



Abordagens genéticas e de bioengenharia para o estudo da foliculogênese

Genetic and bioengineering approaches to the study of folliculogenesis

Amanda Fonseca Zangirolamo^{1,2}, Tamires Korchovei Sanches¹, Fábio Morotti^{1,3}, Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), UEL, Londrina, PR, Brasil

²Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, Londrina, PR, Brasil

³Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, UEL, Londrina, PR, Brasil

Resumo

O desenvolvimento de estudos genéticos e de microdispositivos biológicos tem proporcionado a ampliação do conhecimento sobre os complexos eventos que envolvem a reprodução animal. O desafio ainda é imensurável, mas a criação e surgimentos de novas perspectivas para a pesquisa básica tem-se feito presente. Neste trabalho revisamos de maneira sucinta algumas abordagens recentes, utilizadas pela pesquisa básica, sobretudo com o objetivo de lançar luz sobre o desenvolvimento folicular e oocitário. Dessa forma, essa revisão pretende fornecer uma visão geral do uso das tecnologias ômicas e sistema de microfluídica como auxiliares na compreensão da foliculogênese. Adicionalmente serão apresentadas particularidades inerentes à fisiologia da gametogênese, que incluem ação de microorganismos e mitocôndrias, além do importante papel da comunicação intercelular através das vesículas extracelulares.

Palavras-chave: Desenvolvimento folicular; Fluido folicular; Microfluídica; Microbioma reprodutivo; Tecnologias ômicas.

Abstract

The development of genetic studies and biological microdevices has expanded knowledge about the complex events involving animal reproduction. The challenge is still immeasurable, but the creation and emergence of new perspectives for basic research have been present. This paper briefly reviews some recent approaches used in basic research, mainly to shed light on follicular and oocyte development. Thus, this review intends to provide an overview of the use of omics technologies and microfluidics systems as aids in understanding folliculogenesis. Also, it will present particulars inherent in the physiology of gametogenesis, which include microorganisms and mitochondria, in addition to the important role of intercellular communication through extracellular vesicles.

Keywords: Follicular development; Follicular fluid; Microfluidics; Reproductive microbiome; Omic Technologies.

Introdução

A foliculogênese compreende o processo de ativação de um folículo primordial contendo um oócito a partir da reserva ovariana e seu desenvolvimento até o estágio ovulatório maduro (Morohaku, 2019). Este processo, altamente complexo, é controlado por fatores de sinalização tanto extra como intra-ovarianos. A competência do oócito e a capacidade de fecundação, para então suportar uma gestação viável, advém dos eventos que ocorrem durante a foliculogênese (Sarma; Findlay; Hutt, 2019).

A comunicação intercelular entre as células somáticas e o oócito dentro do folículo é essencial para gerar um gameta competente (Clarke, 2018). Nesse contexto, tem-se destacado o papel das vesículas extracelulares. Essas nanopartículas são responsáveis por mediar a comunicação célula a célula no microambiente folicular e podem ser obtidas a partir do fluido folicular. Tais estruturas têm sido atualmente estudadas como biomarcadores e ferramentas de suplementação para mimetizar as condições fisiológicas durante as técnicas de reprodução assistida, uma vez que são veículos de moléculas bioativas (Ávila, D.; Silveira, D., 2019).

Nos cultivos de folículos ovarianos a comunicação intercelular também se faz importante. Dessa maneira, as técnicas como o cultivo 3D e microfluídica, se tornaram interessantes, pois possibilitam a

¹Correspondência: amandafz@uel.br

Recebido: 01 de setembro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



melhor manutenção da arquitetura e morfologia folicular, e assim favorecem os mecanismos de comunicação celular (Bourdon *et al.*, 2021; Sequeira *et al.*, 2020).

Outro campo de estudo que pode ser melhor investigado para o entendimento da foliculogênese é a presença de microrganismos (microbiota) no microambiente folicular. Pesquisadores já relataram a presença de bactérias no fluido de folículos antrais, inclusive na ausência de uma infecção sintomática (OWENS *et al.*, 2020; SALARY *et al.*, 2020). Alguns autores inclusive sugerem uma associação da microbiota presente no fluido folicular com a fertilidade de fêmeas de diferentes espécies (Pelzer *et al.*, 2013; Salary *et al.*, 2020).

Adicionalmente, pesquisas com diferentes tecnologias ômicas envolvendo as células do *cumulus*, granulosa e oócito já mostraram fornecer dados importantes para elucidar melhor o mecanismo de desenvolvimento folicular, competência e desenvolvimento do oócito (Wu *et al.*, 2017; Hao *et al.*, 2021, Taher *et al.*, 2021). Por fim, também já foi relatado que as mitocôndrias presentes no citoplasma de oócitos, influenciam a sinalização celular durante o desenvolvimento oocitário, bem como, sustentam a competência do oócito (Chiaratti *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2020).

Assim, esta revisão tem por objetivo pontuar os aspectos básicos da foliculogênese e de maneira sucinta, apresentar as potenciais técnicas e novas abordagens genéticas e de bioengenharia que estão surgindo nesse contexto. Entre elas iremos aqui abordar: i) o estudo das vesículas extracelulares liberadas no microambiente folicular; ii) o uso de cultivo 3D e de microfluídica envolvendo folículos ovarianos; iii) a investigação do papel da microbiota no interior do líquido folicular; iv) a utilização das tecnologias ômicas em geral; v) bem como o estudo da influência das mitocôndrias presentes nos oócitos, no processo de foliculogênese.

Foliculogênese

A foliculogênese e a oôgênese são apoiadas e coordenadas pelos ovários mediante a produção de hormônios. A conclusão desses eventos fisiológicos propicia a formação e liberação de um oócito com capacidade de ser fecundado (Cox; Takov, 2021). A foliculogênese evolui a partir da reserva dos folículos ovarianos, formada ainda na vida fetal dos mamíferos. As chamadas células germinativas primordiais migram do saco vitelínico para as gônadas primordiais, e em seguida entram em processo de divisões mitóticas formando diversos grupamentos de oôgonias. Subsequentemente, células somáticas circundam as oôgonias, formando os cordões corticais que darão origem aos folículos primordiais (Bhartiya; Sharma, 2020).

O folículo primordial é circundado por células somáticas pavimentosas, conhecidas como pré-granulosa. A justaposição entre as células somáticas do folículo e o oócito permite interações importantes e fundamentais para a progressividade da foliculogênese (Bernabé *et al.*, 2020; Rosa, C. *et al.*, 2018). O desenvolvimento do folículo primordial a folículo primário envolve uma série de fatores de crescimento que são essenciais e inerentes a cada fase da foliculogênese. Na espécie bovina, as chamadas ondas de crescimento folicular correspondem a um estímulo para o recrutamento de folículos pré-antrais (Cox; Takov, 2021).

Quando o folículo primordial é recrutado, as células pavimentosas que o envolvem se transformam em células cuboides e proliferam, essas células chamadas granulosa são envolvidas por uma lâmina basal dando origem ao folículo primário (Cox; Takov, 2021). Simultaneamente, uma espessa camada de glicoproteínas, denominada zona pelúcida, se forma ao redor da membrana plasmática do oócito, permanecendo durante todo o desenvolvimento folicular e embrionário inicial (Scaramuzzi *et al.*, 2011).

Nessa fase de desenvolvimento folicular pré-antral o *crosstalk* entre o oócito e as células somáticas se torna essencial. Essa interação envolve mudanças na expressão gênica do oócito que atua por diversas vias de comunicação, formando redes complexas para disseminar a informação e seus comandos (Choi, Y.; Rajkovic, 2006; Reynaud, K; Driancourt, M. ., 2000).

Os oócitos são capazes de induzir e auxiliar o desenvolvimento folicular, diferenciação celular e maturação oocitária, por intermédio da ativação de diversos fatores parácrinos e de crescimento, que atingem o tecido ou células somáticas ao seu redor (Eppig, 2001). Continuamente, o desenvolvimento do folículo secundário desencadeia a proliferação das células da granulosa formando duas camadas ao redor do oócito. Nessa fase de desenvolvimento, após as células da granulosa expressarem receptores para hormônio folículo estimulante (FSHR) e o folículo atingir cerca de 4 mm de diâmetro, o FSH parece exercer maior influência sob a foliculogênese (Buratini *et al.*, 2005).

Conforme o folículo secundário cresce, o mesmo promove a diferenciação de células do estroma ao seu redor para originar as primeiras células da teca. As células da teca serão essenciais para o suprimento da síntese do fluido folicular subsequente (Smitz; Cortvrindt, 2002). O fluido folicular é produzido a partir da transudação do plasma periférico, via membrana basal do folículo. Assim, é

sintetizado a partir das células da granulosa e acaba por se acumular nos espaços intercelulares das mesmas. A intensa produção de fluido acaba provocando a dissociação entre as células foliculares e posterior formação de uma cavidade ou antro preenchida pelo fluido (Cox; Takov, 2021).

Ao iniciar a formação do antro, o folículo apresenta mais de duas camadas de células da granulosa, e passa a ser chamado de folículo terciário ou antral. A reorganização das células foliculares, causada pela formação da cavidade antral, dá origem as células da granulosa mural. Essas células são especializadas em esteroidogênese e essenciais para a ovulação. Além disso, as células da teca se diferenciam em células da teca interna e externa (Eppig, 2001).

Adicionalmente, o antro folicular promove o isolamento do oócito que se liga as células da granulosa mural através do *cumulus oophorus*, essa estrutura, formada também por células da granulosa, serve de sustentação para o mesmo. Há ainda algumas camadas de células da granulosa ao redor do oócito, com íntimo contato entre o mesmo e o fluido folicular, que são denominadas *corona radiata*. A junção entre *cumulus oophorus*, *corona radiata*, e oócito pode ser simplesmente chamada de complexo *cumulus-oócito* (Cox; Takov, 2021; Eppig, 2001).

O isolamento do complexo *cumulus-oócito* (COCs) no interior do folículo, permite que as células ao seu redor possam desempenhar funções especializadas essenciais para a aquisição da competência oocitária. (Gilchrist, Robert B.; Lane; Thompson, 2008; Scaramuzzi *et al.*, 2011). Essa constante comunicação bidirecional entre oócito e células somáticas garantem o adequado desenvolvimento e maturação do oócito a fim de garantir o potencial de fecundação e posterior desenvolvimento embrionário de maneira viável (Choi, Y.; Rajkovic, 2006).

O folículo antral continua seu crescimento e passa a receber influência do hormônio luteinizante (LH) de forma consistente a partir de 7 a 8 mm de diâmetro (Padmanabhan; Cardoso, 2020). Devido a grande quantidade de fluido em seu interior, é possível visualiza-lo em exames ultrassonográficos, e dessa forma monitorar o desenvolvimento folicular *in vivo* até a sua ovulação ou atresia (Fricke, 2002). As fases do desenvolvimento folicular são mostradas na Figura 1.

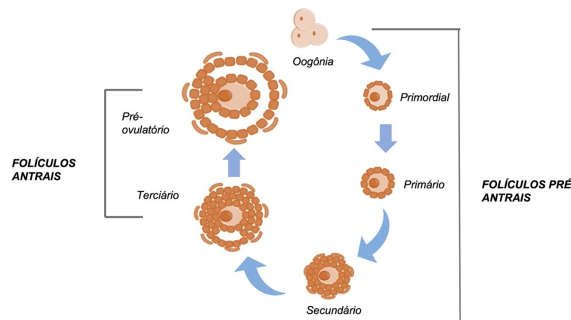


Figura 1. Sequência esquemática do desenvolvimento folicular completo.

Resumidamente podemos conceitualizar que o processo fisiológico desempenhado durante a foliculogênese engloba a ativação de estruturas primordiais, células e tecidos, com o objetivo de promover o desenvolvimento folicular de maneira eficiente que permite a maturação do oócito e consequentemente a liberação de um gameta capaz de ser fecundado, produzir um embrião e a geração de um indivíduo saudável.

Novas abordagens no estudo da foliculogênese

Presença de vesículas extracelulares em fluido folicular

O folículo antral compõe um microambiente onde o oócito pode alcançar seu desenvolvimento completo. Partindo do estágio de repouso como folículo primordial até a ovulação, as células foliculares são as grandes responsáveis pelo fornecimento de nutrientes, que suportam a atividade metabólica do oócito e ainda regulam a evolução do seu desenvolvimento. De maneira sincronizada, o oócito também produz sinais às células da granulosa para ajustarem sua diferenciação e consequentemente sua atividade (Dragovic, R. A. *et al.*, 2007).

A capacidade de resposta e interação entre oócito e células somáticas é dependente de vias intra e extracelulares que auxiliam na configuração dinâmica do microambiente folicular, tornando-o capaz de complementar a progressão da célula germinativa, assegurando assim que no momento da ovulação seja liberado um oócito competente à (Clarke, 2018).



A fecundação, gametogênese e desenvolvimento embrionário ainda dependem de diversos outros tipos celulares, tecidos e órgãos, para concluir suas diversas fases fisiológicas. Essa demanda é coordenada por moléculas sinalizadoras que se propagam por distintas vias de comunicação (Andrade, et al., 2019). As vias de comunicação intercelulares bem conhecidas são: as junções comunicantes (GAP) presentes entre as células somáticas ou entre células somáticas entre o oócito e projeções transzonais (TZPs) através da zona pelúcida (Albertini; Barrett, 2004; Gilchrist; Lane; Thompson, 2008). Além disso, tem-se os fatores parácrinos, que de forma indireta, propagam moléculas sinalizadoras (Knight; Glistler, 2006).

De forma relativamente recente, as vesículas extracelulares foram descobertas como uma importante via de comunicação intercelular, e tem sido alvo de diversos estudos que visam compreender os distintos e complexos processos fisiológicos que estão envolvidos na reprodução animal (SILVEIRA, et al., 2012). As vesículas extracelulares são partículas, de tamanhos variados, envoltas por uma bicamada lipídica, formadas por diversos tipos celulares e secretadas para o espaço extracelular. Essas vesículas carregam em seu interior moléculas biotivas que transmitem informações importantes por meio de RNAs, microRNAs, proteínas e lipídios principalmente (Collado et al., 2018).

As vesículas extracelulares são divididas em microvesículas e exossomos. Os exossomos apresentam diâmetro de 30 a 100 nm, enquanto as microvesículas são maiores com diâmetro entre 100 a 1000 nm (Tannetta et al., 2014). Ambos os tipos de nanopartículas já foram identificados no fluido dos folículos antrais em desenvolvimento durante o ciclo estral de fêmeas bovinas, e comprovadamente regulam o crescimento folicular, bem como atuam em momentos chaves, como na maturação oocitária. (Andrade, Gabriella Mamede et al., 2019; Kalluri; Lebleu, 2020).

Adicionalmente, foi demonstrado que além dos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, as vesículas extracelulares (VEs) também regulam mecanismos importantes durante a fecundação, implantação e crescimento do embrião, (Hillier, 2009). As VEs já foram encontradas em praticamente todos os tecidos orgânicos, e seu mecanismo de atuação é influenciado por sua célula produtora, podendo desencadear processos fisiológico, mas também são capazes de atuar na comunicação de processos patológicos (Almughlliq et al., 2017).

Dessa forma, as VEs também despertam o grande interesse pela possibilidade de serem utilizadas como ferramenta terapêutica e diagnóstica. No âmbito fisiológico as VEs têm sido estudadas como biomarcadores e potencialmente utilizadas como suplementação durante as técnicas de reprodução assistida, com o objetivo de simular as condições *in vivo*, já que as mesmas são veículos de moléculas ativas (De Ávila et al., 2020). O fato de as VEs estarem envolvidas tanto em processos fisiológicos, quanto em processos patológicos, torna imprescindível a o estudo dessas nanopartículas e cautela em seu aproveitamento para incrementar a produção de embriões *in vitro*, por exemplo (Reader; Stanton; Juengel, 2017; Sirard et al., 2006; Watson, 2007).

Fisiologicamente, admite-se que as VEs são liberadas pelas células da granulosa mural para o fluido folicular, alcançando as células do *cumulus*, e podendo chegar até as projeções transzonais (De Ávila et al., 2020), promovendo, assim, a regulação da capacitação oocitária. Por sua vez, as células do *cumulus* também liberam VEs no fluido folicular, as quais que se ligam as células da granulosa mural ajustando a função das mesmas. Essa forma de comunicação bidirecional é essencial para suportar o desenvolvimento adequado tanto oocitário quanto folicular. EVs de FF (Andrade et al., 2019).

Como vimos, o fluido folicular (FF) contém as VEs de forma disseminada, dessa maneira, serve como uma fonte de amostra, de fácil acesso, para o desenvolvimento de estudos que buscam compreender melhor a fisiologia do desenvolvimento oocitário, bem como a identificação de biomarcadores relacionados à maior eficiência da competência oocitária. Em mulheres, o FF tem servido como fonte investigativa de disfunção ovariana e problemas de infertilidade (Andrade et al., 2019).

Foi observado que as VEs presentes no fluido folicular, em sua maioria, são originadas das células da granulosa e do COC. Além disso, as nanopartículas entregam as células alvo *in vivo* miRNA bastante similares àqueles encontrados nas VEs analisadas em sistemas de cultivo *in vitro* (Collado et al., 2018). Nesse sentido, assimilar os mecanismos que envolvem as comunicações intercelulares presentes no complexo microambiente folicular, se torna importante no âmbito de serem mimetizadas para melhorar as etapas de produção embrionária *in vitro* (Andrade et al., 2019)

Em uma primeira caracterização de VEs, realizada por Da Silveira et al. (2012), obtidas a partir de FF ovariano de éguas, foi observada a presença de miRNAs e proteínas, porém havia diferença no perfil dessas moléculas quando o FF era originado de éguas jovens em relação ao de éguas com idade avançada (Da Silveira et al., 2012). Com base nesse, estudo foi possível compreender que modificações fisiológicas, inerentes ao animal, e a condições patológicas, são refletidas pelas EVs.

Sendo assim, despertou-se o interesse por identificar o impacto das VEs sobre diferentes

perspectivas, principalmente as fisiológicas, para a reprodução animal. Sohel e colaboradores (2013), demonstraram que o perfil de miRNAs difere de acordo com a competência oocitária das fêmeas bovinas. Além disso, comprovou a presença de miRNA, fornecidos pelas EVs do FF, no interior das células da granulosa bem como a modulação de seus genes alvo (Sohel *et al.*, 2013).

Posteriormente, em éguas, foi verificado que transcritos das células da granulosa, também foram regulados pelas EVs do FF, influenciando a via de sinalização do fator de crescimento transformador- β (TGF- β) em sistema de cultivo *in vitro* (Silveira, Juliano C. Da *et al.*, 2015). Além disso, na mesma espécie animal, foi comprovado que foliculos em diferentes estágios de desenvolvimento apresentam distintos perfis de miRNAs de VEs, bem como estão relacionados a idade da fêmea (Da Silveira *et al.*, 2015).

Em mulheres também foi verificado que a idade e a fase de desenvolvimento folicular alteraram o conteúdo de miRNA nas VEs (Santoncito *et al.*, 2014). Outros estudos com mulheres ainda demonstraram que o índice de massa corporal, apresentado pelas mesmas, também foi capaz de influenciar os miRNAs, presentes nas EVs, os quais correspondiam a modulação das vias de desenvolvimento folicular e oocitário (Martinez *et al.*, 2018).

Adicionalmente, em fêmeas bovinas já foi verificado que as VEs do fluido folicular, influenciam a competência oocitária, atuam nas vias da ovulação, auxiliam nos mecanismos de defesa contra o estresse térmico e o estresse oxidativo, bem como sofrem influência do estado metabólico no perfil de miRNAs (Gebremedhn *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2019). Os estudos recentes e cada vez mais numerosos, trazem as distintas origens e funções das VEs, que ampliaram os conhecimentos sobre fisiologia reprodutiva e patologia. Ainda assim, muitos mecanismos específicos podem ser melhor elucidados se abordadas as atividades das EVs (Han; LI, 2020). Na Figura 2 encontram-se alguns exemplos de estudos envolvendo vesículas extracelulares e o folículo ovariano.

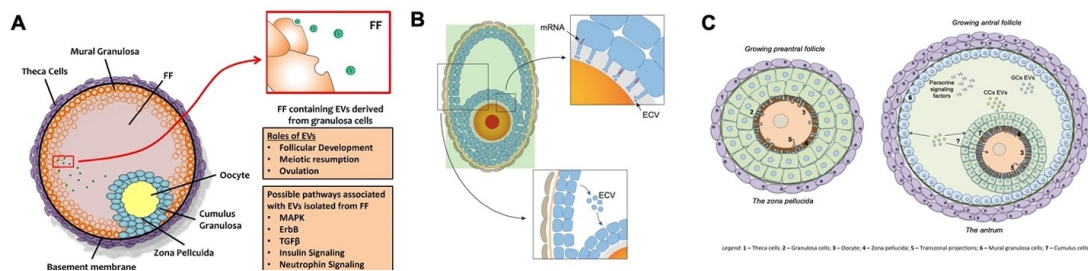


Figura 2. Vesículas extracelulares e o folículo ovariano. A) Esquema mostrando a produção de vesículas extracelulares no interior do folículo ovariano, apresentado por Machtinger, 2015 (Machtinger; Laurent; Baccarelli, 2015). *EV*: vesículas extracelulares; *FF*: fluido folicular. B) Mecanismos de comunicação intrafolicular por meio de vesículas extracelulares, sugerido por Clarke, 2018 (Clarke, 2018). Vesículas extracelulares presentes no fluido folicular representam um mecanismo potencial pelo qual macromoléculas, incluindo mRNA e miRNA, podem ser transferidas entre as células. *ECV*: vesículas extracelulares. C) Comunicação célula a célula no folículo ovariano apresentada por Andrade *et al.*, 2019 (Andrade *et al.*, 2019). Durante o crescimento pré-antral (esquerda), é formada a zona pelúcida. Desse modo, para a manutenção contínua de uma ponte citoplasmática entre as células germinativas e somáticas, o oócito estimula as células da granulosa a gerar filamentos citoplasmáticos especializados conectando ambas as células - as projeções transzonais. Nos foliculos em crescimento antral (direita) as vesículas extracelulares são secretadas no fluido folicular e são captadas por diferentes tipos de células por um mecanismo de entrega de carga. A transferência direta de carga vesículas extracelulares do fluido folicular para o oócito ainda não foi descrita. *CCs*: células cumulus; *EVs*: vesículas extracelulares; *GCs*: células da granulosa; *Teca*: células da teca.

A busca na ampliação do conhecimento, a respeito das VEs de origem reprodutiva, como àquelas derivadas de células endometriais, embrionárias, foliculares, bem como do sistema reprodutor masculino, tem por objetivo ser aplicado no incremento das técnicas de reprodução assistida, bem como no teste diagnóstico de patologias (Ludwig; Whiteside; Reichert, T. E., 2019).

Sistemas de microfluídica, cultivo 3D e organ-on-a-chip

Os sistemas de cultivo celulares convencionais não foram eficientes em proporcionar o ambiente adequado para que determinado tecido expressasse seu potencial físico e biológico. Dessa forma as indústrias de microeletrônica e microengenharia criaram sistemas de cultura de células tridimensionais (3D), conhecidos coletivamente como *organ-on-a-chip* ou sistemas microfluídicos para modelos *in vitro* (Low *et al.*, 2021).

A estratégia envolvida no uso dos sistemas microfluídicos prevê o desenvolvimento de um

microambiente ideal para análise do comportamento físico do tecido ou estrutura biológica de estudo (Beebe; Mensing; Walker, 2002). As tecnologias microfluídicas, vem atualmente sendo empregadas na cultura, manutenção e estudo do desenvolvimento do folículo ovariano, tanto para aplicações experimentais como terapêuticas (Sequeira *et al.*, 2020).

Pensando no sistema de cultivo de folículos pré-antrais, que nessa fase apresentam formato esferoide, se torna importante fornecer um sistema de cultura 3D sequencial adequado, uma vez que a manutenção da morfologia folicular é essencial para expressar os aspectos fisiológicos inerentes ao desenvolvimento dos oócitos (Kashaninejad; Shiddiky; Nguyen, 2018; Nawroth *et al.*, 2018).

Permitir que os mecanismos moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento do folículo ovariano aconteça da melhor maneira possível, isto é, a mais próxima da realidade fisiológica, é crucial para futuramente adaptar biotecnologias de reprodução assistida e metodologias de estudos sobre foliculogênese, bem como, permitir o desenvolvimento de novas ferramentas para crescimento, maturação e manipulação *in vitro* de folículos de mamíferos (Sequeira *et al.*, 2020).

Desta forma, na última década, os sistemas microfluídicos vem se disseminando como uma tecnologia inovadora e interessante para ser usada como modelo de estudo. Proporcionar o posicionamento das células de forma tridimensional (3D) e assim imitar a estrutura e atividade de um órgão ou tecido no indivíduo parece óbvia, mas esses sistemas só foram criados recentemente (Weng, 2019; Young; Huh, 2021).

O trabalho de Choi *et al.* (2015) demonstrou a importância da manutenção dos aspectos morfológicos para o desenvolvimento folicular. Utilizando um dispositivo microfluídico e uma técnica chamada de focagem em fluxo microfluídico, os pesquisadores realizaram o encapsulamento de pequenos folículos secundários. A cápsula formada, era composta por um colágeno mole, e uma camada externa mais dura composta por alginato, que imitava, respectivamente, os tecidos medular e cortical ovariano. Os pesquisadores ainda verificaram que essa técnica melhorou o desenvolvimento folicular do estágio pré-antral para o antral (Huang *et al.*, 2015).

Um outro grupo de pesquisadores, percebendo que a correlação entre a qualidade do oócito e sua taxa de sedimentação poderiam ser aplicadas para separar oócitos bovinos de alta qualidade desenvolveram um sistema adaptado de microfluídica para selecionar esses oócitos e assim melhorar a taxa de concepção na FIV (Iwasaki *et al.*, 2018).

Da mesma forma que os microdispositivos fluídicos podem servir, de maneira efetiva e precisa, para a melhor compreensão dos aspectos fisiológicos, também podem ser utilizados para apontar os efeitos de vários estímulos negativos que acontecem, durante a instalação de processos patológicos em um órgão saudável, bem como, futuramente auxiliar na aplicação da farmacoterapêutica para controlar os aspectos moleculares inerentes a patologia (Weng, 2019).

Apesar de os estudos revisados aqui representarem o sucesso e a promessa dessa abordagem, é importante observar que ainda existem desafios significativos para a compreensão de todo o potencial da tecnologia *organ-on-a-chip* para a biologia reprodutiva e medicina. Na Figura 3 apresentamos a tecnologia *organ-on-a-chip* envolvendo sistema reprodutor feminino no que concerne o estudo da foliculogênese.

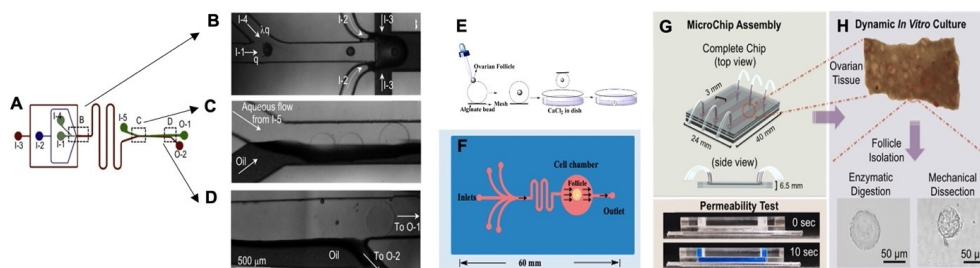


Figura 3. Tecnologia *Organ-on-a-chip* envolvendo sistema reprodutor feminino. A-D) Dispositivo de fluxo microfluídico não-planar para encapsular o folículo pré-antral secundário inicial em microcápsulas, desenvolvido por Choi *et al.* 2014 (CHOI, J. K. *et al.*, 2014). (A) Uma vista esquemática do sistema de microcanais. (B) Imagem da região em caixa no painel A mostrando as áreas de despacho e foco de fluxo. (C) Imagem da região destacada no painel A mostrando a entrada do canal de extração. (D) Imagem da região destacada no painel A mostrando a saída do canal de extração. I-1, I-2, I-3, I-4 e I-5 são as entradas de alginato, emulsão de óleo mineral, despacho e fluxos de extração, respectivamente. O-1 e O-2 são saídas para os fluxos de emulsão aquosa (contendo microtissues) e de óleo, respectivamente. E-F) Encapsulamento de folículos ovarianos e desenho do dispositivo de microfluídica desenvolvido por Aziz *et al.*, 2017 (AZIZ *et al.*, 2017). (E) Encapsulamento de folículos ovarianos usando *bead* de alginato e CaCl₂. (F) Desenho do chip: 5 entradas e 1 saída com uma câmara onde o folículo ovariano é cultivado. G-H) Sistema microfluídico dinâmico *in vitro* para cultura de tecidos e folículos ovarianos desenvolvido por Nagashima *et al.*, 2017. (G) Esquema dos componentes do chip microfluídico e do microchip montado (superior), e teste de permeabilidade de corante (corante alimentar) através de 1% de hidrogel de alginato reticulado dentro do canal do chip (inferior). (H) Tecidos e folículos ovarianos isolados por digestão enzimática e dissecação mecânica.



Investigação da microbiota em fluido folicular

Ao longo dos anos as características atribuídas as bactérias envolviam principalmente sua capacidade patogênica prejudicial, mas estudos recentes vêm mostrando a capacidade desses microrganismos funcionarem em sinergia e de maneira comensal de acordo com sua localização no hospedeiro.

Em bovinos, o poder de detecção de bactérias, proporcionado pelo avanço tecnológico, foi capaz de comprovar a presença das mesmas no interior do útero, órgão que se pensava ser estéril. Atualmente, o sequenciamento da região 16S rRNA permite a identificação eficiente de microbiomas (população de bactérias de determinado local), eliminando a necessidade de se realizar os processos, muitas vezes mais difíceis, de cultura e isolamento bacteriano para comprovar a presença de bactérias (Owens *et al.*, 2020).

No fluido de folículos antrais humanos, foi identificado a presença de algumas espécies bacterianas como: *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Esse grupo de microrganismos correspondeu aos resultados adversos e negativos encontrados na fertilização *in vitro* (FIV), enquanto a presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* spp., nos fluidos foliculares ovarianos, pareceu incrementar as taxas de transferência de embriões. (Pelzer *et al.*, 2013). Da mesma maneira, em bovinos, o FF ovariano não é estéril e isso foi comprovado pela detecção da presença de *S. aureus* no FF de vacas leiteira. Essa particularidade pode ser em partes, responsável pela ocorrência de infertilidade em algumas vacas leiteiras (Williams *et al.*, 2007).

Sendo assim, foi demonstrado que além de o fluido folicular não ser estéril como se pensava, as espécies bacterianas encontradas no mesmo podem provocar efeitos negativos ou positivos nos resultados de fertilização *in vitro*. Adicionalmente alguns estudos realizados com o fluido folicular de fêmeas suínas constataram também a presença de bactérias no mesmo. Sendo que a presença de *E. coli* e *Streptococcus* spp. teve capacidade de inibir o hormônio foliculo-estimulante (FSH) e de se ligar ao seu receptor nas células da granulosa (Sluss, PM.; Fletcher; Reichert, 1983; Sluss, PM.; Reichert, 1983; Sluss *et al.*, 1994).

De maneira geral, sabe-se que alguns patógenos como *E. coli*, *T. pyogenes* e *F. necrophorum* podem provocar infecção no local em que se encontram e conseqüentemente realizar influências negativas durante os processos fisiológicos subsequentes. Já as bactérias comensais bem conhecidas como os lactobacilos, podem secretar flavonoides com potencial antioxidantes, bem como mitigar a secreção de eicosanoides, com potencial inflamatório, no fluido folicular para melhorar a qualidade do oócito (Owens *et al.*, 2020).

No FF de vacas leiteiras a presença dos flavonoides tem ação antioxidante que protege o oócito contra o estresse oxidativo favorecendo a qualidade e competência oocitária (Guerreiro *et al.*, 2018; Martins; Barros, L.; Ferreira, 2016). Enquanto concentrações aumentadas de eicosanoides, intermediários nas vias de inflamação, diminuíram a qualidade dos oócitos e conseqüentemente a fertilidade (Guerreiro *et al.*, 2018; Jabbour *et al.*, 2009).

Diversos estudos já isolaram bactérias comensais no trato reprodutivo feminino saudável em uma grande variedade de animais, e a presença dessas bactérias, em condições de equilíbrio, tem sido associada a resultados reprodutivos positivos. Ainda assim, a informação é escassa em relação a presença e função das bactérias do trato reprodutivo saudável de fêmeas bovinas em comparação aos demais animais.

Além disso, dados sobre a densidade bacteriana também são necessários para se compreender o real papel em mecanismos fisiológicos, por exemplo. A compreensão correta desses mecanismos pode promover a criação de estratégias para utilizar o microbioma a favor da fertilidade, principalmente nas propriedades de atividade leiteira que apresentam maior desafio para o setor reprodutivo (Owens *et al.*, 2020).

A densidade bacteriana aumentada, em decorrência de infecção instalada em trato reprodutivo de vacas leiteiras pós-parto, bem como em casos de mastite, foi encontrada em animais com folículos antrais e CL (corpo lúteo) de menor tamanho em relação às vacas saudáveis, conseqüentemente a produção de estradiol e progesterona circulantes também foram menores (Cheong *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2007), e a função e a ciclicidade ovariana foram interrompidas (Sheldon, I., 2002).

Tecnologias ômicas envolvendo oócito, células do cumulus e granulosa

As técnicas ômicas são utilizadas para explorar os mecanismos de desenvolvimento dos folículos e oócitos através de biomarcadores que indicam uma função biológica, a qual pode ser de origem fisiológica ou patológica (Fan, 2021). Uma das técnicas ômicas mais disseminadas é a transcriptômica,



que consegue analisar e comparar o perfil de expressão gênica das células somáticas e dos oócitos, o que permite encontrar biomarcadores que refletem seu potencial de desenvolvimento, bem como aqueles responsáveis pela comunicação entre os oócitos e as células somáticas, que, como se sabe, são importantes para uma adequada aquisição da competência oocitária e posterior viabilidade embrionária (Kathirvel; Soundian; Kumanan, 2013).

Em reprodução humana assistida, é comum o uso de técnicas ômicas para identificar a presença de biomarcadores de fertilidade através do uso de células do *cumulus* e granulosa. Determinados biomarcadores possuem a capacidade de apontar o potencial nível de desenvolvimento da competência dos oócitos e posterior desenvolvimento dos embriões para a transferência, melhorando assim os índices clínicos do sucesso da gravidez de mulheres submetidas a FIV (Yu, E. J.; Lyu, 2021).

O estudo de biomarcadores, para infertilidade também é importante, pois a investigação dos perfis de transcritos pode fornecer evidências da origem do problema. A identificação de genes chaves a partir das células do *cumulus* e da granulosa se torna interessante por ser uma análise não invasiva e por fornecer biomarcadores mais controláveis. Além disso é um modelo melhor para identificar a capacidade de desenvolvimento do oócito em comparação com os transcritos do próprio oócito (Montfoort, Van et al., 2008).

A maioria dos estudos que envolvem os transcritos proveniente dos oócitos estão mais relacionados aos fatores secretados pelo oócitos (FSO), principalmente o fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) que regulam fatores parácrinos e assim exercem influência nas células somáticas, promovendo o desenvolvimento e proliferação do COCs (Gilchrist; Lane; Thompson, 2008; Kathirvel; Soundian; Kumanan, 2013).

Apesar de, até o momento, os estudos com transcriptoma terem resultado em limitada identificação de biomarcadores, as técnicas ômicas tem potencial para o fornecimento de informações que ajudarão a compreender o refinado *crossstalk* entre oócitos e células somáticas em diferentes espectros e etapas da foliculogênese (Yu, E. J.; Lyu, 2021).

Papel das mitocôndrias nos oócitos

Os oócitos apresentam uma enorme carga de mitocôndrias em comparação as demais células do organismo, indicando que estas são bastantes requisitadas durante seu desenvolvimento. Nos oócitos as mitocôndrias se apresentam, morfologicamente, com aparência arredondada e rede fragmentada (Jansen; Boer, De, 1998; Motta et al., 2000; Wassarman; Josefowicz, 1978). Algumas inconformidades, relacionadas as mitocôndrias, como quantidade inadequada, distribuição irregular e funcionalidade deficiente foram associadas aos oócitos de baixa competência e qualidade em humanos, camundongos, bovinos, ovinos e suínos (Chiaratti, Marcos Roberto et al., 2018).

Durante o desenvolvimento oocitário o número de mitocôndrias aumenta no ooplasma, podendo chegar a cerca de cem mil unidades em oócitos maduros (Jansen; Boer, De, 1998). De maneira sincronizada, o número de cópias do seu próprio genoma o mtDNA aumenta cerca de mil vezes nos oócitos maduros, chegando a aproximadamente 200.000 moléculas (Cao, L. et al., 2007; Cree et al., 2008; Wai; Teoli; Shoubridge, 2008). Sendo assim, os gametas femininos, aportam a maior quantidade de mitocôndrias e mtDNA em relação aos demais tipos celulares do organismo de mamíferos. Conectando à função das mitocôndrias a sua enorme quantidade presente no oócito, sugere-se uma grande demanda de energia seja necessária para apoiar seu desenvolvimento.

Além das mitocôndrias possuem função essencial na produção de energia para as células, ainda estão envolvidas no transporte de íons cálcio, biossíntese dos conjuntos de ferro-enxofre, e na via da apoptose, dentre outras atividades. Essas características, e a capacidade de regular a intensidade da sua atividade oxidativa são importantes para prevenir o dano por EROs (espécies reativas de oxigênio) ao oócito, bem como atuar na deleção de mutações do mtDNA (Chiaratti, Marcos Roberto et al., 2018; Chiaratti, Marcos Roberto; Meirelles, F. V., 2010).

É interessante apontar que a geração exacerbada de EROs pelas mitocôndrias é evitada por sua atividade diminuída. O fato de as mitocôndrias estarem em grande número e serem altamente móveis no ooplasma, permitindo que se agrupem em locais onde sua produção energética é requerida, promove maior eficiência no fornecimento de ATPs, e evita que sua atividade seja muito aumentada, protegendo o oócito sem gerar excesso de EROs (Chiaratti, Marcos Roberto et al., 2018; Wai; Teoli; Shoubridge, 2008).

A dinâmica e produção das mitocôndrias no ooplasma é auxiliada por proteínas como as mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2), que promovem a fusão e fissão das mitocôndrias. Foi observado, em



camundongos, que o desequilíbrio entre essas proteínas prejudicam a viabilidade do oócito, podendo causar infertilidade, comprovando a necessidade da atividade e equilíbrio das funções mitocondriais (Carvalho *et al.*, 2020).

O alto número de mitocôndrias também é justificado pela posterior demanda energética que ocorre no desenvolvimento embrionário inicial, sendo as mitocôndrias a principal fonte energética dos mesmos até o momento da implantação embrionária no útero (Spikings; Alderson; John, 2007). Já é bem aceito que os oócito e embriões em fase de desenvolvimento inicial dependem do suporte metabólico provido pelo oócito, sendo as mitocôndrias fundamentais nesse processo. Entretanto, ainda não se sabe ao certo a que se deve sua morfologia única e distinta em relação àquelas organelas presentes em células somáticas, e como sua forma influencia na relação entre oócito e folículo (Carvalho *et al.*, 2020).

Considerações

Conforme descrito nesta revisão, a regulação e todos os aspectos inerentes a foliculogênese permanece um universo a ser estudado e explorado. Todavia, apesar do notável avanço nas pesquisas que contribuem para que as lacunas no entendimento da foliculogênese sejam preenchidas, principalmente na fase pré-antral, algumas importantes questões a respeito desse processo ainda permanecem sem uma elucidação completa. Dentre as questões, tem-se: Como se inicia o recrutamento dos folículos? Como são controladas a ativação e repressão de tantos genes? Por que apenas uma pequena porcentagem dos folículos é submetida aos fatores de crescimento por vez?

Referências

- Albertini DF, Barrett SL.** The developmental origins of mammalian oocyte polarity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, out. 2004. v.15, n.5, p.599–606. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952104000461>>.
- Almughliq FB et al.** Effect of exosomes from plasma of dairy cows with or without an infected uterus on prostaglandin production by endometrial cell lines. *Journal of Dairy Science*, nov. 2017. v.100, n. 11, p. 9143–9152. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217308068>>.
- Andrade, Gabriella Mamede et al.** Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 2019. v.16, n.3, p.485–496. Disponível em: <<https://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR2019-0051>>.
- Ávila ACFCM De et al.** Estrous cycle impacts microRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, 14 fev. 2020. v.102, n.2, p. 62–375. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/102/2/362/5556620>>.
- Ávila D, Silveira D.** Role of extracellular vesicles during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction, fertility, and development*, jan. 2019. v.32, n.2, p.56–64. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32188558>>.
- Aziz AUR et al.** A Microfluidic Device for Culturing an Encapsulated Ovarian Follicle. *Micromachines*, 20 nov. 2017. v.8, n.11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30400524>>.
- Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM.** Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, ago. 2002. v.4, n.1, p.261–286. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916>>.
- Bernabé BP et al.** Ligands, Receptors, and Transcription Factors that Mediate Inter-Cellular and Intra-Cellular Communication during Ovarian Follicle Development. *Reproductive Sciences*, 14 fev. 2020. v. 27, n.2, p.690–703. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s43032-019-00075-8>>.
- Bhartiya D, Sharma D.** Ovary does harbor stem cells - size of the cells matter! *Journal of Ovarian Research*, 17 dez. 2020. v.13, n.1, p.39. Disponível em: <<https://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13048-020-00647-2>>.
- Bourdon G et al.** Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies. *Veterinary Research*, 10 dez. 2021. v. 52, n. 1, p. 42. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13567-020-00891-w>>.
- Buratini J et al.** Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, set. 2005. v.130, n. , p.343–350. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/130/3/1300343.xml>>.
- Cao L et al.** The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nature Genetics*, 11 mar. 2007. v.39, n.3, p.386–390. Disponível em:



<<http://www.nature.com/articles/ng1970>>.

Carvalho Karen F et al. Mitofusin 1 is required for oocyte growth and communication with follicular somatic cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2020. v.34, n.6, p.7644–7660. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32281181>>.

Cheong SH et al. Uterine and systemic inflammation influences ovarian follicular function in postpartum dairy cows. *PLOS ONE*, 19 maio. 2017. v.12, n.5, p.e0177356. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0177356>>.

Chiaratti, Marcos Roberto et al. The role of mitochondria in the female germline: Implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. *Cell Biology International*, jun. 2018. v.42, n.6, p. 711–724. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cbin.10947>>.

_____; **Meirelles FV.** Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. *Biology of Reproduction*, 1 jul. 2010. v.83, n.1, p.1–2. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.084269>>.

Choi JK et al. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue. *Biomaterials*, jun. 2014. v.35, n.19, p.5122–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24702961>>.

Choi Y, Rajkovic A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 16 mar. 2006. v.63, n.5, p.579–590. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5394-7>>.

Clarke HJ. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 2018. v.7, n.1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28892263>>.

Collado, MDel et al. Contributions from the ovarian follicular environment to oocyte function. *Animal Reproduction*, 2018. v.15, n.3, p.261–270. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v15/v15n3/p261-270 \(AR-SBTE-0082\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v15/v15n3/p261-270%20(AR-SBTE-0082).pdf)>.

Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. [S.l.]: [s.n.], 2021.

Cree LM et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature Genetics*, 27 fev. 2008. v.40, n.2, p.249–254. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng.2007.63>>.

Dragovic RA et al. Oocyte-Secreted Factor Activation of SMAD 2/3 Signaling Enables Initiation of Mouse Cumulus Cell Expansion1. *Biology of Reproduction*, 1 maio. 2007. v.76, n.5, p.848–857. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.106.057471>>.

Eppig J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 1 dez. 2001. p. 829–838. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/122/6/829.xml>>.

FAN, L. Transcriptomic comparison of ovarian granulosa cells between adult sheep and prepubertal lambs. 2021. p.1–30.

Fricke PM. Scanning the Future—Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, ago. 2002. v.85, n.8, p.1918–1926. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030202742689>>.

Gebremedhn S et al. Extracellular vesicles shuttle protective messages against heat stress in bovine granulosa cells. *Scientific Reports*, 25 dez. 2020. v.10, n.1, p.15824. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-72706-z>>.

Gilchrist Robert B, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, 1 abr. 2008. v.14, n.2, p.159–177. Disponível em: <<http://academic.oup.com/humupd/article/14/2/159/608734/Oocytesecreted-factors-regulators-of-cumulus-cell>>.

Guerreiro TM et al. A Metabolomic Overview of Follicular Fluid in Cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 8 fev. 2018. v.5. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2018.00010/full>>.

Han TT, LI W, LI GP. Progress in Understanding the Functional Roles of Extracellular Vesicles in Reproduction. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2020. v.33, n.7, p.518–527. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3967/bes2020.068>>.

Hillier SG. Paracrine support of ovarian stimulation. *Molecular Human Reproduction*, 1 dez. 2009. v. 15, n.12, p.843–850. Disponível em: <<https://academic.oup.com/molehr/article->



lookup/doi/10.1093/molehr/gap086>.

Huang H et al. Alginate Hydrogel Microencapsulation Inhibits Devitrification and Enables Large-Volume Low-CPA Cell Vitriification. *Advanced Functional Materials*, nov. 2015. v.25, n.44, p.6839–6850. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.201503047>>.

Iwasaki W et al. Simple separation of good quality bovine oocytes using a microfluidic device. *Scientific Reports*, 2018. v.8, n.1, p.1–9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-32687-6>>.

Jabbour HN et al. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction*, dez. 2009. v.138, n.6, p.903–919. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/138/6/903.xml>>.

Jansen RP, Boer K DE. The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, out. 1998. v.145, n.1–2, p.81–88. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720798001737>>.

Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 2020. v. 67, n.6478. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32029601>>.

Kashaninejad N, Shiddiky MJA, Nguyen N. Advances in Microfluidics-Based Assisted Reproductive Technology: From Sperm Sorter to Reproductive System-on-a-Chip. *Advanced Biosystems*, 15 mar. 2018. v.2, n.3, p.1700197. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adbi.201700197>>.

Kathirvel M, Soundian E, Kumanan V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (GDF9) and Bone morphogenetic factor15 (BMP15) mRNA transcripts during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus–oocyte complexes. *SpringerPlus*, 6 dez. 2013. v.2, n.1, p.206. Disponível em: <<https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-206>>.

Knight PG, Glistler C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, ago. 2006. v.132, n.2, p.191–206. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/132/2/1320191.xml>>.

Low LA et al. Organs-on-chips: into the next decade. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10 maio. 2021. v.20, n.5, p.345–361. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41573-020-0079-3>>.

Ludwig N, Whiteside TL, Reichert TE. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 set. 2019. v.20, n.19, p.4684. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/19/4684>>.

Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 9 dez. 2015. v. 22, n.2, p.182–193. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmv055>>.

Martinez RM et al. Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes. *Scientific Reports*, 19 dez. 2018. v. 8, n. 1, p. 17036. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-35379-3>>.

Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, fev. 2016. v.48, p.1–12. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300911>>.

Montfoort APA. Van et al. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Molecular Human Reproduction*, 18 jan. 2008. v.14, n.3, p.157–168. Disponível em: <<https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gam088>>.

Morohaku K. A way for in vitro/ex vivo egg production in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 2019. v.65, n.4, p.281–287. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/65/4/65_2019-024/_article>.

Motta PM et al. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Human Reproduction*, 1 jul. 2000. v.15, n.suppl 2, p.129–147. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/15.suppl_2.129>.

Nawroth J et al. Organ-on-a-Chip Systems for Women’s Health Applications. *Advanced Healthcare Materials*, jan. 2018. v.7, n.2, p.1700550. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.201700550>>.

Owens CE et al. Graduate Student Literature Review: Potential mechanisms of interaction between bacteria and the reproductive tract of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, nov. 2020. v.103, n.11, p. 10951–10960. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030220306494>>.

Padmanabhan V, Cardoso RC. Neuroendocrine, autocrine, and paracrine control of follicle-stimulating hormone secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, jan. 2020. v.500, p.110632. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030372071930334X>>.



- Pelzer ES et al.** Microorganisms within human follicular fluid: effects on IVF. *PloS one*, 2013. v.8, n.3, p.e59062. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554970>>.
- Reader K, Stanton JA, Juengel J.** The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. *Biology*, 18 set. 2017. v.6, n.4, p.35. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-7737/6/3/35>>.
- Reynaud K, Driancourt M.** Oocyte attrition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, maio. 2000. v.163, n.1–2, p.101–108. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720799002464>>.
- Rodrigues TA et al.** Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019. v.31, n.5, p.888–897.
- Rosa C et al.** Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, ago. 2018. v.53, n.4, p.921–929. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.13189>>.
- Salary A et al.** Detection of bacteria in bovine ovarian follicular fluid. *Letters in Applied Microbiology*, 16 mar. 2020. v.70, n.3, p.137–142. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13254>>.
- Santonocito M et al.** Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertility and Sterility*, dez. 2014. v.102, n.6, p.1751–1761.e1. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028214020640>>.
- Sarma UC, Findlay JK, Hutt KJ.** Oocytes from stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, fev. 2019. v.55, p.14–22. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693418301482>>.
- Scaramuzzi RJ et al.** Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011. v.23, n.3, p.444. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD09161>>.
- Sequeira RC et al.** Microfluidic Systems for Assisted Reproductive Technologies: Advantages and Potential Applications. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 2020. v.17, n.6, p.787–800. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33237567>>.
- Sheldon I.** Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 1 jun. 2002. v.123, n.6, p.837–845. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/doi/10.1530/reprod/123.6.837>>.
- Silveira, Juliano C. DA et al.** Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle. *Biology of Reproduction*, 1 mar. 2012. v.86, n.3. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.111.093252>>.
- _____. et al. Involvement of miRNAs and Cell-Secreted Vesicles in Mammalian Ovarian Antral Follicle Development. *Reproductive Sciences*, 2 dez. 2015. v.22, n.12, p.1474–1483. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1933719115574344>>.
- Sirard MA. et al.** Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, jan. 2006. v.65, n.1, p.126–136. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X05004103>>.
- Sluss PM, Fletcher PW, Reichert LE.** Inhibition of 125I-Human Follicle-Stimulating Hormone Binding to Receptor by a Low Molecular Weight Fraction of Bovine Follicular Fluid: Inhibitor Concentration is Related to Biochemical Parameters of Follicular Development. *Biology of Reproduction*, 1 dez. 1983. v.29, n.5, p.1105–1113. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod29.5.1105>>.
- _____. ; **Reichert LE.** Presence of Bacteria in Porcine Follicular Fluid and Their Ability to Generate an Inhibitor of Follicle-Stimulating Hormone Binding to Receptor. *Biology of Reproduction*, 1 set. 1983. v.29, n.2, p.335–341. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod29.2.335>>.
- Sluss, Patrick M et al.** Estradiol and progesterone production by cultured granulosa cells cryopreserved from in vitro fertilization patients. *European Journal of Endocrinology*, mar. 1994. v.130, n.3, p.259–264. Disponível em: <https://ej.e.bioscientifica.com/view/journals/eje/130/3/eje_130_3_010.xml>.
- Smitz J, Cortvrindt R.** The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*, 1 fev. 2002. p.185–202. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/123/2/185.xml>>.
- Sohel MMH et al.** Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS ONE*, 4 nov. 2013. v.8, n.11, p. e78505.



Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078505>>.

Spikings EC, Alderson J, John JC. St. Regulated Mitochondrial DNA Replication During Oocyte Maturation Is Essential for Successful Porcine Embryonic Development. *Biology of Reproduction*, 1 fev. 2007. v.76, n.2, p.327–335. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/2629752/Regulated>>.

Tannetta D. et al. Extracellular vesicles and reproduction–promotion of successful pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology*, 23 nov. 2014. v.11, n.6, p.548–563. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cmi201442>>.

Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genetics*, 23 dez. 2008. v.40, n.12, p.1484–1488. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng.258>>.

Wassarman PM, Josefowicz WJ. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*, maio. 1978. v.156, n.2, p. 09–235. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmor.1051560206>>.

Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence1. *Journal of Animal Science*, 1 mar. 2007. v.85, n.13, p.E1–E3. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/85/suppl_13/E1/4775300>.

Weng L. IVF-on-a-Chip: Recent Advances in Microfluidics Technology for In Vitro Fertilization. *Slas Technology: Translating Life Sciences Innovation*, 30 ago. 2019. v.24, n.4, p.373–385. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2472630319851765>>.

Williams EJ et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, set. 2007. v.68, n.4, p.549–559. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07002142>>.

Young RE, Huh DD. Organ-on-a-chip technology for the study of the female reproductive system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, jun. 2021. v.173, p.461–478. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X21000843>>.

Yu EJ, Lyu SW. Cumulus and granulosa cell biomarkers: a good predictor for successful oocyte and embryo developmental competence in human in vitro fertilization. *Journal of Genetic Medicine*, 30 jun. 2021. v.18, n.1, p.1–7. Disponível em: <<http://www.e-kjgm.org/journal/view.html?doi=10.5734/JGM.2021.18.1.1>>.
