

AVANÇOS NA TECNOLOGIA DO OVÁRIO ARTIFICIAL EM RUMINANTES

(*Advances in artificial ovary technology in ruminants*)

Renato Felix SILVA* ; Laritza Ferreira LIMA; José Ricardo FIGUEIREDO

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus do Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.741-000. *E-mail: jrf.lamofopapapers@gmail.com

RESUMO

O cultivo *in vitro* de folículos (CIVF), também conhecido como Ovário Artificial, representa uma excelente ferramenta para aumentar nossa compreensão a respeito do controle da foliculogênese inicial, que é crucial para otimizar o uso futuro de um grande número de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (FPs) (principal reserva ovariana) em técnicas de reprodução assistida em humanos, bem como em outras espécies de mamíferos, incluindo os ruminantes. Até o momento, os melhores resultados de CIVF foram relatados em camundongos com a produção de crias vivas a partir de folículos primordiais cultivados *in vitro*. No entanto, em outras espécies como os ruminantes, esses resultados têm se limitado à produção de um número variável de oócitos maduros e baixas porcentagens de embriões após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais secundários tardios isolados de ovários de cabras, búfalas e ovelhas. A presente revisão apresenta e discute os principais achados, limitações e perspectivas da foliculogênese *in vitro* em ruminantes com foco nas espécies bovinas, caprinas e ovinas.

Palavras-chaves: foliculogênese, cultivo *in vitro*, Técnicas de reprodução assistida

ABSTRACT

The *in vitro* follicle culture (IVFC), also known as artificial ovary, represents an outstanding tool to increase our understanding of the control of early folliculogenesis which is crucial to optimize the future use of a large, number of immature oocytes enclosed in preantral follicles (PFs) (main ovarian reserve) in assisted reproductive techniques in humans as well as in others mammalian species including the ruminants. To date, the best results of IVFC were reported from mice with the production of live offspring from primordial follicles cultured *in vitro*. However, in other ruminant species, these results have been limited to the production of a variable number of mature oocytes and low percentages of embryos after *in vitro* culture of goat, buffalo and sheep isolated late secondary preantral follicles. The present review presents and discusses the main findings, limitations, and prospects of *in vitro* folliculogenesis in ruminants focusing on bovine, caprine, and ovine species.

Key words: Folliculogenesis, *in vitro* culture, assisted reproductive technologies.

INTRODUÇÃO

Entre os principais produtores de carne do mundo, o Brasil se destaca pela produção pecuária de pequenos e grandes ruminantes, sendo um dos principais exportadores de carne para diversos continentes (LOPES *et al.*, 2018). Para que a produção animal seja mantida dentro dos níveis esperados, aspectos como a nutrição e reprodução são fatores cruciais. Em relação à reprodução, a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação dos gametas, bem como seu

desenvolvimento são de suma importância para melhorar o uso das técnicas de reprodução assistida-TRAs (SMITH *et al.*, 2014).

Atualmente, a utilização de TRAs é de grande importância tanto para pesquisa básica, por meio da compreensão da fisiologia reprodutiva (SMITH *et al.*, 2014), quanto para pesquisa aplicada, por meio de melhorias nos tratamentos para problemas de infertilidade, bem como a multiplicação de animais de alto valor zootécnico (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Dentre essas TRAs em desenvolvimento, pode-se destacar a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) ou ovário artificial. Essa biotécnica visa a recuperação de um grande número de oócitos contidos nos folículos ovarianos, para posterior cultivo *in vitro* até sua completa maturação, aumentando, assim, o número de oócitos fertilizáveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

O desenvolvimento folicular *in vivo* é um processo complexo e dinâmico regulado pela interação de diversos fatores intra e extra-ovarianos, que resultam na diferenciação das células somáticas associadas (granulosa e teca), no crescimento e maturação do oócito (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). *In vitro*, ainda não existe um sistema de cultivo que assegure de forma eficiente o desenvolvimento folicular, principalmente, em relação a animais domésticos de grande porte, como os ruminantes. A partir do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais iniciais, em ruminantes, os resultados têm se limitado a produção de uma baixa porcentagem de embriões a partir do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais secundários de cabras, búfalos e ovelhas (SILVA *et al.*, 2016). Portanto, esta revisão abordará as principais descobertas, limitações, e as perspectivas da tecnologia do ovário artificial em ruminantes com foco nas principais espécies domésticas: bovinas, caprinas e ovinas.

DESENVOLVIMENTO

Aspectos gerais da foliculogênese *in vivo*

A foliculogênese é o processo fisiológico que compreende as etapas de formação, ativação, crescimento, maturação folicular, finalizando com ovulação do oócito maduro. A regulação da foliculogênese envolve uma interação complexa entre fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Esses fatores regulam processos como a esteroidogênese, angiogênese, remodelamento da membrana, atresia folicular, crescimento do oócito e maturação, bem como a proliferação e diferenciação das células foliculares (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Os fatores reguladores ligam-se a diferentes tipos de receptores, ativando diferentes vias de sinalização, podendo compartilhar os mesmos receptores. Além disso, existem interações complexas entre as vias de sinalização celular que por sua vez controlam a expressão gênica, determinando a sobrevivência ou morte celular, quiescência ou proliferação. Desta forma, eventos como a maturação folicular ou atresia irá depender de um delicado equilíbrio entre fatores estimulatórios e inibitórios (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

O ovário mamífero contém de milhares a milhões de folículos, sendo aproximadamente noventa por cento representados pelos folículos pré-antrais, que incluem os folículos primordiais,

transição, primários e secundários. A foliculogênese na fase pré-antral compreende três etapas: (i) a ativação de folículos primordiais (passagem do folículo primordial quiescente para os estágios de folículos de transição e primário); (ii) desenvolvimento de folículos primários e secundários; (iii) transição do folículo pré-antral para o antral. Estudos afirmam que o crescimento dos folículos primordiais até o estágio antral inicial é independente de gonadotrofinas, sendo controlada por mecanismos autócrinos e parácrinos (FIGUEIREDO *et al.* 2019). Compreender os fatores envolvidos durante a foliculogênese inicial é essencial para a utilização de oócitos oriundos da grande reserva ovariana em TRAs. Entre essas tecnologias, será destacada nesta revisão a biotécnica do ovário artificial.

Cultivo folicular *in vitro* ou ovário artificial: objetivos, aplicações e tipos de cultivos

De maneira geral, a aplicação do ovário artificial, envolve o resgate dos folículos dos ovários antes que eles se tornem atresícos, e posteriormente cultivá-los *in vitro* até a sua completa maturação. Desta forma, essa biotécnica pode ser bastante utilizada na pesquisa básica (elucidação da foliculogênese na fase pré-antral), em testes toxicológicos reprodutivos e na complementação de biotécnicas reprodutivas como a PIV e a clonagem por transferência nuclear. Além disso, ela pode auxiliar nos tratamentos de infertilidade, criação de bancos de gametas (animais em vias de extinção ou geneticamente superiores) e preservação da fertilidade em indivíduos que passaram por procedimentos de quimioterapia (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

O cultivo *in vitro* pode ser avaliado por diferentes parâmetros, buscando melhorar a sua eficiência e compreensão dos mecanismos da foliculogênese. Dentre eles podemos destacar a avaliação da sobrevivência (morfologia e viabilidade), ativação de folículos primordiais, crescimento folicular e oocitário, formação de antro, expressão de RNAs para fatores-chaves da foliculogênese, produção hormonal, maturação oocitária (nuclear e citoplasmática), produção embrionária e de crias saudáveis (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

Os folículos pré-antrais (FP) podem ser cultivados de duas maneiras: inclusos no tecido ovariano (*in situ*) ou na forma isolada. No cultivo *in situ* realiza-se o cultivo do ovário inteiro (murinos) ou somente de pequenos fragmentos de córtex ovariano. Já no cultivo de folículos isolados pode ser realizado diretamente na placa de cultivo ou sobre uma matriz extracelular (MEC – caracterizando o sistema bidimensional - 2D) ou inclusos nessa MEC (caracterizando o sistema tridimensional - 3D). Também pode ser realizado o cultivo em dois passos, onde os folículos são cultivados *in situ*, permitindo a ativação e o desenvolvimento do folículo primordial até o estágio secundário, para posteriormente ser isolado e cultivado até o estágio antral (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

Estado atual da tecnologia do ovário artificial

Grandes progressos já foram realizados com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em espécies animais. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos a partir de estudos *in vitro* com o cultivo de folículos pré-antrais de fêmeas de camundongos, os quais demonstraram que é possível a obtenção de crias vivas a partir de oócitos oriundos de folículos primordiais cultivados *in vitro* (O'BRIEN *et al.*, 2003). Já em caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010), ovinos

(ARUNAKUMARI *et al.*, 2010), bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008), suínos (WU *et al.*, 2007) e primatas não-humanos (XU *et al.*, 2009), o cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros, os quais foram fecundados *in vitro*, gerando embriões. Por outro lado, em humanos (MCLAUGHLIN *et al.*, 2018), FP foram cultivados *in vitro*, se desenvolveram e produziram oócitos em estágio de MII. Nas espécies bovina (GUTIERREZ *et al.*, 2000) e canina (SERAFIM *et al.*, 2010), FP isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram somente até o estágio antral.

Principais resultados relativos ao cultivo *in vitro* com ênfase em ruminantes

Bovinos

Na espécie bovina, os melhores resultados após o cultivo de folículos primordiais foi a formação de antro oriunda do cultivo em dois passos (folículos primordiais e intermediários cultivados *in situ* e posteriormente folículos secundários isolados cultivados na presença da ativina A) (MCLAUGHLIN e TELFER, 2010).

Com o cultivo *in situ* de FPs, a adição de fatores como, fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), ou fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF) em um meio contendo FSH, melhorou o efeito benéfico do FSH, no que diz respeito a morfologia, ativação e crescimento folicular (diâmetro do folículo de ~ 25µm em D0 a ~ 90µm em D22 de cultivo) (TANG *et al.*, 2012). A adição de Proteína morfogenética óssea (BMP) 2 (ROSSI *et al.*, 2016) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - YANG e FORTUNE, 2007) aumentou o número de folículos secundários após o cultivo *in vitro*.

No cultivo de folículos isolados, Rossetto *et al.* (2012) relataram maior crescimento folicular, viabilidade e formação de antro (60%), ao usar o meio TCM199 em comparação com α -MEM e McCoy, sendo os meios utilizados com o mesma suplementação e regime de troca, ou seja, metade do meio (75µl) foi trocado a cada 4 dias. Além disso, têm sido demonstrado que a utilização de diferentes suplementos, quando adicionado sozinhos, podem exercer um efeito positivo no crescimento folicular e/ou formação de antro de folículos secundários isolados, como: FSH, proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) (PASSOS *et al.*, 2013), insulina (ROSSETTO *et al.*, 2016) e ácido alfa lipóico (ALA) (ZOHEIR *et al.*, 2017). Recentemente, Antonino *et al.* (2019) realizaram um cultivo 3D de folículos secundários isolados utilizando nanopartículas (compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina), resultando em melhorias na viabilidade, crescimento, formação de antro em relação ao tratamento 2D, produzindo, inclusive, oócitos capazes de retomarem a meiose.

Ovinos

A espécie ovina, até o presente momento, é a que vem obtendo os melhores resultados no CFIV entre as três principais espécies domésticas ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos). Foram relatados a produção de taxas relativamente altas de oócitos em metafase II (MII) (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010; BARBONI *et al.*, 2011) e um baixo número de embriões na fase de mórula após fertilização *in vitro* (FIV) ou ativação partenogenética de folículos secundários

isolados cultivados *in vitro* (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010; BARBONI *et al.*, 2011; LUZ *et al.*, 2013).

A partir do estudo com folículos primordiais e primários inclusos em tecido ovariano já é possível identificar alguns fatores que podem promover a ativação folicular, como por exemplo, alguns membros da super família do fator de crescimento transformante β (TGF- β) (KNIGHT e GLISTER, 2006) No entanto, a adição de BMP4 durante o cultivo de fragmentos do córtex ovariano não afetaram a ativação, mas aumentou a sobrevivência e o crescimento folicular (BERTOLDO *et al.*, 2014). O cultivo *in situ* nessa espécie também foi utilizado para o teste de substâncias como amônia, ureia, ácidos graxos não esterificados e ácido β -hidroxibutírico (NANDI *et al.*, 2017), extrato de planta (*Amburana cearensce* – MENEZES *et al.*, 2018), substâncias homeopáticas (LIMA *et al.*, 2016) bem como as micotoxinas (SILVA *et al.*, 2019). Neste ultimo, a utilização de zearalenona (1 μ mol / L) aumentou a taxa de degeneração folicular, reduzindo a proliferação e aumentando a apoptose após cultivo de 3 dias, mas associação com o equol (fitoestrógeno produto da microbiota- 1 μ mol / L) atenuou todos os efeitos negativos observados.

Utilizando o cultivo de folículos isolados, várias substâncias e/ou sistemas de cultivo têm sido testados principalmente em folículos secundários isolados (>200 μ m), com sucesso como por exemplo; rutina (LINS *et al.*, 2017), Kaempferol (SANTOS *et al.*, 2019), bem como o meio condicionado produzido a partir de células tronco mesenquimais (BEZERRA *et al.*, 2019). Barboni *et al.* (2011) também produziu oócitos competentes de FPs (170 μ m) cultivados por 12 dias em α -MEM contendo soro fetal de bovino (FCS) e FSH, embora após FIV apenas 10% dos embriões resultantes atingiram o estágio de 16 células. Curiosamente, oócitos oriundos do cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais (FAs) 360 μ m (diâmetro final do folículo no final do cultivo) apresentaram padrão de metilação e capacidade de desenvolvimento semelhante aos crescidos *in vivo* (FAs com o mesmo diâmetro). No entanto, oócitos de FAs iniciais cultivados *in vivo* e *in vitro* (360 μ m) apresentaram baixa competência em comparação com oócitos de FAs crescidos *in vivo* (6mm) (BARBONI *et al.*, 2011).

Caprinos

Em relação as espécies abordadas no presente trabalho, a espécie caprina foi a mais estudada em relação à foliculogênese *in vitro* nos últimos anos. Apesar disso, os melhores resultados são a produção de alguns embriões de 2 a 16 células, a partir de folículos secundários cultivados *in vitro* na forma isolada, (SARAIVA *et al.*, 2010), e apenas uma mórula após FIV (MAGALHÃES *et al.*, 2011), bem como uma prenhez oriunda do cultivo de folículos antrais iniciais (SÁ *et al.*, 2020). As taxas de maturação e produção de embriões ainda são baixas quando comparadas com oócitos crescidos *in vivo*. Buscando compreender e melhorar as condições para o sucesso CFIV em cabras, diversas substâncias e/ou sistemas de cultivo já foram testados em folículos de diferentes estágios de desenvolvimento.

No sistema de cultivo *in situ*, vários autores relataram a estimulação da ativação e crescimento folicular e oocitario após cultivo de longo prazo (16 dias) na presença de fator de crescimento de fibroblastos-10 (FGF-10) durante a segunda metade (D8-D16) do período de

cultivo (ALMEIDA *et al.*, 2015); bem como, FSH e IGF-I ao longo de todo o período de cultivo, aumentando a porcentagem de folículos secundários (28%) (MAGALHAES-PADILHA *et al.*, 2012). Outras substâncias adicionadas por um período de cultivo mais curto (6 a 7 dias) também mostraram exercer um efeito positivo sobre ativação, sobrevivência e crescimento folicular, tais como: a interação entre EGF (LOPES *et al.*, 2015); KL (FAUSTINO *et al.*, 2013); e Concavalina A (Con A) (PORTELA *et al.*, 2014). Vieira *et al.* (2020) observaram que o isolamento do folículo primordial do tecido ovariano e sua inclusão em uma matriz extracelular, o alginato, aumentou a ativação do folicular e os diâmetros do folículo e do oócito após cultivo.

Quando folículos secundários isolados (~ 200µm) foram cultivados na presença de concentrações crescentes de FSH (100ng/ml D0-D6; 500ng/ml D6-D12; 1000ng/ml D12-D18) sozinho (SARAIVA *et al.*, 2011) foi observada uma melhora nas taxas de crescimento. A adição de FSH sozinho em concentrações crescente e de maneira sequencial, ocasionou na retomada da meiose (oócito em RVG-ruptura da vesícula germinal) (SARAIVA *et al.*, 2011) ou quando associado com IGF-I (MAGALHÃES-PADILHA *et al.*, 2012b), enquanto um baixo número de oócitos foram capazes de atingir o estágio de MII quando FSH sequencial foi combinado com: insulina (CHAVES *et al.*, 2012), IGF-II (DUARTE *et al.*, 2013), LH e EGF (SARAIVA *et al.*, 2010), GH (MAGALHÃES *et al.*, 2011), e VEGF (SILVA *et al.*, 2014). Além disso, quando alguns desses oócitos em MII foram fertilizados, ocasionou no desenvolvimento de embriões de 8 células (SILVA *et al.*, 2014), embrião de 16 células (SARAIVA *et al.*, 2010), e mórula (MAGALHÃES *et al.*, 2011). Recentemente, a utilização de anetol (300µg/mL) associada ao GH durante o cultivo de folículos antrais iniciais (~ 350µm), melhorou a produção de embriões (por exemplo, mórulas e blastocistos) produzidos por partenogênese ou fertilização *in vitro*, bem como prenhez após transferência embrionária.

Embora estejam presentes em quase todos os meios de CFIV, muita discussão tem sido gerada em relação a combinação e a concentração de insulina e de FSH (DIPAZ- BERROCAL *et al.*, 2017; PAES *et al.*, 2018). Foi sugerido que 10ng/ml de insulina, uma concentração mais baixa do que a da composição do ITS (insulina, transferina e selênio), pode ser mais eficiente em promover a retomada da meiose na presença de FSH sequencial (CHAVES *et al.*, 2012). No entanto, já foi observado que na presença de GH ou VEGF, uma alta concentração de insulina (10µg/mL) combinado com FSH 100ng/mL fixo, em vez de FSH sequencial, pode melhorar a competência oocitária (FERREIRA *et al.*, 2016), bem como, estimular a formação de antro na presença de fitohemaglutinina (PHA) (CUNHA *et al.*, 2013). Por outro lado, Ferreira *et al.* (2018) não relataram resultados positivos quando a insulina (10 µg/ml) foi associada ao FSH em concentração fixa. Este fato pode ser explicado devido à fonte de FSH, sendo que Ferreira *et al.* (2018) utilizaram FSH humano recombinante enquanto a maioria dos estudos utilizou FSH bovino recombinante. Por outro lado, o FSH humano fixo na concentração de 10 mIU/mL melhorou as taxas de retomada da meiose quando comparado ao FSH sequencial bovino (ROCHA *et al.*, 2014).

Estudos também já demonstraram que o efeito de qualquer suplemento pode depender da categoria folicular, uma vez que FPs e FAs se comportaram de maneira diferente sob as mesmas condições de cultivo (CADENAS *et al.*, 2017). O FSH humano, por exemplo, aumentou

os diâmetros do folículo e do oócitos de FAs (~ 350µm), mas não afetou os FPs (FERREIRA *et al.*, 2018).

Além da composição do meio de cultivo, muitos outros fatores podem afetar o desenvolvimento de folículos isolados no estágio inicial, como a idade reprodutiva do doador de ovário (pré-púbere vs. adulto), período de cultivo, meio de base e sistema de cultivo utilizado (2D vs. 3D). Assim, FPs oriundos de cabras pré-púberes atingiram o estágio antral, enquanto que, FPs de cabras adultas, não foram capazes de produzir oócitos em MII após 18 dias de CFIV (SILVA *et al.*, 2014) independentemente do sistema de cultivo, ou seja, 2D vs 0,5% de alginato (3D) (SILVA *et al.*, 2014). No entanto, Brito *et al.* (2014) relataram um efeito positivo de uma menor rigidez da matriz (0,25% de alginato) sobre crescimento do folículo e retomada da meiose quando comparado com 0,5% de alginato e sistema 2D. Em relação ao tempo de cultivo, 18 dias vem sendo o tempo mais utilizado para folículos secundários avançados (SILVA *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016), no entanto, respostas positivas podem ser encontradas para esta categoria folicular durante um período de cultivo estendido (30 a 36 dias) (PESSOA *et al.*, 2014), enquanto 18 dias pode ser mais adequado para o cultivo de FAs (CADENAS *et al.*, 2018).

Apesar do progresso obtido na espécie caprina, com a maturação oocitaria, as taxas de produção de embriões ainda são muito baixas em comparação com oócitos oriundos de folículos crescidos *in vivo*, o que deve servir de encorajamento para novas pesquisas sobre este tópico. Em geral, os dados demonstrados parecem apontar para a necessidade do desenvolvimento de meios de cultivo customizados para CFIV, pois como foi demonstrado existem diferenças entre as taxas de crescimento, e entre as categorias foliculares, afetando a maturação do oócito *in vitro* (CADENAS *et al.*, 2018).

O futuro do CFIV: possíveis estratégias para superar as limitações atuais

Para a utilização futura do CFIV na reprodução assistida em humanos e animais, algumas limitações precisam ser superadas. Por exemplo, a produção *in vitro* de oócitos fertilizáveis oriundos de folículos primordiais requer um cultivo de longo prazo, o que pode afetar a qualidade do oócito e, conseqüentemente, a produção de embriões. Mais estudos devem ser realizados em ruminantes para melhorar as técnicas de cultivo *in vitro*. Já foi demonstrado que o CFIV de ovinos produz oócitos maduros com epigenética nuclear normal (BARBONI *et al.*, 2011). Este estudo foi realizado com folículos secundários, entretanto, quando foi realizado cultivo *in vitro* com folículos primordiais de ratos, foi observada deficiências transcricionais e epigenéticos (WANG *et al.*, 2017). É importante ressaltar que o tempo de CFIV de folículos murinos é mais curto do que em grandes mamíferos, aumentando ainda mais a necessidade de novos estudos em nível de metilação. Já foi demonstrado que a apoptose em oócitos murinos é mediada pela atividade retrotransposon (MALKI *et al.*, 2014), e a supressão desta atividade é determinado pela modificação epigenética do DNA (FINDLAY *et al.*, 2015). Desta forma, métodos para minimizar os riscos epigenéticos, bem como evitá-los durante a CFIV são necessários. Além disso, diversos trabalhos utilizam folículos pré-antrais para criopreservação e posterior cultivo *in vitro*. É bem conhecido que o estresse causado durante a exposição aos agentes crioprotetores e o próprio processo de resfriamento, afetam organelas importantes como o

retículo endoplasmático (BRITO *et al.*, 2013), fazendo necessário a utilização de meios de cultivo com antioxidantes (SÁ *et al.*, 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle da sobrevivência, ativação e o desenvolvimento de FPs de ruminantes *in vitro* é extremamente complexo e envolve diversas interações entre fatores extra e intra-ovarianos e podem ser influenciados pelo tipo de meio base, regime de troca de meio, tipo de sistema de cultivo (2D vs 3D), duração do cultivo, fonte ovariana (animais pré-púbere vs adulto), componentes da matriz extracelular e categorias foliculares (pré-antrais vs antrais iniciais). Além disso, estes fatores não agem de forma isolada, eles interagem entre si e tornam ainda mais desafiador o desenvolvimento de protocolos CFIV. Resultados encorajadores foram relatados incluindo taxas satisfatórias de sobrevivência folicular, ativação, formação de antro, bem como a produção de oócitos meioticamente competentes, especialmente em espécies caprinas e ovinas. No entanto, a produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos cultivados *in vitro* ainda é baixa. Portanto, melhorias no sistema de cultivo folicular *in vitro* deve ser realizado para melhorar a qualidade dos oócitos (competência de desenvolvimento do oócito) para aumentar a produção de descendentes viáveis. Este fato permitirá a utilização de um grande número de oócitos imaturos, oriundos de FPs, em tecnologias de reprodução assistida em humanos, bem como em outras espécies de mamíferos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.P.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ARAÚJO, V.R.; COSTA, S.L.; CHAVES, R.N.; LOPES, C.A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C.C.; JUNIOR, J.B.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on *in vitro* development of goat preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.152, n.4, p.32-38, 2015.
- ANTONINO, D.C.; SOARES, M.M.; JÚNIOR, J.M.; ALVARENGA, P.B.; MOHALLEM, R.F.F.; ROCHA, C.D.; VIEIRA, L.A.; SOUZA, A.G.; BELETTI, M.E.; ALVES, B.G.; JACOMINI, J.O.; GOULART, L.R.; ALVES, K.A. Three-dimensional levitation culture improves *in-vitro* growth of secondary follicles in bovine model. *Reproductive BioMedicine Online*, v.38, n.3, p.300-311, 2019.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v.74, n.5, p.884-894, 2010.
- BARBONI, B.; RUSSO, V.; CECCONI, S.; CURINI, V.; COLOSIMO, A.; GAROFALO, M.L.A.; CAPACCHIETTI, G.; DI GIACINTO, O.; MATTIOLI, M. *In vitro* grown sheep

preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. PLoS One, v.6, n.3, p.27550, 2011.

BERTOLDO, M.J.; DUFFARD, N.; BERNARD, J.; FRAPSAUCE, C.; CALAIS, L.; RICO, C.; MERMILLOD, P.; LOCATELLI, Y. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. Animal Reproduction Science, v.149, n.6, p.124-134, 2014.

BEZERRA, M.E.S.; MONTE, A.P.O.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.G.; OLIVEIRA JUNIOR, J.L.; SANTOS, J.M.S.; BEZERRA, D.O.; NEVES, C.A.; SILVA, G.C.; CARVALHO, M.A.M.; MATOS, M.H.T. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term *in vitro* culture. Theriogenology, v.125, n.8, p.56-63, 2019.

BRITO, D.C.; BRITO, A.B.; SCALERCIO, S.R.; PERCARIO, S.; MIRANDA, M.S.; ROCHA, R.M.; DIZNIZ, J.A.; OSKAM, I.C.; VAN DEN HURK, R.; PARIS, M.C.; DOMINGUES, S.F.S.; SANTOS, R.R. Vitamin E-analog trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajusapella*). Cell and Tissue Research, v.355, n.2, p.471-480, 2013.

BRITO, I.R.; SILVA, C.M.G.; DUARTE, A.B.G.; LIMA, I.M.T.; RODRIGUES, G.Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A.D.; LOBO, C.H.; BERNUCI, M.P.; ROSA-E-SILVA, A.C.J.S.; CAMPELLO, C.C.; XU, M.; FIGUEIREDO, J.R. Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. Molecular Reproduction and Development, v.81, n.1, p.636-645, 2014.

CADENAS, J.; MASIDE, C.; FERREIRA, A.C.A.; VIEIRA, L.A.; LEIVA-REVILLA, J.; PAES, V.M.; ALVES, B.G.; BRANDÃO, F.Z.; RODRIGUES, A.P.R.; WHEELER, M.B.; FIGUEIREDO, J.R. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during *in vitro* culture as a non-invasive sign of caprine oocyte meiotic competence. Theriogenology, v.107, p.95-103, 2018.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; RODRIGUES, G.Q.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; LOPES, C.A.P.; ALMEIDA, A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MOURA, A.A.A.; LOBO, C.H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The effects of insulin and follicle-stimulating hormone (FSH) during *in vitro* development of ovarian goat preantral follicles and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. Biology of Reproduction, v.87, n.2, p.69-80, 2012.

CORREIA, H.H.V.; LIMA, LF, SOUSA, F.G.C.; FERREIRA, A.C.A.; CADENAS, J.; PAES, V.M.; ALVES, B.G.; SHIKANOV, A.; FIGUEIREDO, J.R. Activation of goat primordial follicles *in vitro*: Influence of alginate and ovarian tissue. Reproduction in Domestic Animals, v.1, p.105-109, 2020.

DIPAZ-BERROCAL, D.J.; SA, N.; GUERREIRO, D.; CELESTINO, J.J.H.; LEIVA-REVILLA, J.; ALVES, K.A.; SANTOS, R.R.; CIBIN, F.W.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Refining insulin concentrations in culture medium containing growth factors BMP15 and GDF9: An *in vitro* study of the effects on follicle development of goats. *Animal Reproduction Science*, v.185, n.3, p.118-127, 2017.

DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; SILVA, G.M.; LUZ, V.B.; HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ALMEIDA, A.P.; LOBO, C.H.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Insulin like growth factor II (IGF-II) and follicle stimulating hormone (FSH) combinations can improve the *in vitro* development of grown oocytes enclosed in caprine preantral follicles. *Growth Hormone & IGF Research*, v.23, n.2, p.37-44, 2013.

FAUSTINO, L.R.; LIMA, I.M.T.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LOBO, C.H.; LUCCI, C.M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kit ligand on the goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Ruminant Research*, v.114, n.2, p.112-119, 2013.

FERREIRA, A.C.A.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO, D.D.; VIEIRA, H.H.C.; LEIVA-REVILLA, J.; LOBO, C.H.; MASIDE, C.; ARAÚJO, V.R.; APGAR, G.A.; BRANDÃO, F.Z.; FIGUEIREDO, J.R.; CAMPELLO, C.C. Balance of insulin and FSH concentrations improves the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. *Animal Reproduction Science*, v.165, n.2, p.1-10, 2016.

FERREIRA, A.C.C.; CADENAS, J.; SÁ, N.A.R.; CORREIA, H.H.V.; GUERREIRO, D.D.; LOBO, C.H.; ALVES, B.G.; MASIDE, C.; GASTAL, E.L.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration dependent and stage-specific effect. *Animal Reproduction Science*, v.196, n.7, p.120-129, 2018.

FIGUEIREDO, J.R.; CADENAS, J.; LIMA, L.F.; SANTOS, R.R. Advances in *in vitro* folliculogenesis in domestic ruminants. *Animal Reproduction*, v.16, n.1, p.52-65, 2019.

FINDLAY, J.K.; HUTT, K.J.; HICKEY, M.; ANDERSON, R.A. How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biology of Reproduction*, v.93, n.5, p.1-7, 2015.

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, n.1, p.57-63, 2008.

GUTIERREZ, C.C.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antral formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.62, n.5, p.1322-1328, 2000.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v.132, n.6, p.191-206, 2006.

LIMA, I.M.T.; CELESTINO, J.J.H.; FAUSTINO, L.R.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ROSSETTO, R.; BRITO, I.R.; DONATO, M.A.M.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; PEIXOTO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Dynamic Medium Containing Kit Ligand and Follicle-Stimulating Hormone Promotes Follicular Survival, Activation, and Growth during Long-Term *in vitro* Culture of Caprine Preantral Follicles. *Cells Tissues Organs*, v.195, n.7, p.260-271, 2012.

LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.; DUARTE, A.B.; BRITO, I.R.; SILVA, G.M.; RODRIGUES, G.Q.; NUNES-PINHEIRO, D.C.; SALES, A.D.; MOURA, A.A.; WHEELER, M.B.; RODRIGUES, A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Unexpected effect of the vehicle (grain ethanol) of homeopathic FSH on the *in vitro* survival and development of isolated ovine preantral follicles. *Microscopy Research and Technique*, v.80, n.9, p.406-418. 2016.

LINS, T.L.B.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARROS, V.R.P.; BARBERINO, R.S.; BEZERRA, M.E.S.; MACEDO, T.J.S.; MATOS, M.H.T. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology*, v.89, n.9, p.263-270, 2017.

LOPES, T.A.; COSTA, J.J.N.; RIBEIRO, R.P.; PASSOS, J.R.S.; SOARES, M.A.A.; FILHO, J.G.A.; CUNHA, E.V.; VAN DEN HURK, R.; PINHEIRO, A.A.; SILVA, J.R.V. Influence of caprine arthritis encephalitis on expression of ovulation related genes and activation of primordial follicles cultured in presence of phytohemagglutinin, epidermal growth factor or both. *Small Ruminant Research*, v.123, n.8, p.278-286, 2015.

LOPES, L.B.; PITTA, R.M.; ECKSTEIN, C.; PEDREIRA, B.C. Biodiversidade de coleópteros associados à produção de bovinos em sistema silvipastoril e em sistema de pastejo convencional na região norte de Mato Grosso, Brasil. 2ª ed., Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop, MT, 2018. 6p.

LUZ, V.B.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, G.M.; CHAVES, R.N.; BRITO, I.R.; SERAFIM, M.K.B.; CAMPELLO, C.C.; FELTRIN, C.; BERTOLINI, M.; ALMEIDA, A.P.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Kit ligand and insulin-like growth factor I affect the *in vitro* development of ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v.115, n.3, p.99-102, 2013.

MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOARES, T.G.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v.75, n.4, p.182-188, 2011.

MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ANDRADE, P.M.; SALES, E.T.; ARAUJO, V.R.; LIMA, I.M.T.; CASTRO, S.V.; FAUSTINO, L.R.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; BÁO, S.N.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of sequential medium on *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue. *Animal Reproduction Science*, v.132, n.1, p.159-168, 2012a.

MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; SARAIVA, M.V.A.; ALMEIDA, A.P.; RODRIGUES, G.Q.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.;

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Theriogenology*, v.77, n.5, p.206-213, 2012b.

MALKI, S.; VAN DER HEIJDEN, G.W.; O'DONNELL, K.A.; MARTIN, S.L.; BORTVIN, A. A role for retrotransposon LINE-1 in fetal oocyte attrition in mice. *Developmental Cell*, v.29, n.9, p.521-533, 2014.

MCLAUGHLIN, M.; ALBERTINI, D.F.; WALLACE, W.H.B.; ANDERSON, R.A.; TELFER, E.E. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Molecular Human Reproduction*, v.24, 7.3, p.135-142, 2018.

MCLAUGHLIN, M.; TELFER, E.E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Reproduction*, v.139, n.2, p.971-978, 2010.

MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; GOUVEIA, B.B.; GONÇALVES, R.J.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MATOS, M.H.T. Extract of *Amburana cearensis* maintains the survival of ovine preantral follicles during long-term ovarian tissue transport and promotes primordial follicle activation after *in vitro* culture. *Ciências Agrárias*, v.39, n.5, p.2001-2016, 2018.

NANDI, S.; TRIPATHI, S.K.; GUPTA, P.S.P.; MONDAL, S. Effect of metabolic stressors on survival and growth of *in vitro* cultured ovine preantral follicles and enclosed oocytes. *Theriogenology*, v.104, n.4, p.80-86, 2017.

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, v.8, n.5, p.1682-1686, 2003.

PAES, V.M.; VIEIRA, L.S.; CADENAS, J.; CORREIA, H.H.V.; SA, N.; ALVES, B.G.; BRANDAO, F.; SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Goat *in vitro* follicular response to insulin concentration is affected by base medium and follicular stage. *Small Ruminant Research*, v.169, n.9, p.62-66, 2018.

PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; SILVA, A.W.B.; BRITO, I.R.; SARAIVA, M.V.A.; MAGALHÃES, D.M.; COSTA, J.J.N.; DONATO, M.A.M.; RIBEIRO, R.P.; CUNHA, E.V.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Accelerated growth of bovine preantral follicles *in vitro* after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. *Theriogenology*, v.79, n.1, p.1269-1277, 2013.

PESSOA, A.F.C.; ROCHA, R.M.P.; BRITO, I.R.; SILVA, G.M.; CHAVES, R.N.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of morphological integrity, period, and type of culture system on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. *Theriogenology*, v.82, n.1, p.312-317, 2014.

PORTELA, A.M.L.R.; RIBEIRO, R.P.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, J.R.S.; VASCONCELOS, G.L.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, M.V.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Effects of different concentrations of concavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. *Small Ruminant Research*, v.116, n.2, p.183-191, 2014.

ROCHA, R.M.; ALVES AMCV, LIMA, LF, DUARTE ABG, CHAVES RN, BRITO IR, COSTA EC, BERNUCI MP, ROSAE-SILVA AC, XU M, RODRIGUES AP, CAMPELLO CC, FIGUEIREDO JR. Is the mouse follicle culture a good model for the goat with respect to the development of preantral follicles *in vitro*? *Domestic Animal Endocrinology*, v.49, n.3, p.27-30, 2014.

ROSSETTO, R.; SARAIVA, M.; SANTOS, R.; SILVA, C.; FAUSTINO, L.; CHAVES, R.; BRITO, I.; RODRIGUES, G.; LIMA, I.; DONATO, M.; PEIXOTO, C.; FIGUEIREDO, J. Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, v.21, n.2, p.125-128, 2012.

ROSSETTO, R.; SARAIVA, M.V.A.; BERNUCI, M.P.; SILVA, G.M.; BRITO, I.R.; ALVES, A.M.C.V.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; BÃO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Impact of insulin concentration and mode of FSH addition on the *in vitro* survival and development of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.86, n.6, p.1137-1145, 2016.

ROSSI, R.O.; CUNHA, E.V.; PORTELA, A.M.; PASSOS, J.R.; COSTA, J.J.; SILVA, A.W.; SARAIVA, M.V.; PEIXOTO, C.A.; DONATO, M.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R. Influence of BMP-2 on early follicular development and mRNA expression of oocyte specific genes in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Histology and Histopathology*, v.3, n.9, p.339-348, 2016.

SÁ, N.A.R.; FERREIRA, A.C.A.; SOUSA, F.G.C.; DUARTE, A.B.G.; PAES, V.M.; CADENAS, J.; ANJOS, J.C.; FERNANDES, C.C.L.; ROSSETO, R.; CIBIN, F.W.S.; ALVES, B.G.; RODRIGUES, A.P. R.; RONDINA, D.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. First pregnancy after *in vitro* culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, v.1, n.4, p.1-12, 2020.

SANTOS, J.M.S.; MONTE, A.P.O.; LINS, T.L.B.G.; BARBERINO, R.S.; MENEZES, V.G.; GOUVEIA, B.B.; MACEDO, T.J.S.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.L.; DONFACK, N.J.; MATOS, M.H.T. Kaempferol can be used as the single antioxidant in the *in vitro* culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Theriogenology*, v.136, n.3, p.86-94, 2019.

SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; ALMEIDA, A.P.; BRUNO, J.B.; MAGALHAES, D.M.; MATOS, M.H.T.;

CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reproductive Sciences*, v.17, n.8, p.1135-1143, 2010.

SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; ALMEIDA, A.P.; LIMA-VERDE, I.B.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, G.M.; MARTINS, F.S.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. 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.5, p.205-214, 2011.

SERAFIM, M.K.; ARAUJO, V.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.; ALMEIDA, A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; LOPES, C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, v.74, n.5, p.749-755, 2010.

SILVA, G.M.; ROSSETTO, R.; CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; FELTRIN, C.; BERNUCI, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; XU, M.; WOODRUFF, T.K.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in twodimensional or three-dimensional systems. *Zygote*, v.26, n.3, p.1-10, 2014.

SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v.55, n.2, p.123-135, 2016.

SILVA, T.E.S.; BRITO, D.C.C.; SÁ, N.A.R.; SILVA, R.F.; FERREIRA, A.C.A.; SILVA, J.Y.G.; GUEDES, M.I.F.; RODRIGUES, A.P.R.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Equol: A Microbiota Metabolite Able to Alleviate the Negative Effects of Zearalenone during *In vitro* Culture of Ovine Preantral Follicles. *Toxins (Basel)*, v.11, n.2, p.652-661, 2019.

SMITH, P.; WILHELM, D.; RODGERS, R.J. Development of mammalian ovary. *Journal of Endocrinology*, v.221, n.3, p.145-161, 2014.

TANG, K.; YANG, W.; LIX, W.U.C.J.; SANG, L.; YANG, L. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. *Animal Reproduction Science*, v.131, n.4, p.129-134, 2012.

WANG, J.J.; GE, W.; LIU, J.C.; KLINGER, F.G.; DYCE, P.W.; DE FELICI, M.; SHEN, W. Complete *in vitro* oogenesis: retrospects and prospects. *Cell Death & Differentiation*, v.24, n.7, p.1845-1852, 2017.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*, v.15, n.3, p.233-240, 2007.

XU, M.; WEST-FARRELL, E.R.; STOUFFER, R.L.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K.; ZELINSKI, M.B. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biology of Reproduction*, v.81, n.4, p.587-594, 2009.

Ciência Animal, v.30, n.4, p.98-112, 2020. Supl. 2 (X CONERA)

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. Molecular, Reproduction and Development, v.74, n.2, p.1095-1104, 2007.

ZOHEIR, K.A.; H ARISA, G.I.A.; LLAM, A.A.; YANG. L.; LIX LIANG, A.; ABD-RABOU, A.A.; HARRATH, A.H. Effect of alpha lipoic acid on *in vitro* development of bovine secondary preantral follicles. Theriogenology, v.88, n.1, p.124-130, 2017.