sobre o processo de foliculogênese, principalmente relacionados aos folículos pré-antrais, aos mecanismos de maturação e a atresia folicular ainda são pouco compreendidos (Silva-Santos et al., 2014). Assim como na oogênese, o início da foliculogênese na maioria das espécies também ocorre no decorrer da vida fetal, com a formação da reserva de folículos primordiais quiescentes, os quais são fisiologicamente estimulados a um crescimento sequencial e coordenados tanto pelo eixo hipotalâmico/hipofisário quanto pelos ovários (Monniaux et al., 1997). Este processo de crescimento é ajustado pela presença de hormônios esteroides modulados pela atividade das gonadotrofinas sintetizadas pelos próprios folículos presentes nos ovários, por fatores de crescimento e por outras substâncias ainda desconhecidas (Lima-Verde et al., 2011).

Logo, o processo da foliculogênese é definido como a formação, o desenvolvimento e a maturação folicular. Este, inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina no último estágio de desenvolvimento, com o folículo no ápice da maturação, também denominado como folículo dominante

ou pré-ovulatório (Rossetto et al., 2011; Rossetto et al., 2013). A formação dos folículos primordiais ocorre no momento em que os oócitos são individualizados pela separação dos cordões das células germinativas (Fig. 2; Bristol-Gould; Woodruff, 2006; Bessa; Dode, 2013).

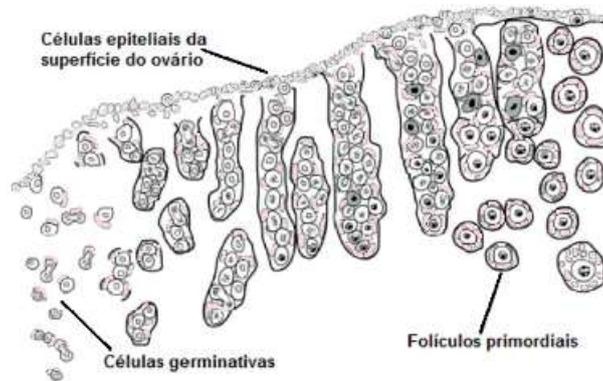


Figura 2. Esquema ilustrativo da origem dos folículos primordiais a partir das células germinativas presentes nos ovários

Fonte: Adaptado de Juengel et al. (2002)

Por padrão, os folículos primordiais quiescentes selecionados para se desenvolverem durante o processo de recrutamento inicial se tornam folículos primários. Esses folículos primários continuam a se desenvolver para se tornarem folículos secundários e então terciários com o surgimento de uma cavidade para posteriormente atingirem o ápice do desenvolvimento até folículo antral pré-ovulatório (Araújo et al., 2014).

Classificação e caracterização estrutural dos folículos ovarianos

O folículo é a unidade morfológica e funcional responsável por proporcionar um ambiente apropriado para manutenção e viabilidade, além do crescimento e maturação do oócito para o processo de ovulação (Lima; Santos, 2010; Rossetto et al., 2013). A população de folículos presente nos ovários é muito heterogênea (Saraiva et al., 2011). A composição do folículo ovariano consiste num oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais). Assim, os folículos podem ser classificados em relação aos aspectos morfológicos (formato, tamanho e o número de camadas das células da granulosa que envolve o oócito imaturo) e grau de evolução em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários e 2) folículos antrais ou cavitários (Figueiredo et al., 2007). Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados como primordiais, primários e secundários; e os folículos antrais compreendem os folículos terciários e pré-ovulatórios (Fig. 3; Hulshof et al., 1994; Lima-Verde et al., 2011).

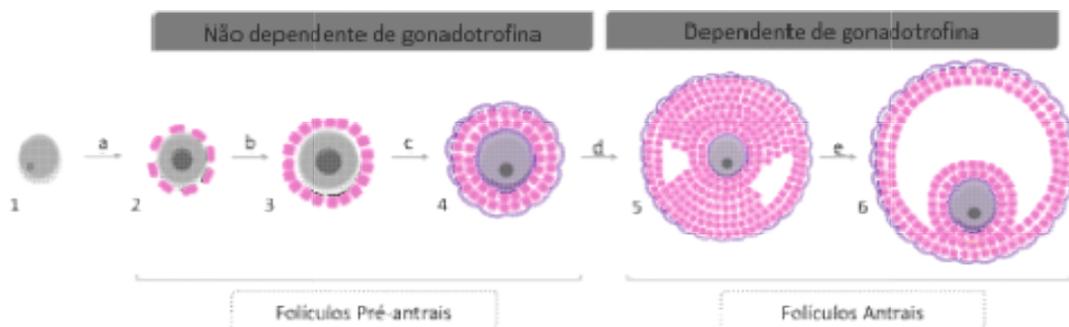


Figura 3. Representação do desenvolvimento dos folículos ovarianos de acordo com caracterização folicular. 1. Oogônias. 2. Folículo Primordial. 3. Folículo Primário. 4. Folículo Secundário. 5. Folículo Terciário. 6. Folículo Pré-ovulatório. a: Formação folicular. b: Ativação. c: Crescimento folicular. d: Crescimento folicular. e: Dominância folicular

Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2014).

Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, visto que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se multiplicam e se diferenciam (Bristol-Gould; Woodruff, 2006; Lima-Verde et al., 2011). Durante a fase fetal, alguns folículos primordiais são ativados, crescem e se diferenciam em outras categorias foliculares (pré-antrais e terciários), entretanto o estágio de folículo pré-ovulatório será atingido apenas por alguns folículos durante a vida pós-natal e sob o efeito de hormônios (Fortune, 1994; Monniaux et al., 1997).

Folículos Pré-antrais

O desenvolvimento folicular pré-antral precoce está relacionado ao aumento do volume e mudanças no formato das células da granulosa, enquanto, o estágio tardio ocorre o aumento do diâmetro oocitário, bem como, a proliferação das células da granulosa (Figueiredo et al., 1994). Ao final do crescimento desses folículos pré-antrais (folículo em estágio secundário) apresentam ao menos duas camadas de células da granulosa e células da teca ao redor da membrana basal (Fig. 4; Barnett et al., 2006). Ainda, os folículos secundários apresentam como característica o surgimento da zona pelúcida, formada por glicoproteínas que circundam o oócito (Rankin et al., 2001). Para estes estágios foliculares, as células da granulosa apresentam uma extensiva rede de junções do tipo gap, os quais são canais membranários que possibilitam a passagem de íons inorgânicos, nutrientes, pequenos metabólicos e os mensageiros para o interior das células (Kidder; Mhawi, 2002).

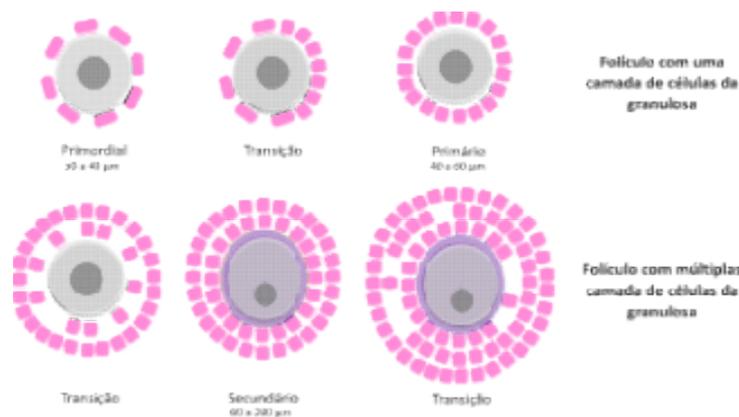


Figura 4. Alterações celulares em folículos ovarianos pré-antrais que ocorrem durante o desenvolvimento folicular
Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus et al. (2008).

Folículos Primordiais

Os folículos ovarianos primordiais representam o estágio inicial do desenvolvimento folicular localizados no *pool* de reserva. Durante esta fase alguns folículos serão ativados e iniciarão o processo de crescimento e diferenciação (Telfer et al., 2008). Cada folículo é composto por um oócito rodeado por uma camada de quatro a oito células da granulosa achatada (Hulshof et al., 1994; Fair et al., 1997a). Em bovinos, o diâmetro folicular no estágio primordial pode variar de 30 a 40 µm, com um oócito entre 20 a 25 µm (Beckers et al., 1996). Nesses folículos, o núcleo do oócito permanece numa posição central evidenciando o nucléolo. Já as organelas estão distribuídas uniformemente pelo citoplasma ou aproximadas ao núcleo. A organela mais evidente e predominantemente redonda é a mitocôndria, enquanto, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso são estruturas pouco desenvolvidas e distribuídas desuniformemente pelo citoplasma (Lucci et al., 2001).

Folículos Primários

A atividade proliferativa das células da granulosa dos folículos primários culmina na formação de uma camada de células cubóides ao redor do oócito. Desse modo os folículos primários apresentam



um oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa em formato cuboide, o diâmetro folicular pode variar de 40 a 70 μm . Os folículos primordiais e primários podem ser facilmente diferenciados pelas alterações morfológicas das células da granulosa (Hulshof et al., 1994). Assim, os folículos primários são caracterizados por um oócito esférico, mitocôndrias por todo o ooplasma com prevalência do formato arredondado, entretanto, algumas já se mostravam alongadas com cristas transversais. As gotas de lipídeos, complexos de Golgi e retículos endoplasmáticos são mais frequentes e se localizam mais próximos à membrana nuclear (Basso; Esper, 2002).

Folículos Secundários

Por sua vez, quando os folículos atingem o estágio de duas ou mais camadas das células da granulosa cuboidais, são então denominados de folículos secundários. Em bovinos, os folículos secundários apresentam diâmetro de 60 a 200 μm (Beckers et al., 1996). No decorrer do crescimento as fibras de tecido conectivo se posicionam paralelamente à membrana basal para formar a camada tecal. Nesses folículos o núcleo do oócito está disposto em uma posição excêntrica, diferente dos folículos primordiais posicionados na região central. Assim, o núcleo do oócito estará situado entre a zona pelúcida e o centro do oócito; as organelas também se deslocam para a periferia do folículo (Hyttel et al., 1997). A zona pelúcida é composta por pequenos microvilos e está localizada entre o oócito e as células da granulosa. Com o desenvolvimento folicular o espessamento da zona pelúcida torna-se visível (Lucci et al., 2001; Rossetto et al., 2011).

Folículos Antrais

Os folículos denominados antrais são caracterizados pela organização das células da granulosa em diversas camadas com a formação de uma cavidade repleta de fluido folicular, denominado de antro (Bessa; Dode, 2013). O líquido folicular que compõe esta cavidade possui água, proteínas séricas, eletrólitos e altas concentrações de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (Barnett et al., 2006). Dentro da categoria dos folículos antrais estão presentes os folículos terciários e pré-ovulatórios. Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, uma pequena cavidade antral e várias camadas de células da granulosa e tecais. São caracterizados pela presença de muitas microvilosidades dentro da zona pelúcida, bem como grande quantidade de mitocôndrias arredondadas e alongadas e partículas lipídicas (Fair et al., 1997b), enquanto, os folículos pré-ovulatório representam o estágio final do desenvolvimento folicular. Neste caso, há o predomínio de mitocôndrias arredondadas, além disso, é possível visualizar mitocôndrias encapuzadas, caracterizado como o crescimento completo do oócito em bovinos (Hyttel et al., 1997).

População Folicular

Estima-se que a população de folículos ovarianos seja variável entre as espécies. Na espécie bovina, a população folicular ao nascimento está em torno de 235.000 folículos por ovário (Erickson, 1966; Silva-Santos et al., 2011), enquanto que em caprinos e ovinos este número pode variar entre 37.646 (Lucci et al., 1999) e 160.000 (Driancourt et al., 1991) folículos, respectivamente. A população folicular dos ovários é composta por mais de 90% de folículos pré-antrais, e está localizada no córtex ovariano (Tassel; Kennedy, 1980). Os folículos presentes no *pool*, representam aqueles em quiescência, os quais estão diretamente relacionados com a renovação contínua dos folículos antrais no ovário durante os ciclos reprodutivos (Guibault et al., 1986). Ao deixarem a fase de quiescência, os folículos sofrem um processo sequencial de crescimento regulado pela presença de hormônios e fatores de crescimento. Ao iniciar o processo de foliculogênese o objetivo é a liberação de um oócito maduro, pronto para a fecundação (Rossetto et al., 2011). Assim, essa reserva representativa dos folículos existente nos ovários, conhecido como *pool* de folículos pré-antrais, pode significar um material genético destinado para a manipulação, preservação das espécies e até para o tratamento de infertilidade (Picton, 2001).

Além disso, a população de folículos antrais é altamente variável entre os indivíduos, todavia, mantém-se alta repetibilidade individual (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008). Tendo em vista essa variação, existem diferentes fatores que podem influenciar diretamente o número de folículos presentes

no ovário, como já mencionado a variação individual, encontra-se ainda, a genética (Erickson, 1966), a raça (*Bos indicus* - Nelore e *Bos taurus* - Aberdeen Angus; Silva-Santos et al., 2011; 2014), a idade (Rüsse, 1983), os níveis hormonais (Peters, 1976), o estado nutricional (Scaramuzzi et al., 1993; Szlachta; Tischner, 2008) e reprodutivo (Silva-Santos et al., 2014). Esta variação entre a população antral nos indivíduos adultos é altamente expressiva, e está relacionada positivamente com os índices de fertilidade e a função ovariana (Ireland et al., 2009).

Crescimento e Ativação Folicular

O crescimento folicular tem como início a ativação dos folículos primordiais pela passagem dos folículos encontrados no *pool* de reserva ou folículos quiescentes para o *pool* de crescimento (Rüsse, 1983). No momento em que o folículo deixar a reserva, crescerá até ovular ou sofrerá atresia folicular (Mayer et al., 2004; Lima-Verde et al., 2011). O primeiro sinal é marcado pela proliferação das células da granulosa (Fig. 5). Estas presentes nos folículos primordiais em crescimento gradualmente adquirem o formato cuboide, tornando-se folículos em estágio de transição, caracterizados assim pela presença de ambos os formatos das células da granulosa, achatadas e cuboide, e, subsequentemente, formando os folículos primários, com a presença de uma camada de células da granulosa cuboide em torno do oócito (Gougeon; Busso, 2000; Silva-Buttkus et al., 2008).

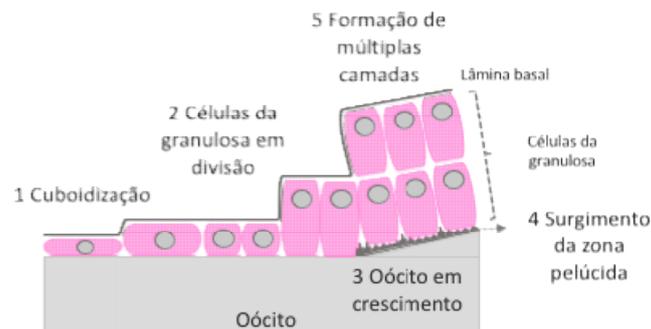


Figura 5. Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular
Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus et al. (2008)

As alterações que ocorrem durante o crescimento dos folículos consistem na mudança do formato das células da granulosa, além do aumento considerável do volume citoplasmático e nuclear do oócito (Hirshfield, 1991, Silva-Buttkus et al., 2008). Os mecanismos e fatores responsáveis pela ativação dos folículos no estágio primordial, bem como aqueles envolvidos na variação estrutural durante o início do crescimento folicular ainda são desconhecidos (Rajabi et al., 2018).

Atresia Folicular

Os folículos ovarianos que chegam ao estágio ovulatório são poucos, em consequência do processo de atresia. Estima-se que aproximadamente 99,9% dos folículos ovarianos sofrem degeneração ou apoptose durante o desenvolvimento, processo este denominado atresia folicular, em virtude disso, considera-se o ovário um órgão de baixa produtividade (Johnson, 2003). Assim como em outros aspectos fisiológicos, a atresia folicular pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como, idade, ciclo reprodutivo, lactação, gestação, hormônios, nutrição e isquemia. Durante a década de 80, a atresia foi postulada como um processo de morte celular programada caracterizada por apoptose (Tsafiri; Braw, 1984). Após alguns estudos, evidências demonstraram que a apoptose celular consiste no principal mecanismo bioquímico responsável pela atresia (Markström et al., 2002). A sua principal modificação ressaltada é a condensação da cromatina do núcleo (Silva-Buttkus et al., 2008). Muitas características morfológicas decorrentes da apoptose são observadas em oócitos e células da granulosa. Nos folículos pré-antrais, as primeiras alterações que indicam atresia acontecem no oócito, como a retração da



cromatina nuclear e a fragmentação oocitária (Morita; Tilly, 1999), ao mesmo tempo, as alterações das células da granulosa presentes nestes folículos são encontradas raramente. Entretanto, ao se desenvolver o oócito do folículo se encontra altamente resistente, no qual alterações indicativas de atresia são primeiramente observadas nas células da granulosa (Silva-Buttkus et al., 2008).

Com a evolução do processo degenerativo e/ou morte celular é possível utilizar as técnicas de histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão como métodos importantes para a identificação da qualidade folicular. Na análise da histológica, as alterações que indicam atresia dos folículos pré-antrais são evidenciadas primeiramente no oócito, através da picnose nuclear como primeiro sinal de degeneração (Wood et al., 1997). Em decorrência deste processo, é possível ainda identificar o oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e sinais de início da descondensação da cromatina, enquanto, em estágios mais avançados, o oócito apresenta o nucléolo e o citoplasma em fragmentação e condensação da cromatina elevada, ou ainda completamente fragmentado ou ausente (Butler, 1970; Wandji et al., 1996; Salomon et al., 2018). Nas características ultraestruturais, os oócitos inclusos em folículos primordiais degenerados têm um aumento progressivo de vacúolos citoplasmáticos e retração oocitária, eventos que antecedem as alterações nas células da granulosa. Além disso, as células da granulosa tornam-se túrgidas e diminuem o número de organelas do citoplasma (Tassel; Kennedy, 1980), já nos folículos antrais, as alterações são a picnose nuclear e a vacuolização citoplasmática que acontecem primeiramente nas células da granulosa (Hay et al., 1976) e posteriormente, ocorre o surgimento de degeneração nas células tecais (O'shea et al., 1978) e, por fim, no oócito (Hay et al., 1976).

Embora seja um fenômeno natural, independente da fase que ocorra, o processo de atresia encurta de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva da fêmea. A atresia ocorre por duas vias, a via degenerativa (Rodrigues et al., 2010) e/ou pela via apoptótica (Mcgee; Horne, 2000). Uma das principais causas da morte celular por degeneração é a isquemia (Farber, 1982). Isto ocorre pela diminuição da síntese de ATP que afeta o funcionamento da bomba Na^+/K^+ localizada na membrana celular. Em folículos este processo é dependente de uma regulação conjunta de diferentes fatores autócrinos, endócrinos e parácrinos. Ainda, pelo balanço entre os fatores que possibilitam a sobrevivência ou aqueles que induzem a apoptose o folículo ovariano será direcionado a um destes destinos, continuar o desenvolvimento ou sofrer atresia (Hsu; Hsueh, 2000). Em síntese, no início desse processo pode ser possível a ausência de sinais de degeneração nos oócitos e a viabilidade de algumas células da granulosa em folículos atrésicos, o qual possibilita a recuperação dos folículos e sugerem a retomada da ovulação (Hirshfield, 1991).

Biotechnologia utilizada no auxílio da compreensão e estudo da foliculogênese

Para uma expansão sólida de todo o universo tecnológico vinculado à reprodução, a base fundamental de toda a fisiologia feminina é a foliculogênese. Por esta razão, o interesse sobre o tema tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Andrade et al., 2012; Bizarro-Silva et al., 2018). Somando-se aos aspectos dinâmicos da aplicação de tais biotécnicas, o estudo da foliculogênese apresenta-se em momento extremamente importante, principalmente para as bases relacionadas a aplicação de técnicas destinada a reprodução assistida (Andrade et al., 2012; Vieira, 2012). Ao considerar que uma mínima parcela dos folículos ovarianos se desenvolve até o processo de ovulação, foi preestabelecida uma biotécnica de manipulação oocitária, conhecida como MOIFOPA, a qual pretende recuperar os oócitos inclusos nos folículos e os cultivá-los *in vitro* até sua maturação completa (Eppig; O'brien, 1996; Lima; Santos, 2010). Esta técnica, apresenta como base o isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários; a conservação para estocagem por curto (resfriamento) ou por longo período (congelamento); e o cultivo folicular com a finalidade de desenvolver o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em folículo pré-antrais (Figueiredo et al., 2007; Lima; Santos, 2010).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento, o cultivo de folículos ovarianos *in vitro* e a criopreservação do tecido ovariano destaca-se como uma biotécnica extremamente útil para esclarecer vários aspectos pouco compreendidos da gônada feminina. Apresentando-se como modelo experimental bastante eficiente, o estudo dos folículos pré-antrais pode ser a chave para a melhor compreensão dos muitos desafios atuais, quanto à ativação e o controle do desenvolvimento dos folículos ovarianos

(Anckaert et al., 2013; Telfer et al., 2019). Portanto, a aplicação da MOIFOPA para a produção *in vitro* proporcionaria a utilização em grande escala de oócitos maduros de animais com alto valor agregado, e ainda, aqueles em processo de extinção. Além disso, contribuiria para a padronização das biotécnicas como fertilização *in vitro*, transgenia e a clonagem através da utilização de oócitos obtidos por esta biotecnologia, que de outra forma fisiologicamente degenerariam (Lima; Santos, 2010; Ealy et al. 2019).

Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais – Bases Gerais

Vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos nas últimas duas décadas, e os resultados variam de acordo com o tipo de meio, método de cultivo e principalmente da espécie estudada (Fortune, 1994). Entretanto, até o momento, não foi possível identificar em ruminantes um sistema de cultivo de folículos ovarianos eficiente em promover o desenvolvimento completo dos folículos pré-antrais. Os sistemas de cultivo rotineiramente adotados (Fig. 6) são o cultivo de folículos pré-antrais inclusos no próprio tecido ovariano (cultivo *in vitro in situ*) ou na forma isolada (cultivo *in vitro* isolado; Hartshorne, 1997). Além disso, esses dois tipos de cultivo podem ser combinados, realizando primeiramente os procedimentos do cultivo *in situ*, para obtenção de um maior número de folículos pré-antrais em desenvolvimento, e posteriormente, os folículos seriam isolados e cultivados *in vitro* até a completa maturação (Telfer et al., 2008; Araújo et al., 2014).

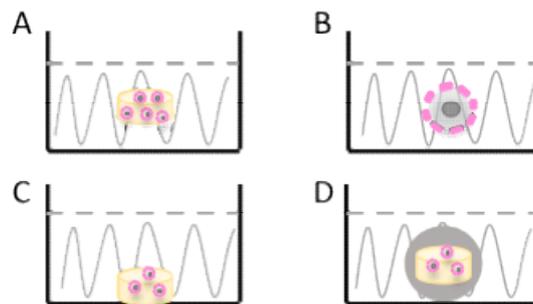


Figura 6. Representação esquemática dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. (A) Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais envolvidos em tecido ovariano (*in situ*). (B) Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados. (C) Cultivo *in vitro* no sistema Bidimensional. (D) Cultivo *in vitro* no sistema Tridimensional.

Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2014).

Sistemas de cultivo *in situ* (fragmentos do córtex ovariano) apresentam a vantagem de manter o contato celular possibilitando a interação intercelular entre folículos e células adjacentes (células estromais/tecas e células da granulosa), que podem influenciar favoravelmente seu crescimento. Também, proporcionam a integridade tridimensional dos folículos por evitar a exposição prolongada das células ao ambiente externo (Abir et al., 2006; Green; Shikanov, 2016). Além de ser um método fácil para cultivar os folículos, o sistema *in situ* parece facilitar a ativação espontânea de folículos primordiais além de permitir o cultivo de um grande número de folículos pré-antrais (Braw-Tal; Yossefi, 1997; Araújo et al., 2014). Em contrapartida, o sistema de cultivo isolado necessita de métodos para isolar os folículos presentes no córtex ovariano. Os métodos desenvolvidos para o isolamento dos folículos são mecânico e/ou enzimático (Figueiredo et al., 2018). Embora os folículos pré-antrais nos estágios primordiais e primários possam ser facilmente isolados em ovários bovinos usando métodos mecânicos ou enzimáticos, na maioria das vezes folículos secundários pequenos (diâmetro $\leq 150 \mu\text{m}$) e grandes (diâmetro $> 150 \mu\text{m}$) apresentam predileção para sistema de cultivo *in vitro* isolado por serem capazes de retomar a meiose e amadurecimento dos oócitos (Rossetto et al., 2013). Após o isolamento, os folículos podem ser cultivados, na sua forma intacta, para estudos sob a interferência *in vitro* de fatores de crescimento e hormônios, sendo possível o monitoramento individual durante interação com as células foliculares e a avaliação do desenvolvimento (Silva, 2005; Figueiredo et al., 2007). De acordo com registros, o primeiro estudo de folículos pré-antrais isolados ocorreu em 1964 em animais de laboratório (camundongo), enquanto Figueiredo et al. (1993) utilizaram a técnica de isolamento em bovinos em 1990. Os estudos



empregaram metodologias enzimáticas e mecânicas na década de 60 e 90, respectivamente. Existem diversos estudos recentes realizados com finalidade de originar *in vitro* o crescimento de folículos pré-antrais *in situ* ou isolado em diferentes espécies (ratas: Sadr et al., 2015; felinos: Vilela et al., 2016; ovinos: Lins et al., 2017; suínos: Nunes et al., 2018; bovinos: Bizarro-Silva et al., 2018; caprinos: Ferreira et al., 2018; equinos: Max et al., 2018 e humanos: Roy; Albee, 2000).

Adicionalmente, os folículos pré-antrais podem ser cultivados em um método bidimensional (2D) ou tridimensional (3D; Fig. 6). No primeiro, os folículos são colocados diretamente sob a placa de cultivo ou uma monocamada de células somáticas (Hirao, 2012), enquanto que o segundo consiste no sistema em que os folículos são totalmente inclusos em uma matriz extracelular (colágeno ou ágar) ou em insertos (Millicell) que permitem que as células cultivadas possam acessar o meio tridimensionalmente. O crescimento, estrutura e função celular imitam mais de perto o que ocorre *in vivo*, sendo capaz de manter a arquitetura original do folículo ovariano (Figueiredo et al., 2018). Assim, com o intuito de incrementar os sistemas de cultivo propôs-se a utilização de um sistema de cultivo bidimensional com uma monocamada de gel de ágar (suporte; Sato et al., 2011) como estrutura física semelhante ao ovário. Este sistema de cultivo em monocamada é capaz de diminuir as perdas durante as manipulações e a integridade folicular é mantida (Costa et al., 2001) tendo assim um diferencial quando comparado ao sistema de cultivo *in vitro* tradicional e tridimensional, sem o uso da monocamada de gel de ágar.

O desenvolvimento de condições *in vitro* para promover o desempenho folicular pode ser essencial para diminuir a atresia folicular geralmente ocorrida *in vivo* (Alves et al., 2013; Araújo et al., 2014). Com isso, as condições ideais para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais está diretamente relacionada a composição do meio (Andrade et al., 2012) e influências externas. É conhecido que os folículos podem ser influenciados em potencial pelos fatores de crescimento produzidos pelas células do estroma e por outros folículos, antioxidantes e hormônios (Fortune, 1994). O meio essencial mínimo (MEM) é um meio de cultura utilizado tanto para o cultivo de tecido ovariano bovino quanto de folículos pré-antrais isolados (Silva et al., 2004; Matos et al., 2007; Rossetto et al., 2013). Em um estudo pioneiro utilizando folículos ovarianos pré-antrais utilizou-se um meio de cultivo base, chamado de controle, MEM com a adição de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM), hipoxantina, suplementado com antibióticos, tais como penicilina - 20 UI/mL e estreptomicina - 200 µg/mL e ITS (insulina - 6,25 µg/mL, transferrina - 6,25 ng/mL e selênio - 6,25 ng/mL), significativamente aumentou a porcentagem de folículos morfológicamente normais de 29,4% (meio controle - MEM⁺) para 78,0% (meio tratado; Figueiredo et al., 1994). Logo, a composição do meio de cultivo com a ausência de hipoxantina e outros substratos energéticos, como glutamina e piruvato, mostraram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais de bovinos foi reduzida (Figueiredo et al., 1994). Wandji et al. (1996) evidenciaram altas taxas (94%) de sobrevivência e início do crescimento *in vitro* de folículos primordiais bovinos em meio de cultivo sem adição de soro fetal bovino e utilização de fragmentos do córtex ovariano de fetos. Em virtude dos sistemas de cultivo *in vitro* as influências externas devem ser consideradas, tais como, a grande exposição folicular a radicais livres ocasionando estresse oxidativo em consequência à exposição à luz, às elevadas concentrações de oxigênio e às concentrações variáveis de substratos metabólicos. A utilização de um meio acrescido com antioxidante pode ser a chave para proteger os folículos do estresse oxidativo durante a ativação e o desenvolvimento *in vitro* (Rodrigues et al., 2010).

Assim, várias investigações no âmbito MOIFOPA contribuíram para o cultivo *in vitro* mostrando que durante o controle do desenvolvimento folicular os hormônios, fatores de crescimento e peptídeos estão envolvidos (Rodrigues et al., 2010; Sánchez; Smitz, 2012). Além disso, os meios de cultivo geralmente tendem a minimizar a atresia folicular, através de diversas substâncias, como: fonte de proteína; antibióticos; antimicóticos; insulina, transferrina e selênio (ITS); piruvato, glutamina e ocasionalmente um ou mais fatores de crescimento. Entre esses podem-se destacar: o hormônio de crescimento (GH), o fator de crescimento epidermal (EGF), o hormônio folículo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), o kit ligand (KL), as proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), o fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), hormônio estimulante da tireoide (TSH), a ativina-A e peptídeo intestinal vasoativo (VIP), os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2) e tiroxina e/ou esteroides, tal como o estradiol, testosterona ou androstenediona (Figueiredo et al., 2007; Rodrigues et al., 2010; Andrade et al., 2012; Leitão et al., 2014; Fernandez et al., 2016; Figueiredo et al., 2017).



Vários componentes endócrinos, autócrinos e parácrinos podem estimular a inervação ou a neovascularização dos pequenos folículos, o que possibilita a chegada de nutrientes, citocinas, hormônios e outras substâncias *in vivo* (Monniaux et al., 1997; Fortune; Yang; Muruvi, 2011). Ao que tudo indica, a presença destas substâncias é necessária para o crescimento e sobrevivência folicular. Entretanto, os fatores que atuam no desenvolvimento de FOPA em ruminantes ainda são incompreendidos em sua totalidade (Figueiredo et al., 2007; Araújo et al., 2014). Buscando identificar os fatores que controlam a foliculogênese, assim como, promovem o crescimento e a maturação oocitária junto à multiplicação e diferenciação das células da granulosa têm se desenvolvido diferentes técnicas de cultivo. Devido a pequena dimensão de ovários de camundongos foi possível o cultivo do órgão na íntegra, o que serviu para o estudo inicial da foliculogênese em pequenos mamíferos (Fortune, 1994; Figueiredo et al., 2007). O sucesso da ativação de folículos primordiais *in vitro* permitiu a utilização deste modelo por diversos grupos de pesquisadores. Entretanto, em animais de médio e grande porte, não é possível a utilização desta técnica em consequência ao dimensionamento dos ovários, sendo necessário utilizar fragmentos do tecido ovariano (Figueiredo et al., 2007; Leitão et al., 2014). Assim, a técnica de cultivo que utiliza pequenos fragmentos do córtex ovariano, ricos em folículos primordiais, tem sido estratégia para o estudo do crescimento e ativação dos folículos primários em bovinos (Braw-Tal; Yossefi, 1997; Figueiredo et al., 2007).

Importância do Cultivo in vitro sobre a Fertilidade – Desafios, Conquistas e Aplicações potenciais

O cultivo *in vitro* de tecido ovariano não é uma técnica amplamente utilizada na prática clínica devido aos métodos de desenvolvimento folicular estarem longe de serem perfeitos. Surpreendentemente, a produção de descendentes vivos de folículos primordiais cultivados *in vitro* foi alcançada com sucesso em camundongos e relatada em 1989 e posteriormente em 1993 (Eppig e Schroeder, 1989 e Carroll e Gosden, 1993, respectivamente). Até o momento não se tem mais indícios de nascimentos de animais a partir de folículos desenvolvidos e fecundados *in vitro*. Em ruminantes, os resultados têm sido limitantes devido ao baixo número de oócitos maduros e embriões *in vitro* após o cultivo (Silva et al., 2016). Embora seja uma técnica muito promissora, ainda não existe uma padronização entre os protocolos existentes para a obtenção efetiva de oócitos capazes de serem fertilizados *in vitro*. Os ovários apresentam um grande número de folículos primordiais na região cortical, sendo assim, são obtidos fragmentos de tecido ovariano por dissecação do córtex e subsequente cultivados *in vitro*. Esta abordagem permite apoiar o crescimento de um maior número de folículos primordiais (Telfer et al., 2008).

Atualmente, os estudos sobre a técnica de cultivo são dedicados à sobrevivência folicular e reconstrução da estrutura córtico-medular ovariana. Durante a foliculogênese, os folículos em crescimento *in vivo* migram do córtex ovariano, mais rígido e próximo da superfície, para a medula ovariana (Xu et al., 2013). Logo, no decorrer deste processo ocorre a redução do estresse mecânico das células foliculares, por estarem localizadas em um ambiente mais interno. Deste modo, a reconstrução da estrutura ovariana cortico-medular *in vitro* pode ser realizada usando matrizes extracelulares combinadas; por exemplo, um hidrogel de alginato de fibrina (Shikanov et al., 2009, 2011; Jin et al., 2010) ou gel de agarose.

Como já mencionado, alguns fatores limitam a eficiência da produção *in vitro* a partir de folículos pré-antrais. Assim, o desenvolvimento de um modelo viável para investigação da foliculogênese resultaria em grande aporte de subsídios para a prospecção científica das biotécnicas reprodutivas nas ciências biomédicas. Na reprodução humana muitas mulheres sofrem de doenças que interferem direta ou indiretamente sobre a fertilidade. Todavia, a preservação da fertilidade feminina é um dos problemas mais comuns abordados pelas tecnologias de reprodução assistida. Doenças cujo tratamento envolvem métodos agressivos de terapia ou citotóxicos, tais como radioterapia e quimioterapia influenciam negativamente a saúde dos gametas e seus progenitores (Filatov et al., 2016). Neste contexto, mulheres com falha ovariana prematura, por exemplo, em que se utilizam a criopreservação aliada ao cultivo eficiente representaria um modelo para estudos e testes de possíveis aplicações a determinadas enfermidades. Da mesma forma, métodos de transplantes e auto-transplantes de ovário poderiam ser desenvolvidos a partir desta técnica. Com isso, testes de efeitos de fármacos nos oócitos humanos, como quimioterápicos, também poderiam ser efetuados de forma simples e segura (Rodrigues et al., 2014 e Yang et al., 2020).

Por isso, a otimização dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos possibilitaria ainda grandes avanços nas áreas de manipulação de folículos e criopreservação de fragmentos e folículos ovarianos,



contribuindo imensamente para tratamentos de infertilidade humana, principalmente por não requer um tratamento hormonal (Yang et al., 2020). Para tanto, há diversos aspectos favoráveis quanto ao uso de ovários da espécie bovina, por exemplo, a disponibilidade com relativa facilidade na maioria dos países e com custo baixo ou nulo. Além disso, a investigação científica nesta espécie possui poucas ou nenhuma restrição ética, uma vez que os ovários são considerados um sub-produto para descarte após o abate das fêmeas. No presente momento, ainda não se vislumbra uma aplicação imediata da MOIFOPA para incremento da fertilidade feminina na espécie bovina. Mas certamente a técnica permite uma importante estratégia para uma melhor compreensão da atividade folicular ovariana, além de servir como excelente modelo experimental para a espécie humana e também de animais selvagens e/ou ameaçados de extinção.

Realmente, a preservação da fertilidade pode oferecer melhores perspectivas para concepção futura em casos cujo potencial reprodutivo está ameaçado. Nestas circunstâncias a criopreservação e o armazenamento de gametas ou embriões em baixas temperaturas são potencialmente levados em consideração. Os avanços na tecnologia, em particular a aplicação da vitrificação e o transplante do tecido ovariano, melhoraram significativamente os resultados da criopreservação de oócitos maduros. Nos casos em que a criopreservação de oócitos maduros não é viável, o córtex ovariano contendo folículos primordiais pode ser criopreservado. Até o momento, mais de 100 nascimentos foram relatados após o enxerto de tecido ovariano armazenado. Sendo assim, a criopreservação do tecido ovariano é agora uma abordagem estabelecida para preservar a fertilidade futura de mulheres jovens (Gook; Edgar, 2018).

No entanto, a preservação da fertilidade engloba uma série de abordagens clínicas e tecnologias de laboratório, muitas das quais ainda são consideradas experimentais. Ou seja, para uma maior chance de preservar a fertilidade de pacientes com câncer, seriam necessárias a estimulação ovariana (superovulação), a coleta de oócitos supranumerários e a fertilização *in vitro* (FIV) para obtenção de embriões viáveis ou ainda procedimentos para o desenvolvimento de folículos precoces. O tecido ovariano está sendo cada vez mais coletado de pacientes com câncer e criopreservado para preservação da fertilidade (Wang et al., 2016). Uma opção alternativa de preservação da fertilidade para o transplante autólogo de tecido ovariano é cultivar e amadurecer oócitos *in vitro*. Embora oócitos imaturos possam ser recuperados de folículos antrais e maturados *in vitro* (MIV), tem sido proposto que uma abordagem alternativa para obter uma população homogênea de oócitos de boa qualidade, a qual consistiria em sistemas de cultivo *in vitro* que suportam ativação de folículos primordiais em tecidos corticais, isolamento e cultivo de folículos pré-antrais, seguida de coleta de oócitos, MIV e FIV (Telfer; Zelinski, 2013).

Tendo em vista os aspectos anteriormente mencionados, estas biotécnicas apresentam uma alta significância tanto para pesquisa básica e fundamental como para a reprodução animal e humana. A contribuição para a pesquisa consiste na elucidação dos mecanismos presentes na fase pré-antral da foliculogênese. Os folículos ovarianos pré-antrais isolados do ambiente natural, com interferências endócrinas, nutricionais e sanitárias semelhante ao organismo, com a presença de substâncias conhecidas (matriz extracelular, hormônios, fatores de crescimento, aminoácidos, carboidratos, etc.) poderão ser utilizados para cultivos *in vitro*. Nesses casos, a aplicação de tecnologias de criopreservação de tecido ovariano ou a técnica de cultivo *in vitro* de tecido ovariano parece ser uma ótima estratégia para a preservação da foliculogênese e fertilidade feminina.

Considerações Finais

Podemos enfatizar a importância da utilização do cultivo *in vitro* como modelo de estudo da reserva folicular, pois esta técnica colabora para uma melhor compreensão dos processos *in vivo* que desencadeiam a ativação em massa dos folículos pré-antrais. O desenvolvimento folicular *in vitro* está em constante evidência, tendo em vista os diversos avanços estabelecidos para a eficiência desta biotécnica. Entretanto, alguns desafios ainda devem ser levados em consideração no momento da escolha do protocolo, principalmente ao que diz respeito ao meio de cultura, ao sistema de cultivo (*in situ* ou isolado), ao método de cultivo (2D ou 3D), ao componente da matriz extracelular, ao tempo de cultivo, e, também a origem e categoria folicular. Lembrando que para a espécie bovina, é necessário buscar melhorias adicionais a técnica para incrementar os resultados. Conforme o texto aqui apresentado, torna-se evidente a abrangência ampla deste recurso tecnológico para a Reprodução Assistida, tanto na



Medicina Veterinária quanto Medicina Humana. Para os próximos anos, espera-se um destacado progresso nesta área do conhecimento da Biotecnologia da Reprodução Animal com a obtenção de indivíduos desenvolvidos totalmente *in vitro*.

Referências

- Abir R, Nitke S, Bem-Haroush A Fisch B.** In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol*, v.26, p.887–898, 2006.
- Alves AM, Chaves RN, Rocha RM, Lima LF, Andrade PM, Lopes CA, Souza CE, Moura AA, Campello CC, Bão SN, Smitz J, Figueiredo JR.** Dynamic medium containing growth differentiation factor-9 and FSH maintains survival and promotes in vitro growth of caprine preantral follicles after long-term in vitro culture. *Reprod Fert Develop*, v.25, n.6, p.955–965, 2013.
- Amorim CA, David A, Langendonck AV, Dolmans MM, Donnez J.** Vitriification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fert Steril*, v.95, n.3, p.1094–1097, 2011.
- Anckaert E, De Rycke M, Smitz J.** Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Hum Reprod Update*, v.19, p.52–66, 2013.
- Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, Bracarense APFRL, Figueiredo JR.** Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p.1104–1113, 2012.
- Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL.** In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, v.12, n.78, p.1–14, 2014.
- Atwood CS, Meethal SV.** The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Mol Cell Endocrinol*, v.430, p.33–48, 2016.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod*, v.13, p.1–19, 2006.
- Barros LF, Hermosilla T, Castro J.** Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol*, v.130, p.401–409, 2001.
- Basso AC, Esper CR.** Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.39, p.311–331, 2002.
- Beckers JF, Drion P, Figueiredo JR, Goddin L, Pirottin D, Ectors F.** The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and in vitro culture. *Reprod Domest Anim*, v.31, p.543–548, 1996.
- Bessa Ir, Dode Man.** Ovogênese e modificações epigenéticas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.37, n.3, p.241–248, 2013.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA.** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J Reprod Fertil*, v.38, p.87–98, 1989.
- Bizarro-Silva C, Santos MM, Gerez JR, González SM, Lisboa LA, Seneda MM.** Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured in vitro. *Zygote*, v.26, p. 417-423, 2018.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reprod Fertil Develop*, v.109, p.165–171, 1997.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p. 5–13, 2006.
- Brito DC, Brito AB, Scalercio SR, Percário S, Miranda MS, Rocha RM, Diniz JA, Oskam IC, Van Den Hurk R, Paris MC, Domingues SF, Santos RR.** Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen- thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Res*, v.355, n.2, p.471–480, 2014.
- Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ.** Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod*, v.73, p.53–62, 2005.
- Butler HW.** Ultrastructural studies on mitochondrial swelling. *Biochem J*, v.118, ed. 5, p. 883–886, 1970.
- Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Intracellular cryoprotectant agents: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Acta*



- Scientiae Veterinariae, Acta Sci Vet, v.39, n.2, p.957, 2011.
- Celestino JJH, Santos RR, Matos MHT, Costa SHF, Silva JRV, Martins FS, Rodrigues APR, Figueiredo JR.** Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM 199. Arq Bras Med Vet Zoo, v.59, p.591–599, 2007.
- Costa LFS, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Carámbula SF, Neves JP, Montagner MM.** Desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos *in vitro* em monocamada de células ovarianas. Rev Cen Cienc Rurais, v.31, p.323–27, 2001.
- Driancourt MA, Webb R, Fry RC.** Does follicular dominance occur in ewe? Reprod Fertil Develop, v.93, p.63–70, 1991.
- Ealy AD, Wooldridge LK, McCoski SR.** Board invited review: post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. J Anim Sci, v.97, p.2555–2568, 2019.
- Edgar DH, Gook DA.** A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification). of human oocytes and embryos. Hum Reprod Update, v.18, p.536–554, 2012.
- Eppig JJ, O'Brien MJ.** Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. Biol Reprod, v.54, p.197–207, 1996.
- Eppig JJ, Schroeder AC.** Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. Biol Reprod, v.41, p.268–276, 1989.
- Erickson BH.** Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J Anim Sci, v.25, p.800–805, 1966.
- Erickson GF, Shimasaki S.** The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. Reprod Biol Endocrinol, v.5, p.1–9, 2003.
- Eroglu A, Toner M, Toth TL.** Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. Fertil Steril, v.77, n.1, p.152–158, 2002.
- Fahy G, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT.** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology, v.3, p.247–268, 1990.
- Fair T, Hulshof CJ, Hyttel P, Greve T.** Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. Anat Embryol, v.195, p.327–336, 1997a.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland, M** Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. Mol Reprod Dev, v.46, p.817–832, 1997b.
- Farber JL.** Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. Lab Invest, v.47, p.114–123, 1982.
- Fernandez T, Palomino J, Parraguez VH, Peralta OA, De Los Reyes M.** Differential expression of GDF-9 and BMP-15 during follicular development in canine ovaries evaluated by Flow Cytometry. Anim Reprod Sci, v.167, p.59–67, 2016.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Faustino LR, Rodrigues APR.** *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. Small Ruminant Res, v. 98, 192–195, 2011.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV.** Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. Rev Bras Reprod Anim, v.31, p.143–152, 2007.
- Figueiredo JR, Hulshof SC, Van Den Hurk R, Nusgens B, Bevers MM, Ectors FJ, Beckers JF.** Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. Theriogenology, v.41, p.1333–1346, 1994.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van Den Hurk R, Ectors FJ, Fontes RS, Nusgens B, Bevers MM, Beckers JF.** Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. Theriogenology, v.40, p.789–799, 1993.
- Figueiredo JR, Lima LF.** Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. Rev Bras Reprod Anim, v.41, n.1, p.248–253, 2017.
- Figueiredo JR, Lima LF, Silva JRV, Santos RR.** Control of growth and development of preantral follicle: insights from *in vitro* culture. Anim Reprod, v.15, p. 648–659, 2018.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.** Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. ed. 2. São Paulo: Roca, 2008, p.303–327.
- Filatov MA, Khranova YV, Kiseleva MV, Malinova IV, Komarova EV, Semenova ML.** Female



- fertility preservation strategies: cryopreservation and ovarian tissue *in vitro* culture, current state of the art and future perspectives. *Zygote*, v.24, n.5, p.1–19, 2016.
- Fortune JE.** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, v.50, p.225–232, 1994.
- Fortune JE, Yang MY, Muruvi W.** *In vitro* and *in vivo* regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reprod Fert Develop*, v.23, p.15–22, 2011.
- Gougeon A, Busso D.** Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.33–41, 2000.
- Green LJ, Shikanov A.** *In vitro* culture methods of preantral follicles. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.229–238, 2016.
- Guibault LA, Dufourt JJ, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK.** Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *Reprod Fert Develop*, v.73, p.127–135, 1986.
- Hartshorne GM.** *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod*, v.2, p.94–104, 1997.
- Hay MF, Cran DG, Moor RM.** Structural Changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res*, v.169, p.515–529, 1976.
- Hirao Y.** Isolation of ovarian components essential for growth and development of mammalian oocytes *in vitro*. *J Reprod Develop*, v.58, p.167–74, 2012.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v.124, p.43–101, 1991.
- Hsu SY, Hsueh AJ.** Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev*, v.80, p.593–614, 2000.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Bekers, JF, Bevers MM, Van Den Hurk R.** Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quart*, v.2, n.16, p.78–80, 1994.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23–32, 1997.
- Ireland JJ, Zielak AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettegowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO.** Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod*, v.80, p. 954–964, 2009.
- Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ.** Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod*, v.79, p.1219–1225, 2008.
- Jin SY, Lei L, Shikanov A, Shea LD, Woodruff TK.** A novel two-step strategy for *in vitro* culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil Steril*, v.93, p.2633–2639, 2010.
- Johnson AL.** Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.185–201, 2003.
- Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP.** Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod*, v.676, p.1777–1789, 2002.
- Kidder GM, Mhawi AA.** Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, v.123, p.613, 2002.
- Leitão CCF, Costa JJN, Brito IR, Magalhães-Padilha DM, Almeida AP, Figueiredo JR, Van Den Hurk R, Silva JRV.** Effects of GDF-9 and FSH on mRNA Expression for FSH-R, GDF-9 and BMPs in *in vitro* cultured goat preantral follicles. *Braz Arch Biol Techn*, v.57, ed.2, p.200–208, 2014.
- Lima-Verde IB, Rossetto R, Figueiredo JR.** Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, ed.4, p.472–482, 2011.
- Lima GL, Santos EAA.** Aplicação das técnicas de MOIFOPA, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. *Acta Vet Bras*, 4 Supl, p.S36–S42, 2010.
- Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Bão SN, Silva JRV, Gonçalves PBD.** Study of preantral follicle population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.223–236, 1999.
- Lucci CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo R, Bão N.** Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Res*, v.41, p.61–69, 2001.
- Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v.123, p.23–30, 2002.
- Matos MHT, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR.** Técnicas para avaliação da qualidade de



- folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. Rev Bras Reprod Anim, v.31, ed.4, p.433–442, 2007.
- Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB.** The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. Biol Reprod, v.71, p.130–138, 2004.
- Mcgee EA, Hsueh AJ.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev, v.21, ed.2, p.200–214, 2000.
- Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clément F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC.** Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. J Reprod Fertil, v.51, p.3–23, 1997.
- Morita Y, Tilly JL.** Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. Dev Biol, v.213, p.1–17, 1999.
- Neves JP, Miranda KL, Tortorella RD.** Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. Rev Bras Zoot, v.39, p.414–421, 2010.
- Nunes RL, Lima LF, Rocha RMP, Oliveira L, Campello CC, Figueiredo, JR.** Utilização do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais suínos inclusos em tecido ovariano (*in situ*) como modelo de avaliação da eficiência de medicamentos homeopáticos na foliculogênese inicial. Cien Anim Bras. v.19, p.1–8, 2018.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. Biol Reprod, v.68, p.1682–1686, 2003.
- O'shea JD, Hay MF, Cran DG.** Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. Reprod Fert Develop, v.54, p.183–187, 1978.
- Peters H.** The development and maturation of the ovary. Ann Biol Anim Bioch, v.16, n.3, p.271–278, 1976.
- Picton HM.** Activation of follicle development: The primordial follicle. Theriogenology, v.55, p.1193–1210, 2001.
- Rajabi Z, Khokhar Z, Yazdekhesti H.** The growth of preantral follicles and the impact of different supplementations and circumstances: A review study with focus on bovine and human preantral follicles. Cell Reprogram, v.20, p.1–14, 2018.
- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J.** Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. Development, v.128, p.1119–1126, 2001.
- Rodrigues APR, Castro SV, Lunardi FO, Figueiredo JR.** Advances in ovarian tissue cryopreservation in goats and sheep. Act Vet Bras, v.8, Supl. 2, p.284–291, 2014.
- Rodrigues GQ, Silva CMG, Faustino LR, Bruno JB, Pinto LC, Lopes CAP, Campello CC, Figueiredo JR.** Efeito de diferentes concentrações de hormônio foliculo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. Act Vet Bras, v.4, ed.3, p.144–152, 2010.
- Rossetto R, Lima IMT, Saraiva MVA, Lima-Verde ETS, Figueiredo JR.** Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. Act Vet Bras, v.5, ed.1, p.15–23, 2011.
- Rossetto R, Santos RR, Silva GM, Duarte ABG, Silva CMG, Campello CC, Figueiredo JR.** Comparative study on the *in vitro* development of caprine and bovine preantral follicles. Small Ruminant Res, v.113, p.167–170, 2013.
- Roy SK, Albee L.** Requirement for follicle-stimulating hormone action in the formation of primordial follicles during perinatal ovarian development in the hamster. Endocrinology, v.141, p.4449–4456, 2000.
- Rüsse I.** Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat, v.24, p.77–92, 1983.
- Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kastertein E, Smitz J.** Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. Fertil Steril, v.85, ed.1, p.1130–1141, 2006.
- Sadr SZ, Ebrahimi B, Shahhoseini M, Fatehi R, Favaedi R.** Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. Eur J Obstet Gyn R B, v.194, p.206–211, 2015.
- Salomon AK, Leon K, Campbell MM, Young KA.** Folliculogenic factors in photoregressed ovaries: Differences in mRNA expression in early compared to late follicle development. Gen Comp Endocr, v.260 p.90–99, 2018.
- Sánchez F, Smitz J.** Molecular control of oogenesis. Biochim Biophys Acta, v.1822, p.1896–1912, 2012.
- Saraiva MVA, Celestino JJH, Araújo VR, Chaves RN, Almeida AP, Lima-Verde IB, Duarte ABG, Silva GM, Martins FS, Bruno JB, Matos MHT, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR.** 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, v.19, n.3, p.205–14, 2011.
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T.** *In vitro*



- production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, v.471, n.7339, p.504–507, 2011.
- Saumande J.** La folliculogénese chez les ruminants. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v.167, n.3-4, 205–218, 1991.
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS.** A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.459-478, 1993.
- Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, Shea LD.** A method for ovarian follicle encapsulation and culture in a proteolytically degradable 3 dimensional system. *J Vis Exp*, v.15, p.2695, 2011.
- Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, Shea LD.** Interpenetrating fibrin-alginate matrices for *in vitro* ovarian follicle development. *Biomaterials*, v.30, p.5476–5485, 2009.
- Silva-Buttkus P, Jayasooriya GS, Mora JM, Mobberley M, Ryder TA, Baithu M, Stark J, Franks S, Hardy K.** Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *J Cell Sci*, v.121, p.3890–3900, 2008.
- Silva-Santos KC, Santos GM, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MI, Sturion L, Melo-Sterza FA, Seneda MM.** Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v.76, p.1051–1057, 2011.
- Silva-Santos KC, Santos GMS, Koetz Junior C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DCM, Seneda MM.** Antral follicle populations and embryo production - *in vitro* and *in vivo* - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.228-232, 2014.
- Silva JRV.** Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. Phd Thesis. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2005, 142p. Disponível em <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/8674>. Acesso em 20 de dez. de 2021.
- Silva JR, Van Den Hurk R, De Matos MH, Dos Santos RR, Pessoa C, De Moraes MO, Figueiredo JR.** Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691–1704, 2004.
- Szlachta M, Tischner M.** Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, v.5, p.33–35, 2008.
- Tassel R, Kennedy J.P.** Early follicular development and atretic changes in ovary of the Lamb-fine structure and histochemistry. *Aust J Biol Sci*, v.33, p.675–678, 1980.
- Telfer EE, Zelinski MB.** Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril*, v.99, n.6, p.1523–1533, 2013.
- Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Joo Thong K.** A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*, v.23, ed.5, p.1151–1158, 2008.
- Telfer EE, Sakaguchi K, Clarkson YL, McLaughlin M.** *In vitro* growth of immature bovine follicles and oocytes. *Reprod Fertil Dev*, v.32, n.2, p.1–6, 2019.
- Tsafiri A, Braw RH.** Experimental approaches to atresia in mammals. *Biol Reprod*, v.6, p.226–265, 1984.
- Vieira RJ.** Biotécnicas aplicadas à Reprodução Bovina: Generalidades. *Cienc Anim Bras*, v.22, ed.1, p.55–65, 2012.
- Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE.** FSH and growth factor affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.45, p.817–832, 1996.
- Wang X, Gook DA, Walters KA, Anazodo A, Ledger WL, Gilchrist RB.** Improving fertility preservation for girls and women by coupling oocyte *in vitro* maturation with existing strategies. *Women Health*, v.12, p.275–278, 2016.
- Wood TC, Montali RJ, Wildt DE.** Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.190–200, 1997.
- 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*, v.28, p.2187–2200, 2013.
- Yang Q, Zhu L, Jin L.** Human Follicle *in vitro* Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v.11, n.11, p.548, 2020.
-