









Aquisição da dependência de gonadotrofinas pelos folículos antrais iniciais e os desafios para promover o seu crescimento *in vitro*

Acquisition of gonadotropin dependence by early antral follicles and the challenges to promote their growth *in vitro*

Efigênia Cordeiro Barbalho¹ , Danisvânia Ripardo Nascimento¹ , Laryssa Gondim Barrozo¹ , Laís Raiane Feitosa Melo Paulino¹ , Ernando Igo Teixeira de Assis¹ , José Roberto Viana Silva^{1*} 

¹Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, Ceará, Brasil.

*autor correspondente: jrvsilva@ufc.br

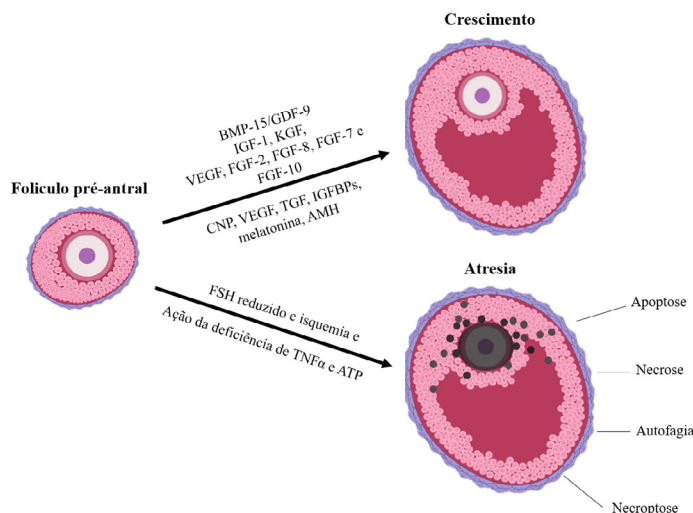
Resumo: Esta revisão tem como objetivo discutir os principais fatores envolvidos no desenvolvimento de folículos antrais iniciais até a dependência de gonadotrofinas. Essa fase folicular é caracterizada por intensa proliferação de células da granulosa, formação de uma cavidade preenchida por líquido, diferenciação morfológica das células do *cumulus*, células da granulosa murais e recrutamento de células da teca. A interação entre oócito, células da granulosa e da teca é determinante para o crescimento folicular e produção hormonal. Fatores de crescimento produzidos pelo oócito, fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) e proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15), regulam a proliferação e diferenciação de células da granulosa, e o desenvolvimento da cavidade antral, bem como estimulam a produção de receptores do hormônio folículo estimulante (FSH) nas células da granulosa. Em resposta ao FSH, as células da granulosa secretam o peptídeo natriurético tipo C (CNP), que atua através de seu receptor para aumentar a produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e conseqüentemente o desenvolvimento folicular. As células da granulosa também produzem o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e aumentam a atividade da enzima aromatase, o que resulta em maior sensibilidade às gonadotrofinas e esteroidogênese folicular. A ausência de sinalização do IGF-1 causa cessação do crescimento folicular no início do estágio antral. Muitos outros fatores locais estão envolvidos na regulação do desenvolvimento folicular. Por tanto essa revisão traz dados relevantes para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no controle do crescimento de folículos antrais iniciais, enfatizando o papel dos fatores endócrinos e parácrinos, a interação oócito-células da granulosa e os processos de atresia folicular. Os desafios para o estabelecimento de sistemas de cultivo eficientes para o crescimento *in vitro* de folículos antrais iniciais também são discutidos.

Palavras-chave: Oócito; células da granulosa; células da teca; gonadotrofinas; células do *cumulus*; foliculogênese

Recebido: 17 de abril, 2023. Aceito: 05 de setembro, 2023. Publicado: 08 de janeiro, 2024.

Abstract: This review aims to discuss the main factors involved in the development of early antral follicles until gonadotropin dependence. This follicular phase is characterized by intense proliferation of granulosa cells, formation of a fluid-filled cavity, morphological differentiation of cumulus cells, mural granulosa cells and recruitment of theca cells. The interaction between oocyte, granulosa and theca cells is crucial for follicular growth and hormone production. Growth factors produced by the oocyte, such as growth and differentiation factor-9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), regulate granulosa cell proliferation and differentiation and antral cavity development, as well as stimulate the production of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in granulosa cells. In response to FSH, granulosa cells secrete C-type natriuretic peptide (CNP), which acts through its receptor to increase cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production and consequently follicular development. Granulosa cells also produce insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and increase aromatase enzyme activity, which results in greater sensitivity to gonadotropins and follicular steroidogenesis. The absence of IGF-1 signaling causes cessation of follicular growth at the early antral stage. Many other local factors are involved in the regulation of follicular development. Therefore, this review brings relevant data for a better understanding of the mechanisms involved in the control of early antral follicle growth, emphasizing the role of endocrine and paracrine factors, the oocyte-granulosa cell interaction and the processes of follicular atresia. The challenges for the establishment of efficient culture systems for *in vitro* growth of early antral follicles are also discussed.

Keywords: Oocyte; granulosa cells; theca cells; gonadotropins; cumulus cells; folliculogenesis



1. Introdução

A competência oocitária se refere à capacidade do gameta feminino atingir a maturação, ser fertilizado e sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto ⁽¹⁾. De acordo com Dode *et al.* ⁽²⁾, esta competência é adquirida gradualmente durante o crescimento folicular pré-antral e antral inicial. Para reforçar esta informação, oócitos de

folículos antrais de 3,0 mm são capazes de completar a maturação nuclear *in vitro*, enquanto aqueles de folículos menores (1,0 e 2,0 mm) apresentam competência reduzida⁽³⁻⁴⁾. Essa não competência dos oócitos de pequenos folículos antrais se deve à redução da expressão de genes que ativam vias de sinalização para aumentar a capacidade do oócito de responder ao aumento das gonadotrofinas⁽⁵⁾. A capacidade de resposta às gonadotrofinas permite que os folículos cresçam até a seleção e dominância⁽⁶⁻⁷⁾.

No curso do desenvolvimento folicular, a proliferação e diferenciação morfológica das células da granulosa são de grande importância para preparar o folículo para responder às gonadotrofinas e para criar um ambiente favorável ao desenvolvimento do oócito⁽⁸⁾. As células da granulosa produzem vários fatores autócrinos e parácrinos que podem estar envolvidos no crescimento do oócito e na formação do antro⁽⁹⁾. Além disso, os fatores derivados do oócito estimulam a expressão dos receptores do hormônio folículo estimulante (FSHR) nas células da granulosa, para permitir que elas se tornem responsivas às gonadotrofinas⁽¹⁰⁾. O hormônio folículo estimulante (FSH) induz a proliferação e viabilidade do complexo oócito-cúmulos-granulosa e também pode induzir a diferenciação das células da granulosa⁽¹¹⁾. Além disso, fatores derivados de oócitos também estimulam a formação da cavidade antral, aumentando a expressão de proteoglicanos, como resultado da interação com o FSH⁽⁹⁾. Assim, a compreensão dos mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos que controlam a interação entre as células foliculares e o oócito em folículos antrais iniciais favorece o desenvolvimento de estratégias para promover o seu desenvolvimento *in vitro*⁽¹²⁾.

A presente revisão fornece uma visão geral dos principais fatores que controlam o desenvolvimento de folículos antrais iniciais até a dependência de gonadotrofinas, ou seja, regulação da proliferação de células da granulosa, esteroidogênese, atresia, interação entre oócitos e células da granulosa, bem como as estratégias para promover o desenvolvimento de folículos antrais precoces *in vitro*.

2. Controle endócrino do desenvolvimento do folículo antral inicial

O desenvolvimento folicular desde o estágio pré-antral até o estágio antral inicial é controlado principalmente por reguladores intraovarianos, mas pode ser estimulado pelo FSH. Os receptores específicos para FSH são expressos nas células da granulosa dos folículos secundários e antrais iniciais⁽¹³⁾. Quando os folículos secundários são formados, as células da granulosa expressam FSHR e as células da teca expressam o receptor do hormônio luteinizante (LHR)⁽¹⁴⁾. Nas espécies domésticas e humanas, a formação do antro é observada quando os folículos têm cerca de 0,2mm⁽¹⁵⁾ e tornam-se dependentes de gonadotrofina quando atingem 3,0mm na vaca⁽¹⁶⁾, 4,0mm na ovelha⁽¹⁷⁾, 3,0mm na cabra⁽¹⁸⁾ e 5,0 mm em humanos⁽¹⁹⁾. O crescimento e maturação folicular além deste estágio, que inclui recrutamento, seleção, dominância e ovulação, é dependente de gonadotrofinas⁽²⁰⁻²¹⁾. A aquisição da dependência de FSH durante este intervalo de crescimento é crucial para determinar o destino folicular, isto é, crescimento ou atresia. O peptídeo natriurético tipo C (CNP) é secretado pelas células da granulosa dos folículos secundários e antrais em resposta à estimulação do FSH. O CNP atua através do seu receptor (NPRB) expresso nas células da granulosa dos folículos secundários e aumenta a produção

de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) para estimular o desenvolvimento folicular⁽³³⁾. Análises de expressão gênica indicaram aumentos nos transcritos para receptores CNP (NPP e NPRB) durante a foliculogênese inicial em camundongos, em associação com aumentos nos peptídeos CNP ovarianos⁽³³⁾ (Figura 1).

O fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), ambos secretados pelo oócito, promovem a proliferação de células da granulosa e o recrutamento de células da teca, eventos necessários para a transição dos folículos do estágio primário ao secundário⁽³⁴⁾. Fatores produzidos pelos folículos secundários, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante (TGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de fibroblastos 2 e -7 (FGF-2 e FGF-7), BMPs e a ativina são necessárias para a sobrevivência e desenvolvimento folicular adicional. Na fase antral, os peptídeos sintetizados localmente desempenham um papel fundamental na regulação do desenvolvimento folicular, através de mecanismos endócrinos e parácrinos^(17, 35). Dentre esses peptídeos, aqueles do sistema IGF, incluindo IGF-1, IGF-2 e as proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) e alguns membros da família FGF, como FGF-2, FGF-7 (ou KGF), FGF- 8 e FGF-10⁽³⁵⁻³⁶⁾, parecem ser críticos para o desenvolvimento folicular em estágio avançado (Figura 1).

Fushii *et al.*⁽²²⁾ mostraram recentemente que complexos cumulus-oócitos (CCOs) cultivados com FSH apresentam formação de cavidade antral um dia antes daqueles que não receberam esse hormônio, mostrando a importância do FSH no desenvolvimento folicular. Reguladores intraovarianos, IGF, ativina, fatores derivados de oócitos e proteínas das junções comunicantes desempenham um papel central na aquisição da dependência de FSH no estágio antral inicial do desenvolvimento folicular⁽¹³⁾. Os andrógenos derivados da teca ligam-se aos receptores de andrógenos (ARs) nas células da granulosa⁽²³⁾, induzindo assim a expressão de FSHR e o crescimento folicular durante a transição pré-antral para antral^(14, 24-25). A deficiência de AR no ovário de camundongos induz a apoptose das células da granulosa, interrompe o crescimento do folículo antral e resulta em falência ovariana prematura⁽²⁶⁻²⁸⁾. Assim, os andrógenos desempenham um papel importante no crescimento, sobrevivência e aquisição da dependência de FSH nos folículos antrais iniciais⁽¹³⁾ (Figura 1).

O hormônio anti-Mülleriano (AMH) é um produto das células da granulosa a partir de pequenos folículos antrais que tem papel inibitório ou retardador no desenvolvimento dos folículos antrais. O AMH reduz a sensibilidade folicular ao FSH, diminuindo a expressão do FSHR. Inibe o recrutamento cíclico dependente de FSH e parece desempenhar um papel em todo o crescimento folicular independente de gonadotrofinas. Apesar de existir uma relação regulatória entre andrógenos e AMH, não é possível garantir que seus efeitos sejam mediados pelo estradiol, via aromatização da testosterona⁽²⁹⁾ (Figura 1).

A melatonina é encontrada no fluido folicular dos folículos antrais humanos e tem papéis importantes no controle do desenvolvimento folicular⁽³⁰⁾. Seus receptores foram previamente detectados em células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais⁽³¹⁾. Em relação aos efeitos da melatonina, Barros *et al.*⁽³²⁾ demonstraram que esse hormônio está associado à competência meiótica de oócitos de folículos antrais iniciais. A melatonina mantém a

sobrevivência folicular, estimula a formação da cavidade antral e o subsequente crescimento folicular e oocitário, bem como aumenta os níveis de glutatona e de mitocôndrias metabolicamente ativas após cultura *in vitro* de folículos secundários de ovelhas ⁽³²⁾.

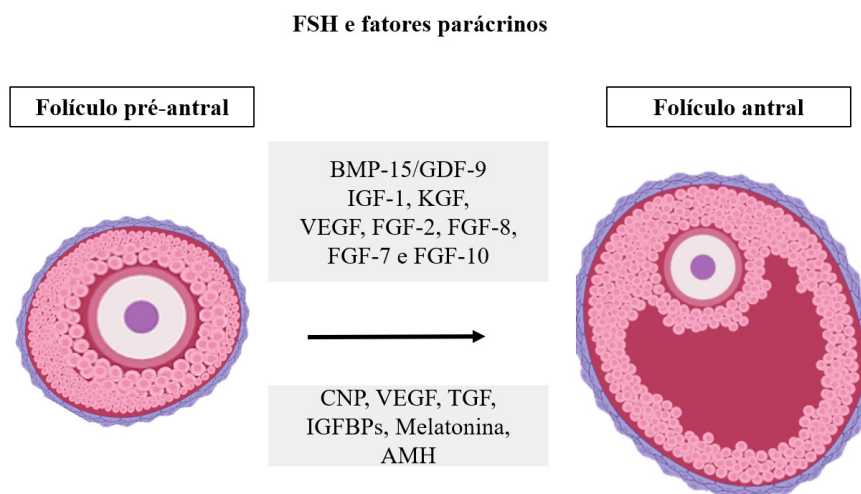


Figura 1. Fatores que regulam o desenvolvimento dos folículos pré-antrais até os estágios dependentes de gonadotrofinas.

3. Interação oócito-célula da granulosa durante o desenvolvimento de folículos antrais iniciais

É bem sabido que durante o desenvolvimento folicular; membros da família do fator de crescimento transformante beta (TGF β) e seus receptores estão envolvidos no controle do crescimento de oócitos e proliferação de células da granulosa. Membros da família TGF β derivados de oócitos, como GDF-9 e BMP-15, regulam a proliferação e diferenciação de células da granulosa, bem como o desenvolvimento da cavidade antral ⁽³³⁻³⁴⁾. Além disso, estudos recentes indicam que estes fatores regulam a expressão de RNAm para LHR em células do cumulus ⁽³⁵⁾. O GDF-9 derivado de oócitos promove o crescimento de complexos cumulus-oócitos (CCOs), enquanto a BMP-15 induz a expressão do RNAm do receptor de coriogonadotrofina (LHCGR) nas células do cumulus e a expressão do receptor de FSH nos folículos. Tais fatores contribuem para o desenvolvimento folicular e maturação oocitária ⁽³⁵⁻³⁶⁾. GDF-9 e BMP-15 ligam-se ao receptor BMP tipo II ⁽³⁷⁾ e recrutam quinases semelhantes a ativina do tipo 5 (ALK5) ⁽³⁸⁾ e 6 (ALK6) ⁽³⁹⁾ para, em seguida, regular proteínas SMAD em células da granulosa. Estudos indicam que o GDF-9 aumenta o crescimento e a diferenciação dos folículos pré-antrais em cultivo ⁽⁴⁰⁾ e promove a biossíntese e proliferação de andrógenos nas células da teca ⁽⁴¹⁾. Além desses fatores, a proteína R-espondina2 também é um importante fator parácrino que pode promover a proliferação de células da granulosa ⁽⁴²⁾. O FGF-2 e seus respectivos receptores também estão envolvidos no desenvolvimento inicial dos folículos antrais ^(36, 43-44). O FGF-2 sozinho ou em associação com VEGF-A influencia a esteroidogênese e a proliferação de células da granulosa de búfalos, regulando a expressão de RNAm do citocromo P450 19A1 (CYP19A1), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e proteína X associada a Bcl-2 (BAX) ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾

(Figura 2). Além disso, Mattar et al. ⁽⁴⁶⁾ relataram que o VEGF-A e o FGF-2 promovem a formação de redes de células endoteliais durante o cultivo in vitro de células da teca, tais estruturas apoiam o desenvolvimento folicular sucessivo até o estágio pré-ovulatório.

As células da granulosa desempenham um papel no desenvolvimento dos folículos antrais, promovendo o desenvolvimento do complexo oócito-células da granulosa e fornecendo trifosfato de adenosina (ATP) aos oócitos ⁽⁴⁸⁾. Além disso, Yang et al. ⁽⁴⁸⁾ demonstraram a influência do BMP-4, derivado de células da teca, na esteroidogênese em folículos antrais iniciais. O CNP também é um fator estimulante para folículos antrais iniciais ⁽³⁰⁾ (Figura 2). Em associação com as células da granulosa, as células da teca contribuem para a síntese da inibina α ; que é um hormônio que inibe a produção de FSH ⁽⁴⁹⁾. Yang et al. ⁽⁴⁸⁾ demonstraram a influência do BMP-4, proveniente das células da teca, na esteroidogênese e nos folículos antrais iniciais.

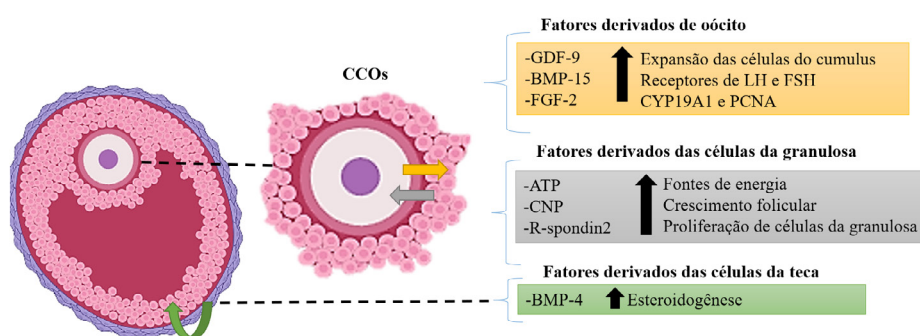


Figura 2. Interações oócito-células da granulosa durante o desenvolvimento inicial dos folículos antrais.

4. Controle da proliferação de células da granulosa e produção de estradiol durante o desenvolvimento de folículos antrais iniciais

Nos folículos antrais iniciais, as células da granulosa são altamente proliferativas, mas suscetíveis à apoptose. Os fatores secretados pelo oócito, como GDF-9 e BMP-15, regulam a proliferação e sobrevivência das células da granulosa ⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾. Além disso, a proliferação de células da granulosa depende da ciclina D2 para ativar os membros da família CDK2, CDK4 e CDK6 da quinase dependente de ciclina (CDK) ⁽⁵²⁾. Nos folículos em desenvolvimento, o FSH estimula a proliferação das células da granulosa e a aromatização de andrógenos em estrogênios. Os estrogênios também estimulam a proliferação das células da granulosa ⁽⁵³⁾. Um aumento no estradiol está associado a um aumento na expressão de genes para aromatase, 3 β -HSD e receptores para FSH e LH nas células da granulosa (Figura 2) ⁽⁵⁴⁾.

O neuropeptídeo neuronal Y (NPY) está fortemente presente nas células da granulosa e a abundância de mRNA para o NPY é maior nos folículos antrais iniciais do que nos folículos antrais tardios. Além disso, o NPY aumenta a proliferação de células da granulosa através do receptor NPY Y5 (NPY5R) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) ⁽⁵⁵⁾. Baddela et al. ⁽⁵⁶⁾ relataram que, nas células da granulosa, o fator 1 indutível por hipóxia (HIF1) regula transcricionalmente genes associados à esteroidogênese, como proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B) e CYP19A1) e proliferação (CCND2 e PCNA). O início da expressão do mRNA do StAR ocorre em folículos antrais iniciais

de 1,0 mm de diâmetro ⁽⁵⁷⁾. Além disso, FSH e LH, juntamente com citocinas intraovarianas, induzem a expressão de enzimas esteroidogênicas em células da granulosa, incluindo StAR, CYP11a1, 3 β HSD e CYP19a1, como mostra a Figura 3 ⁽⁵⁸⁾. A expressão de RNAm para LHR é encontrada em células da granulosa de folículos menores que 5 mm ⁽⁵⁹⁾.

O potencial esteroidogênico folicular envolve uma série extensa e altamente coordenada de estágios de desenvolvimento. Durante esse processo, após intensa proliferação das células da granulosa e da teca (até 100 vezes), elas se diferenciam em células endócrinas especializadas. Os esteroides ovarianos são sintetizados pela cooperação dessas células. As células da teca sintetizam andrógenos através da atividade enzimática do citocromo P450 17A1 (CYP17A1) ⁽⁵³⁾. Folículos maiores que 2 mm de diâmetro expressaram fortemente mRNAs de LH-R e CYP17A1 na maioria das células da teca ⁽⁵⁵⁾. Os andrógenos são então convertidos em estrogênios pela aromatase (CYP19) produzida pelas células da granulosa. Além disso, a progesterona é produzida pelas células da granulosa e utilizada pelas células da teca para sintetizar andrógenos ⁽⁶⁰⁾. StAR, CYP11a1 e CYP19a1 são as principais enzimas no processo de síntese hormonal ⁽⁶¹⁾ (Figura 3).

As células da granulosa expressam o receptor de estradiol, que contribui para o desenvolvimento folicular ⁽⁶²⁾. As atividades autócrinas e parácrinas do estradiol nas células da granulosa estimulam a atividade da enzima aromatase, aumentando a sensibilidade à gonadotrofina e a expressão do IGF-1 ⁽⁵⁹⁾. No ovário, o IGF-I estimula a esteroidogênese folicular e aumenta a produção de estradiol. A ausência de IGF-I resulta na interrupção do crescimento folicular na fase pré-antral/antral inicial, uma vez que estes folículos não respondem à gonadotrofina ⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾. Nas células da granulosa, o efeito estimulador do FSH no CYP19 e na proteína quinase B (AKT) depende do IGF-I e da expressão e ativação do IGF-IR ⁽⁶¹⁾. Além disso, o FSH induz a produção de estradiol através da sinalização dependente de FSHR-cAMP para induzir a transcrição do gene CYP19A1 ⁽⁷⁷⁾. Após o recrutamento folicular, as gonadotrofinas reduzem gradativamente a proliferação das células da granulosa e induzem sua diferenciação para produzir estradiol ⁽⁶⁸⁾ (Figura 3).

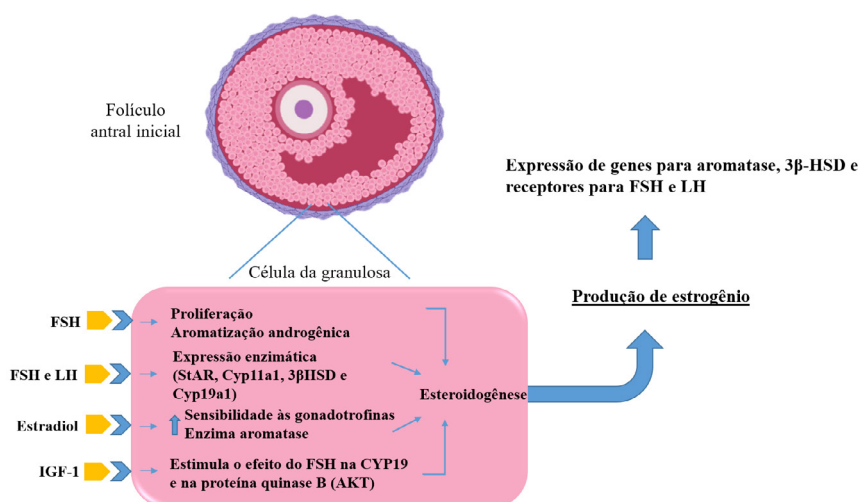


Figura 3. Influência do FSH, LH estradiol e IGF-I nas células da granulosa na promoção da proliferação e produção de enzimas envolvidas na esteroidogênese.

5. Atresia folicular durante o desenvolvimento de folículos antrais iniciais

Ao nascer, os ovários contêm milhares de folículos, mas apenas uma pequena proporção se desenvolve até a ovulação, enquanto a grande maioria (~99,9) é perdida por atresia. A atresia folicular não ocorre igualmente durante o desenvolvimento folicular, diferindo entre folículos pré-antrais e folículos antrais ⁽⁶⁸⁾. Spandel-Borowski *et al.* ⁽⁶⁹⁾ relataram dois tipos de padrões atrésicos em folículos ovarianos, nomeadamente o tipo A, no qual o oócito degenera enquanto as células da granulosa permanecem intactas, e o tipo B, no qual as células da granulosa mostram sinais de degeneração extensa enquanto o oócito permanece inicialmente não afetado. O tipo A é a forma predominante de atresia nos folículos pré-antrais ⁽⁷⁰⁾, enquanto nos folículos antrais tardios apenas se observa o tipo B, sendo a apoptose das células da granulosa na presença a principal característica da atresia em folículos antrais grandes ⁽⁶⁹⁾. Nos folículos antrais iniciais, as primeiras alterações que indicam atresia ocorrem no oócito, como retração da cromatina nuclear e fragmentação do oócito, enquanto alterações nas células da granulosa nesses folículos são raramente encontradas ⁽⁷⁰⁾.

Quando o ambiente parácrino ou endócrino não é adequado para suportar o crescimento dos oócitos e/ou a proliferação e diferenciação de células foliculares, a atresia pode ocorrer através das vias de necrose, necroptose, autofagia e apoptose ⁽⁷¹⁾ (Figura 4). A via de necrose e necroptose apresentam características morfológicas semelhantes e são caracterizadas por aumento do volume celular, permeabilização e ruptura da membrana plasmática, que levam à morte celular ⁽⁷¹⁾. Geralmente, a necrose é iniciada por mecanismos não celulares, como isquemia, deficiência nos níveis de ATP e trauma, levando a danos celulares irreversíveis ⁽⁷¹⁾. A necroptose é iniciada pelo fator de necrose tumoral- α (TNF α) e operada através da proteína quinase-1 e 3, que interagem com seus receptores serina / treonina-proteína quinase 1 e quinase 3, respectivamente, bem como pelo domínio semelhante proteína de linhagem mista quinase (MLKL) ⁽⁷¹⁾. Zhou *et al.* ⁽⁷²⁾ mostraram que o processo de autofagia está envolvido com atresia em folículos secundários e antrais iniciais. A autofagia é uma forma evolutivamente conservada de processo intracelular que envolve proteínas e organelas danificadas para degradação e reciclagem (Figura 4).

Acredita-se que a apoptose das células da granulosa nos folículos antrais tardios seja desencadeada por níveis insuficientes de FSH ou número reduzido de receptores de FSH ⁽⁷³⁾. A ausência de LH e o declínio do FSH circulante fazem com que os folículos subordinados diminuam o seu crescimento e, eventualmente, resulta em atresia ⁽⁷⁴⁾. O FSH protege as células da granulosa do dano oxidativo e resgata as células da granulosa da apoptose. Acredita-se que o FSH resgate as células da granulosa dos folículos antrais da apoptose por meio da ativação da via de transdução do sinal fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)-AKT. A ativação da fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K)/Akt através da ligação do FSH ao seu receptor leva à fosforilação da subfamília box O dos fatores de transcrição forkhead (FOXO), que influencia, entre outros processos, a sobrevivência das células da granulosa ⁽⁷⁵⁾.

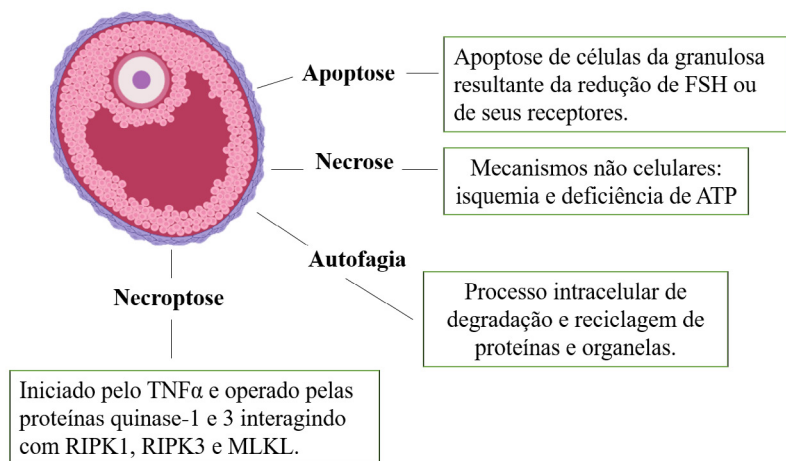


Figura 4. Mecanismos envolvidos na atresia em folículos antrais iniciais.

6. Estratégias para o desenvolvimento in vitro de folículos antrais iniciais

Vários estudos investigaram a relação entre o tamanho folicular e oocitário com a aquisição de competência de desenvolvimento oocitária in vitro, e muitos estudos concentraram-se no desenvolvimento de protocolos de cultivo que podem apoiar o desenvolvimento de oócitos a partir de folículos antrais iniciais (Figura 5). Harada et al. ⁽⁷⁶⁾ demonstraram pela primeira vez que oócitos de 90,0 a 99,0 μm de folículos antrais iniciais (0,5 a 0,7 mm) de bovinos podem crescer e adquirir competência de desenvolvimento in vitro, na presença de hipoxantina e FSH. Da mesma forma, Yamamoto et al. ⁽⁷⁷⁾ demonstraram que, além de serem capazes de crescer e adquirir competência de desenvolvimento in vitro, oócitos (90,0 a 99,0 μm) de pequenos folículos bovinos eram capazes de produzir descendentes após passarem por maturação, fertilização e posterior cultivo in vitro.

Ao cultivar folículos antrais isolados com diâmetro entre 0,2 e 0,5 mm, observou-se que, assim como os CCOs (0,4 e 0,7), os folículos também podem crescer durante o cultivo in vitro, e os oócitos atingem competência meiótica ⁽⁷⁸⁾. Na espécie caprina, além de obter melhora na maturação oocitária in vitro, foi relatada a produção de embriões a partir de oócitos provenientes de pequenos folículos antrais cultivados in vitro ⁽⁷⁹⁾. Cadenas et al. ⁽⁸⁰⁾ mostraram que folículos antrais iniciais de cabras cultivados em meio contendo insulina (10 ng/mL) associada ao hormônio do crescimento (50 ng/mL) são capazes de manter o crescimento e a maturação de oócitos in vitro em níveis semelhantes aos que cresceram in vivo. Da mesma forma, ao observar o efeito da estimulação do FSH humano recombinante (hrFSH) nos folículos antrais iniciais de cabra, o hrFSH melhorou o desenvolvimento do folículo antral de maneira dependente da concentração ⁽⁸¹⁾. Lopes et al. ⁽⁸²⁾ também demonstraram que folículos antrais iniciais isolados de estroma ovariano caprino são capazes de crescer e sobreviver in vitro por um curto período de tempo, após passarem por um processo de vitrificação. Em bovinos, recentemente Cordeiro et al. ⁽⁸³⁾ relataram que a presença de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultivo de folículos antrais iniciais reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mantém a integridade dos oócitos durante o cultivo.

O cultivo in vitro de CCO e folículos isolados garante a comunicação bidirecional entre oócitos e células da granulosa através de projeções transzonais (TZPs), o que é crucial para a

ocorrência de eventos moleculares necessários ao desenvolvimento folicular e oocitário até a ovulação. Tais eventos envolvem, além da separação cromossômica, a caracterização da maturação nuclear, envolvem também a distribuição de organelas citoplasmáticas, o estoque de RNAm, proteínas e outros fatores, que são cruciais para que o ovócito consiga retomar a meiose e apoiar a fertilização e o desenvolvimento embrionário ⁽⁸⁴⁾.

Alguns estudos já relataram o nascimento de bezerros vivos a partir de oócitos recuperados de folículos antrais iniciais, mas a viabilidade e a competência de desenvolvimento destes oócitos *in vitro* podem ser melhoradas ^(77, 85-86). Assim, nosso grupo de pesquisa tem se concentrado no desenvolvimento de protocolos de cultivo que favoreçam a aquisição de competência oocitária *in vitro*. Bezerra et al. ⁽⁸⁷⁾ demonstraram que hemisseções foliculares em associação com cilostamida apresentam efeito sinérgico na manutenção de oócitos na vesícula germinativa durante cultivo *in vitro*. Barrozo et al. ⁽⁸⁸⁾ mostraram que a presença desse NAC no meio de cultura aumenta a porcentagem de retomada meiótica e a distribuição de TZPs, bem como reduz os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), indicando que a inclusão de antioxidantes é importante para otimizar os sistemas de MIV. Este e outros autores ⁽⁸⁹⁾ sugeriram que o sistema de cultura bidimensional (2D) é mais adequado para culturas de oócitos de folículos antrais precoces com duração de até 4 dias, enquanto em períodos de cultura superiores a 4 dias, o sistema tridimensional (3D) é mais adequado.

A cultura de folículos antrais iniciais isolados também pode representar uma alternativa promissora para o fornecimento de oócitos competentes para utilização em protocolos de maturação *in vitro* ⁽⁹⁰⁾, uma vez que esta comunicação entre ovócitos e células da granulosa é mantida. Porém, a escolha do tamanho folicular é fundamental para a aquisição de competência no desenvolvimento oocitário. Já foi demonstrado que oócitos de folículos antrais iniciais (1 e 2mm) apresentam competência significativamente reduzida em comparação com oócitos de folículos antrais maiores (>3mm) ⁽³⁻⁴⁾. Bezerra et al. ⁽⁹⁰⁾ demonstraram que os níveis de RNAm para transcritos envolvidos no processo de desenvolvimento do oócito, como histona com ligante específico do oócito (H1FOO), GDF-9 e ribonuclease poli (a) específica (PARN), aumentam em oócitos quando os folículos crescem de folículos antrais secundários para pequenos, médios e grandes.

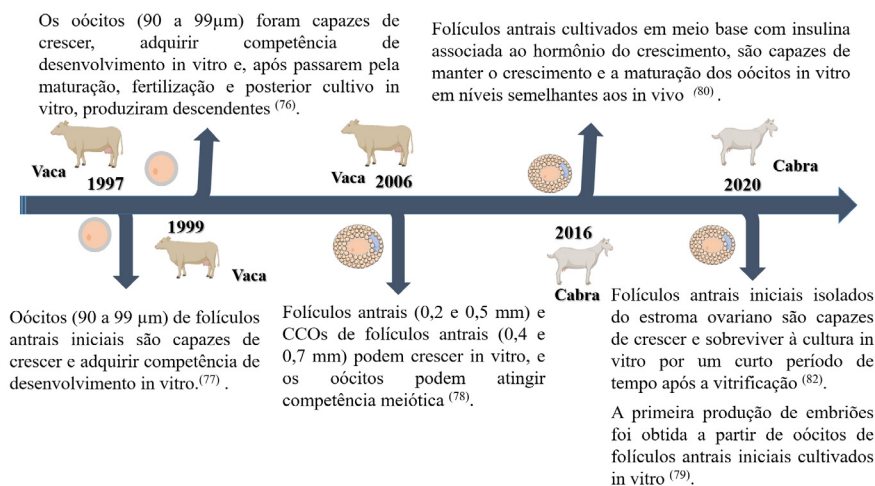


Figura 5. Representação esquemática dos principais avanços no cultivo *in vitro* de folículos antrais precoces.

7. Conclusões

O desenvolvimento de folículos antrais iniciais até a dependência de gonadotrofinas envolve uma ampla gama de processos, que podem ser decisivos para o crescimento folicular, esteroidogênese e aquisição de competência oocitária. A interação mútua entre oócitos e células foliculares influencia diretamente o destino folicular e do oócito. Além disso, o cultivo in vitro de folículos antrais iniciais abre novas perspectivas para utilização de seus oócitos para fertilização in vitro e proporciona uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no controle de folículos antrais iniciais.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: J.R.V. Silva. *Aquisição de financiamento:* J.R.V. Silva. *Administração do projeto:* J.R.V. Silva. *Supervisão:* J.R.V. Silva. *Redação (rascunho original):* E. C. Barbalho, D. R. Nascimento, L.G. Barrozo, L.R.F.M. Paulino e E. I. T. de Assis. *Redação (revisão e edição):* J.R.V. Silva.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo. J.R.V. Silva é pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (bolsa número 308737/2018-0).

Referências

1. Sirait B, Wiweko B, Jusuf AA, Iftitah D, Muharam R. Oocyte competence biomarkers associated with oocyte maturation: *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. 30(9): 710292. doi: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710292>
2. Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, Alves RGO. Effect of follicle size in nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes from zebu cows, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2000; 35: 207-214. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000000100023>
3. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 1992; 31: 63-67. doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310111>
4. Němcová L, Hulínska P, Ješeta M, Kempisty B, Kaňka J, Machatková M. Expression of selected mitochondrial genes during in vitro maturation of bovine oocytes related to their meiotic competence. *Theriogenology*. 2019; 133: 104-112. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.001>
5. Varmosfaderani SR, Hajian M, Jafarpour F, Zadegan FG, Nasr-Esfahani MH. Granulosa secreted factors improve the developmental competence of cumulus oocyte complexes from small antral follicles in sheep. *PloS one*. 2020; 15: e0229043. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229043>
6. Oliveira MEF, Ferreira RM, Mingoti GZ. Local and systemic control of bovine follicular growth and selection. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011; 35: 418-432. Disponível em: www.cbra.org.br
7. Silva JR, Figueiredo JR, Van Den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2009; 71(8):1193-208. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.01>
8. Baumgartem SC, Stocco C. Granulosa Cells. *Encyclopedia of Reproduction*. 2018; 2: 8-13. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64623-8>
9. Vasconcelos GL, Saraiva MVA, Costa JJN, Passos MJ, Silva AWB, Rossi RODS, et al. Effects of growth differentiation

factor-9 and FSH on in vitro development, viability and mRNA expression in bovine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*. 2012; 25: 1194-1203. doi: <http://dx.doi.org/10.1071/RD12173>

10. Kim JW, Kang KM, Yoon TK, Shim SH, Lee WS. Study of circulating hepcidin in association with iron excess, metabolic syndrome, and BMP-6 expression in granulosa cells in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2014;102(2):548-554.e2. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.031>

11. Sakaguchi K, Huang W, Yang Y, Yanagawa Y, Nagano M. Relationship between in vitro growth of bovine oocytes and steroidogenesis of granulosa cells cultured in medium supplemented with bone morphogenetic protein-4 and follicle stimulating hormone. *Theriogenology*. 2017; 97: 113-123. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.030>.

Paulino LRFM, de Assis EIT, Azevedo VAN, Silva BR, da Cunha EV, Silva JRV. Why Is It So Difficult To Have Competent Oocytes from In vitro Cultured Preantral Follicles? *Reproductive Sciences*. 2022; 29(12):3321-3334. doi: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00840-8>

13.Pangas SA, Rajkovic A. Matzuk MM. CHAPTER 10 - Follicular development: mouse, sheep, and human models. In: Jimmy D. Neill, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition), Academic Press, 2006, pages 383-423, ISBN 9780125154000.

14. Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*. 2009; 150: 2740-2748. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2008-1536>

15. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Human Reproduction*. 1986; 1: 81-87. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136365>

16. Campbell BK, Scaramuzzi RJ and Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal Reproduction Fertility, Supplement*, 1995; 49: 335-350. doi: <https://hdl.handle.net/102.100.100/231568?index=1>

17. Webb RB, Nicholas JG, Gong BK, Campbell CG, Gutierrez HA, Garverick DG. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction, Supplement*. 2003; 23: 123- 234. doi: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387450361202816>

18. Berlinguer F, Leoni GG, Succu S, Spezzigu A, Madeddu M and Satta V. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *Journal of Pineal Research*. 2009; 46: 383-391. doi <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00674.x>

19. Zeleznik AJ, Plant TM. Control of the Menstrual Cycle. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 2014: 1307-1362. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571136-4.50008-5>

20. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*.1997; 15: 201- 204. doi: <https://doi.org/10.1038/ng0297-201>

21. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Review*. 2000; 21: 200-214. doi: <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>

22. Fushimi Y, Takagi M, Monniaux D, Uno S, Kokushi E, Shinya U. Effects of dietary contamination by zearalenone and its metabolites on serum anti-Müllerian hormone: Impact on the reproductive performance of breeding cows. *Reproduction*. 2021; 50: 834-839. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12599>

23. Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *Journal of Endocrinology*. 1995; 145: 535-543. doi: <https://doi.org/10.1677/joe.0.1450535>

24. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101: 2622-2629. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI2081>

25. Wang H, Andoh K, Hagiwara H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology*. 2001; 142: 4930-4936. doi: <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8482>

26. Shiina H, Matsumoto T, Sato T. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103: 224-229. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0506736102>

27. Sen A, Hammes SR. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *Molecular Endocrinology*. 2010; 24: 1393-1403. doi: <https://doi.org/10.1210/me.2010-0006>
28. Walters KA, Middleton LJ, Joseph SR. Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility. *Molecular Biology Reports*. 2012; 87: 151. doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102012>
29. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*. 2016; 22: 709-724. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw027>
30. Khan H L, Bhatti S, KhanYL, Abbas S, Munir Z, Sherwani IAR et al. Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. *J. Gynecol. Obstet. Human Reproduction*. 2020; 49: (1), 101624. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2019.08.007>
31. Barros VRP, Cavalcante AYP, Macedo TJS, Barberino RS, Lins TLB, Gouveia BB et al. Immunolocalization of melatonin and follicle-stimulating hormone receptors in caprine ovaries and their effects during in vitro development of isolated pre-antral follicles. *Reproduction*. 2013; 48: 1025–1033. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12209>
32. Barros VRP, Monte APO, Santos JMS, Lins TLBG, Cavalcante, AYP, Gouveia, BB. Melatonin improves development, mitochondrial function and promotes the meiotic resumption of sheep oocytes from in vitro grown secondary follicles. *Theriogenology*. 2020; 144: 67-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.12.006>
33. Sato Y, Cheng Y, Kawamura K, Takae S, Hsueh AJ.. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. *Molecular endocrinology*.2012, 26(7), 1158-1166. doi: <https://doi.org/10.1210/me.2012-1027>
34. Alam Md, Hasanur JL, Takashi M. GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. *The Journal of Reproduction and development*. 2018; 64(5): 423-431. doi: <http://doi.org/10.1262/jrd.2018-078>
35. Reinen PS, Coria MS, Barrionuevo MG, Hernández O, Callejas S, Palma GA. Gene expression of growth factor BMP15, GDF9, FGF2 and their receptors in bovine follicular cells/Gene expression of growth factor BMP15, GDF9, FGF2 and their receptors in bovine follicular cells. *MVZ Córdoba*. 2018; 3(23): 6778-6787. doi: <http://doi.org/10.21897/rmvz.1367>.
36. Morikawa R, Jibak L, Takashi M. Effects of oocyte-derived growth factors on the growth of porcine oocytes and oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *The Journal of Reproduction and Development*. 2021; 67(4): 273-281. doi: <http://doi.org/10.1262/jrd.2021-026>
37. Ma X, Huashan Y. BMP15 regulates FSHR via TGF- β II receptor and SMAD4 signaling in the prepubertal ovary of Rongchang pigs. *Research in Veterinary Science*. 2022; 143: 66-73. doi: <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.013>
38. Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biology of reproduction*. 2002; 67: 473-480. doi: <http://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.473>
39. Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Korchynski O, et al. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *M Endocrinology* 2004;18.3: 653-665. doi: <http://doi.org/10.1210/me.2003-0393>
40. Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *A reproduction science* 2004; 82: 447-460. doi: <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.021>
41. Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141.10: 3814-3820. doi: <http://doi.org/10.1210/endo.141.10.7732>
42. Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Payne AH, Hsueh AJ. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses

to GDF9. *Biology of Reproduction* 2008;78.2: 243-253. doi: <http://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063446>

43. Cheng Y, Kawamura K, Taka S, Deguchi M, Yang Q, Kuo C, et. Oocyte-derived R-spondin2 promotes ovarian follicle development. *Jornal FASEB* 2013;27: 2175-2184. doi: <http://doi.org/10.1096/fj.12-223412>

44. Chang HM, Fang L, Cheng JC, Taylor EL, Sun YP, Leung PC. Effects of growth differentiation factor 8 on steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. *Fertility and sterility* 2016;105: 520-528. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.034>

45. Mishra SR, Thakur N, Somal A, Parmar MS, Reshma R, Rajesh G, et al. "Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family in buffalo ovarian follicle during different stages of development and modulatory role of FGF2 on steroidogenesis and survival of cultured buffalo granulosa cells. *Research in Veterinary Science* 2016; 108: 98-111. doi: <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.012>

46. Mattar D., Samir M., Laird M., Knight PG. Modulatory effects of TGF- β 1 and BMP6 on thecal angiogenesis and steroidogenesis in the bovine ovary. *Reproduction*. 2020;159(4), 397-408. doi: <https://doi.org/10.1530/REP-19-0311>

47. Sugiyama M, Sumiya M, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Addition of granulosa cell mass to the culture medium of oocytes derived from early antral follicles increases oocyte growth, ATP content, and acetylation of H4K12. *Zygote* 2016;24.6: 848-856. doi: <http://doi.org/10.1017/S0967199416000198>

48. Yang Y, Kanno C, Huang W, Kang SS, Yanagawa Y, Nagano M. Effect of bone morphogenetic protein-4 on in vitro growth, steroidogenesis and subsequent developmental competence of the oocyte-granulosa cell complex derived from bovine early antral follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2016; 14:1: 1-8. doi: <http://doi.org/10.1186/s12958-016-0137-1>

49. Laird, M., Glistler, C., Cheewasopit, W., Satchell, L. S., Bicknell, A. B., Knight, P. G. Free inhibin α subunit is expressed by bovine ovarian theca cells and its knockdown suppresses androgen production. *Scientific reports*, 2019. 9(1), 19793. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55829-w>

50. Sun T, Diaz FJ. Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. *Reproductive Biology Endocrinology*. 2019; 17(1):113. doi: <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0552-1>

51. McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, et al. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*. 2005; 129(4): 481-7. doi: <https://doi.org/10.1530/rep.1.0511>

52. Hoque SAM, Kawai T, Zhu Z, Shimada M. Mitochondrial protein turnover is critical for granulosa cell proliferation and differentiation in antral follicles. *Journal of the Endocrine Society*. 2018; 3(2): 324-339. doi: <https://doi.org/10.1210/js.2018-00329>

53. Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*. 2019; 19(1): 13-23. doi: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12292>

54. Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Mizutani T, Miyamoto K, Sato T, et al. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology*. 2013; 154(8): 2870-80. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2012-2173>

55. Urata Y, Salehi R, Lima PDA, Osuga Y, Tsang BK. Neuropeptide Y regulates proliferation and apoptosis in granulosa cells in a follicular stage-dependent manner. *Journal of Ovarian Research*. 2020; 13(1): 5. doi: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0608-z>

56. Baddela VS, Sharma A, Michaelis M, Vanselow J. HIF1 driven transcriptional activity regulates steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 3906. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60935-1>

57. Braw-Tal R, Roth Z. Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. *Reproduction*. 2005; 129(4): 453-61. doi: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00464>

58. Samie KA, Tabandeh MR, Afrough M. Betaine ameliorates impaired steroidogenesis and apoptosis in mice granulosa cells induced by high glucose concentration. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2020; 66(6): 400-409. doi: <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1811423>

59. Douville G, Sirard MA. Changes in granulosa cells gene expression associated with growth, plateau and atretic phases in medium bovine follicles. *Journal of Ovarian Research*. 2014; 7: 50. doi: <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-50>
60. Jeon MJ, Choi YS, Yoo JJ, Atala A, Jackson JD. Optimized culture system to maximize ovarian cell growth and functionality in vitro. *Cell Tissue Research*. 2021; 385(1): 161-171. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03415-w>
61. Wang N, Zhao F, Lin P, Zhang G, Tang K, Wang A, et al. Knockdown of XBP1 by RNAi in Mouse Granulosa Cells Promotes Apoptosis, Inhibits Cell Cycle, and Decreases Estradiol Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6): 1152. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18061152>
62. Kishi H, Kitahara Y, Imai F, Nakao K, Suwa H. Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. *Reproductive Medicine and Biology*. 2017; 17(1): 11-19. doi: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12075>
63. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biology of Redroduction*. 2001; 65(3): 638-47. doi: <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0332-3>
64. Rivera GM, Fortune JE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology*. 2003; 144(2): 437-46. doi: <https://doi.org/10.1210/en.2002-220657>
65. Zhou P, Baumgarten SC, Wu Y, Bennett J, Winston N, Hirshfeld-Cytron J, Stocco C. IGF-I signaling is essential for FSH stimulation of AKT and steroidogenic genes in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*. 2013; 27(3): 511-23. doi: <https://doi.org/10.1210/me.2012-1307>
66. Guan HY, Xia HX, Chen XY, Wang L, Tang ZJ, Zhang W. Toll-like receptor 4 inhibits estradiol secretion via NF- κ B signaling in human granulosa cells. *Frontiers in Endocrinology*. 2021; 12: 629554. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.629554>
67. Forrest KK, Flores VV, Gurule SC, Soto-Navarro S, Shuster CB, Gifford CA, et al. Effects of lipopolysaccharide on follicular estrogen production and developmental competence in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2022; 237: 106927. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106927>
68. Meng L, Jan SZ, Hamer G, van Pelt AM, van der Stelt I, Keijer J, Teerds KJ. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of Reproduction*. 2018; 1;99(4):853-863. doi: <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy116>
69. Spanel-Borowski K. Follicle stages and follicular atresia. In *Atlas of the Mammalian Ovary Morphological Dynamics and Potential Role of Innate Immunity*. Spanel-Borowski K, Germany, 2012, pp. 9-22. doi: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-30535-1>
70. Silva JR, Bao SN, Lucci CM, Carvalho FC, Andrade ER, Ferreira MA, Figueiredo JR. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. *Animal Reproduction Science*. 2001; 66(3-4):209-223. doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00102-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00102-6)
71. Pajokh M, Mesbah F, Bordbar H, Talaei-Khozani T. Different cell death types determination in juvenile mice ovarian follicles. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2018;19(4): 298-303. doi: <https://doi.org/10.21608/ijvr.2018.19.4.298>
72. Zhou J, Peng X, Mei S. Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *International Journal of Biological Sciences*. 2019; 15: 726-737. doi: <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>
73. Soares PHA, Junqueira FS. Reproductive features of the bovine female: Review. *Pubvet*. 2019; 13: 1-6. doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n02a257.1-6>
74. Landry DA, Sirard M. Follicle capacitation: A meta-analysis to investigate the transcriptome dynamics following FSH decline in bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 2018; 99: 877-887. doi: <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy090>
75. Meng L, Jan SZ, Hamer G, Van Pelt AM, Van der Stelt I, Keijer J. et al. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of Reproduction*. 2018; 99: 853-863. doi: <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy116>
76. Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M, Kato S. Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology*. 1997; 48: 743-755. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-2928\(97\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0093-2928(97)00102-6)

[doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00298-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00298-7)

77. Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T. Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*. 1999; 52: 81-89. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00111-9)
78. Alm H, Kątska-Książkiewicz L, Ryńska B, Tuchscherer A. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*. 2006; 65: 1422-1434. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.014>
79. de Sá NA, Ferreira AC, Sousa FG, Duarte AB, Paes VM, Cadenas J, et al. 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*. 2020; 87: 966-977. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.23410>
80. Cadenas J, Leiva-Revilla J, Vieira LA, Apolloni LB, Aguiar FLN, Alves BG, et al. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. *Theriogenology*. 2017; 87: 321-332. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.008>
81. Ferreira, ACA, Cadenas J, Sá NA, Correia HH, Guerreiro DD, Lobo CH, et al. In vitro culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration-dependent and stage-specific effect. *Animal Reproduction Science*. 2018; 196: 120-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.004>
82. Lopes EPF, Rodrigues GQ, de Brito DCC, Rocha RMP, Ferreira ACA, de Sá NA, et al. Vitrification of caprine secondary and early antral follicles as a perspective to preserve fertility function. *Reproductive Biology*. 2020; 20: 371-378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.05.001>
83. Cordeiro EB, Silva BR, Paulino LR, Barroso PA, Barrozo LG, de Lima Neto MF, and Silva JR. Effects of N-acetylcysteine on growth, viability and reactive oxygen species levels in small antral follicles cultured in vitro. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2023; 12(1), 42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106801>
84. Jiang Y, He Y, Pan X, Wang P, Yuan X, Ma B. Advances in oocyte maturation in vivo and in vitro in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 21;24(10):9059. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24109059>
85. Huang W, Nagano M, Kang SS, Yanagawa Y, Takahashi Y. Effects of in vitro growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. *Theriogenology* 2013; 80:793-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.004>
86. Senbon S, Miyano T. Bovine oocytes in early antral follicles grow in serum-free media: effect of hypoxanthine on follicular morphology & oocyte growth. *Zygote* 2002;10:301-9. doi: <https://doi.org/10.1017/S0967199402004033>
87. Bezerra FTG, Silva AWB, Rissi VB, Rosa PA, Cesaro MP, Costa JJN, Gonçalves PBD and Silva JRV. Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. *Livestock Science*, 2016; 184, 112-118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.12.014>
88. Barrozo LG, Silva BR, Paulino LR, Barbalho EC, Nascimento DR, Costa FC, and Silva JR. N-acetyl cysteine reduces levels of reactive oxygen species and improves in vitro maturation of oocytes from medium-sized bovine antral follicles. *Zygote*, 2022; 30(6), 882-890. doi: <https://doi.org/10.1017/S0967199422000429>
89. He Y, Meng K, Wang X, Dong, Z, Zhang, Y, Quan F. Comparison of bovine small antral follicle development in two-and three-dimensional culture systems. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 2020; 92, e20180935. doi: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180935>
90. Bezerra FTG, Lima FEO, Paulino LRFM, Silva BR, Silva AWB, Souza ALP, Van Den Hurk R and Silva JRV. In vitro culture of secondary follicles and prematuration of cumulus-oocyte complexes from antral follicles increase the levels of maturation-related transcripts in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 2019; 86 (12), 1874-1886. doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.23284>