



NATÁLIA MARTINS BARBOSA

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E
DE FATORES DE CRESCIMENTO SOBRE O CULTIVO IN
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS**

**LAVRAS – MG
2026**

NATÁLIA MARTINS BARBOSA

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E DE FATORES DE
CRESCIMENTO SOBRE O CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em produção e nutrição de ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador
Prof. PhD. José Camisão de Souza

**LAVRAS – MG
2026**

NATÁLIA MARTINS BARBOSA

**INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E DE FATORES DE
CRESCIMENTO SOBRE O CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS**

**Influence of the count of antral follicles and growth factors on the in vitro culture of bovine
pre-antral follicles**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em produção e nutrição, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 30 de março de 2026.

DSc. José Roberto Viana Silva UFC

DSc. Jesús Alfonso Sánchez Viafara UP

DSc. Beatriz Cordenonsi Lopes EPAMIG

DSc. André Lucio Fontana Goetten UFSC

DSc. Marcelo Siqueira El Azzi UFLA

DSc. Miller Pereira Palhão UFLA

Orientador
Prof. Ph. José Camisão de Souza

**LAVRAS – MG
2026**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Martins Barbosa, Natália.

INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIS E DE FATORES
DE CRESCIMENTO SOBRE O CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS
PRÉ-ANTRAIS BOVINOS / Natália Martins Barbosa. - 2026.
120 p.

Orientador: Prof. PhD. José Camisão de Souza

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2026.
Bibliografia.

1. Biotécnicas reprodutivas. 2. Foliculogênese. 3. Fatores de crescimento. 4.
Reserva ovariana. 5. Córtex ovariano. I. de Souza, Prof. PhD. José Camisão. II.
Universidade Federal de Lavras. III. Título.

*Dedico a Deus por me permitir viver tudo
isso e aos meus pais por todo incentivo e
apoio. Dedico a minha cachorra Hanna, que
faleceu 10 dias antes da defesa, por ser
guerreira e ter lutado até o último momento
por sua vida. Em sua memória!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, que foi um verdadeiro guia nessa jornada. Sem a sua infinita sabedoria, jamais teria conseguido.

Aos meus pais, Everaldo e Luci, por sempre serem minha base e me apoiarem em todos os momentos. Obrigada por tudo, sem vocês eu não estaria aqui, vocês foram fundamentais para minha formação no curso de zootecnia.

Ao meu irmão Victor, pelo companheirismo, ajuda e cumplicidade.

Ao meu namorado Marcos, pela cumplicidade e pelo apoio durante todos os anos do doutorado.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram comigo nesta caminhada, em especial às minhas amigas Jelienny, Heloisa, Aline, Giovanna e Jaciele, por todo o apoio e amizade.

Aos amigos do centro religioso do qual faço parte, agradeço do fundo do meu coração por todo o apoio. Especialmente Dona Erika e sua família por me auxiliarem em todos os momentos.

A todas as meninas que passaram pela República 302, pela convivência harmoniosa, amizade, troca de conhecimentos e apoio durante a graduação.

A todos os professores que transmitiram seus ensinamentos ao longo desta trajetória.

Em especial ao professor José Camisão de Souza, pelo privilégio de ter sido sua orientanda e por poder acompanhá-lo a campo durante todos esses anos, por todos os conselhos pessoais e profissionais e pela disponibilidade em ensinar e ajudar.

Ao professor José Roberto, pela disponibilidade em permitir que eu realizasse os experimentos do doutorado em seu grupo de pesquisa no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP), em Sobral – CE, bem como por sua orientação e contribuição ao meu projeto, as quais foram de extrema importância.

Ao professor Vitor Rissi, por me receber no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA), na UFSC – Curitibanos – SC, para a realização do treinamento em produção *in vitro* de embriões. Esse treinamento foi de extrema importância para a minha carreira.

Ao André, técnico responsável pelo LAFRA, por me acompanhar durante o treinamento, por toda a ajuda, paciência, pelo conhecimento compartilhado e pelo acolhimento tão gentil.

Ao Marcelo, por todo o apoio durante o doutorado e pela orientação constante ao longo dessa jornada.

A todas as pessoas que, mesmo de forma indireta, me auxiliaram em todo esse processo,

em especial a todos da família Araújo, por todo o acolhimento, ajuda e amizade. Vou guardá-los para sempre no meu coração.

A todos os membros do LABIREP e do LAFRA, por toda a ajuda, ensinamentos e amizades. Em especial, Isabelle e Nicole.

A todos os membros do Grupo de Estudo em Reprodução (GERE), que contribuíram grandemente para a execução deste projeto.

A todos os funcionários do DZO/UFLA, pela disposição em ajudar.

A todos os estagiários que me auxiliaram ao longo do experimento, agradeço pelo companheirismo e pelas amizades construídas nesse vínculo.

A todos os animais que fizeram parte da minha jornada como acadêmica, em especial aos meus animais de estimação Hanna, Amora, Bob e Pinshe, deixo aqui registrado meu agradecimento e meu compromisso em sempre honrá-los e respeitá-los.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Zootecnia (DZO) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZO/UFLA) pela estrutura oferecida e pela oportunidade de realização do Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço à Capes pela concessão da bolsa de estudos, que tornou possível a realização do doutorado.

Serei eternamente grata a todos!

*“Ninguém pode voltar atrás e fazer um
novo começo, mas qualquer pessoa
pode recomeçar e fazer um novo fim”
(Chico Xavier)*

RESUMO

A reserva ovariana de folículos pré-antrais é determinante para a fertilidade e pode ser influenciada pela contagem de folículos antrais (CFA), hormônios e fatores de crescimento. No entanto, o impacto da CFA e das interações entre esses fatores sobre a foliculogênese inicial é pouco explorado. Assim, esta tese teve como objetivos: (1) avaliar o efeito de diferentes classes de CFA (baixa, média e alta) na morfologia, ativação folicular, densidade estromal, distribuição de colágeno na matriz extracelular (MEC) e expressão gênica do antígeno nuclear de proliferação celular (*PCNA*), do fator de crescimento e diferenciação-9 (*GDF-9*) e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (*CCN2*) em fragmentos de córtex ovariano bovino cultivados *in vitro*; e (2) avaliar o efeito da suplementação com hormônio folículo-estimulante (FSH), fator de crescimento epidérmico (EGF) e *GDF-9*, isolados ou associados, sobre a ativação, sobrevivência e expressão gênica de *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* de folículos pré-antrais bovinos com CFA média. No primeiro estudo, fragmentos de córtex ovariano de vacas com CFA baixa (≤ 15), média (16–30) e alta (≥ 31) foram cultivados em meio essencial mínimo alfa (α -MEM) por seis dias. Tecidos com CFA média e alta apresentaram maior sobrevivência folicular que a CFA baixa ($p < 0,05$). A ativação folicular foi maior na CFA média ($p < 0,05$). A CFA média também preservou maior porcentagem de colágeno após o cultivo ($p < 0,05$). A densidade estromal reduziu em todas as classes, sem diferenças significativas ($p > 0,05$). A expressão de *PCNA* não foi alterada pelo cultivo, enquanto *CCN2* foi maior na CFA média em tecidos não cultivados e, após o cultivo, *GDF-9* e *CCN2* foram mais expressos na CFA alta. Concluiu-se que a CFA média proporciona um microambiente mais favorável ao cultivo. No segundo estudo, fragmentos com CFA média foram cultivados em α -MEM suplementado com FSH (100 ng/mL), EGF (10 ng/mL), *GDF-9* (200 ng/mL), EGF + *GDF-9* ou EGF + *GDF-9* + FSH. A associação EGF + *GDF-9* promoveu maior porcentagem de folículos morfologicamente normais entre os grupos cultivados, não diferindo do controle não cultivado ($p > 0,05$). Todos os tratamentos aumentaram a ativação folicular, com maiores taxas nos grupos EGF + *GDF-9* e EGF + *GDF-9* + FSH. A associação EGF + *GDF-9* também apresentou maior porcentagem de colágeno, maior densidade estromal e maior expressão de *CCN2*. A adição de FSH não trouxe benefícios adicionais. Concluiu-se que a associação EGF + *GDF-9* é a estratégia mais eficaz para o cultivo *in vitro* de folículos com CFA média. Em conjunto, os achados demonstram que a CFA média confere maior capacidade de resposta do tecido ovariano ao cultivo *in vitro* e que

a suplementação combinada com EGF e GDF-9 potencializa a foliculogênese inicial, promovendo maior sobrevivência, ativação e integridade da MEC. Esses resultados contribuem para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas.

Palavras-chave: biotécnicas reprodutivas; córtex ovariano; foliculogênese; fatores de crescimento; reserva ovariana.

ABSTRACT

The ovarian reserve of preantral follicles is a key determinant of fertility and can be influenced by antral follicle count (AFC), hormones, and growth factors. However, the impact of AFC and the interactions among these factors on initial folliculogenesis remains poorly explored. Thus, this thesis aimed to: (1) evaluate the effect of different AFC classes (low, medium, and high) on morphology, follicle activation, stromal density, collagen distribution in the extracellular matrix (ECM), and gene expression of proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*), growth differentiation factor-9 (*GDF-9*), and connective tissue growth factor (*CCN2*) in cultured bovine ovarian cortex fragments; and (2) evaluate the effect of supplementation with follicle-stimulating hormone (FSH), epidermal growth factor (EGF), and *GDF-9*, alone or in combination, on the activation, survival, and gene expression of *PCNA*, *GDF-9*, and *CCN2* in bovine preantral follicles with medium AFC. In the first study, ovarian cortex fragments from cows with low (≤ 15), medium (16–30), and high (≥ 31) AFC were cultured in alpha-minimum essential medium (α -MEM) for six days. Tissues with medium and high AFC exhibited higher follicular survival than those with low AFC ($p < 0.05$). Follicular activation was greater in medium AFC ($p < 0.05$). Medium AFC also preserved a higher percentage of collagen after culture ($p < 0.05$). Stromal density decreased across all classes, with no significant differences among them ($p > 0.05$). *PCNA* expression was not altered by culture, whereas *CCN2* was higher in medium AFC in non-cultured tissues; after culture, *GDF-9* and *CCN2* were more highly expressed in high AFC. It was concluded that medium AFC provides a more favorable microenvironment for culture. In the second study, fragments with medium AFC were cultured in α -MEM supplemented with FSH (100 ng/mL), EGF (10 ng/mL), *GDF-9* (200 ng/mL), EGF + *GDF-9*, or EGF + *GDF-9* + FSH. The EGF + *GDF-9* combination promoted the highest percentage of morphologically normal follicles among cultured groups, not differing from the non-cultured control ($p > 0.05$). All treatments increased follicular activation, with the highest rates observed in the EGF + *GDF-9* and EGF + *GDF-9* + FSH groups. The EGF + *GDF-9* combination also showed a higher percentage of collagen, greater stromal density, and higher *CCN2* expression. The addition of FSH provided no additional benefits. It was concluded that the EGF + *GDF-9* combination is the most effective strategy for *in vitro* follicle culture using medium AFC. Taken together, these findings demonstrate that medium AFC confers greater responsiveness of ovarian tissue to *in vitro* culture, and that combined supplementation with EGF and *GDF-9* enhances initial folliculogenesis, promoting greater survival, activation, and ECM integrity. These results

contribute to the improvement of reproductive biotechniques.

Keywords: reproductive biotechniques; ovarian cortex; folliculogenesis; growth factors; ovarian reserve.

INDICADORES DE IMPACTO

A presente pesquisa, desenvolvida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em parceria com o Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução (LABIREP) da Universidade Federal do Ceará (UFC), gerou impactos tecnológicos e econômicos potenciais e concretos. Do ponto de vista tecnológico, os resultados contribuem para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas aplicadas à produção animal, especialmente o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, permitindo avanços na conservação de material genético de fêmeas de alto valor zootécnico e na preservação de recursos genéticos ameaçados, com impacto direto sobre a eficiência produtiva do setor agropecuário brasileiro. Economicamente, a padronização de protocolos mais eficazes para o cultivo folicular pode reduzir custos e aumentar a taxa de sucesso na obtenção de oócitos competentes para produção *in vitro* de embriões, beneficiando pecuaristas e empresas do setor de reprodução animal.

IMPACT INDICATORS

This research, conducted within the Graduate Program in Animal Science at the Federal University of Lavras (UFLA), in partnership with the Laboratory of Biotechnology and Reproductive Physiology (LABIREP) at the Federal University of Ceará (UFC), generated both potential and concrete technological and economic impacts. From a technological perspective, the results contribute to the improvement of reproductive biotechniques applied to animal production, especially the *in vitro* culture of preantral follicles, enabling advances in the conservation of genetic material from females of high zootechnical value and in the preservation of threatened genetic resources, with a direct impact on the productive efficiency of the Brazilian agricultural sector. Economically, the standardization of more effective protocols for follicular culture can reduce costs and increase the success rate in obtaining competent oocytes for *in vitro* embryo production, benefiting livestock farmers and companies in the animal reproduction sector.

LISTA DE SIGLAS

AKT	Proteína Kinase
AMH	Hormônio antimülleriano
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BMP-7	Proteína Morfogenética Óssea -7
BMPs	Proteínas morfogenéticas óssea
CFA	Contagem folicular antral
CIV	Cultivo in vitro
CO ₂	Dióxido de carbono
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico-2
FGFb	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FIGLA	Fator de Linhagem Germinativa Alfa
FPAs	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação-9
GSP	Células germinativas primordiais
IAPs	Inibidores de proteínas de apoptose
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina– 1
JNK	Kinase terminal c-Jun-N-terminal
KL	Kit Ligante
LH	Hormônio luteinizante
MEC	Matriz extracelular
mTOR	Rapamicina em mamíferos
OPU	Aspiração folicular
O ₂	Oxigênio
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma receptor
PTEN	Homólogo da tensina
rpS6	Proteína Ribossomal S6

S1P	Esfingosina-1-fosfato
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β
TSC1	Proteína 1 esclerose tuberosa
TSC2	Proteína 2 de esclerose tuberosa
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VERT	Verteporfim
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
=	Igual
$\pm$	Mais ou Menos
°C	Grau celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
kg	Quilograma
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Ovogênese e foliculogênese em bovinos	20
2.2 Formação, ativação e crescimento de folículos primordiais	24
2.3 Modelo endócrino/molecular/celular de ativação dos folículos primordiais.....	26
2.3.1 Sinalização PI3K/PTEN/AKT/FOXO3	26
2.3.2 Sinalização TSC – mTORC1	27
2.3.3 Funções do EGF, GDF-9 e FSH na ativação folicular.....	28
2.3.4 Via Hippo	31
2.4 Crescimento de folículos primários e secundários.....	33
2. 5 Crescimento dos folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios).....	35
2.6 População folicular e atresia.....	36
2.7 Contagem de Folículos Antrais em Bovinos: Aspectos Conceituais, Metabólicos, Moleculares e Aplicações Biotecnológicas.....	38
2. 8 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	41
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	42
5 OBJETIVOS	43
5.1 Objetivo geral.....	43
5.2 Objetivos específicos.....	44
6 CAPÍTULO 1	44
7 CAPITULO 2	69
8 CONCLUSÕES GERAIS	94
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pesquisas recentes têm se concentrado nos mecanismos de desenvolvimento folicular, essenciais para o controle da reprodução animal com potencial para revolucionar a multiplicação de animais de alto valor econômico, especialmente bovinos (Simon et al., 2020). Essas pesquisas podem impulsionar o desenvolvimento econômico nacional de forma sustentável. Embora biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial e transferência de embriões, sejam amplamente utilizadas (Baruselli et al., 2019), a maioria delas prioriza o potencial reprodutivo dos machos, ignorando o potencial das fêmeas.

Os ovários das fêmeas mamíferas abrigam, desde o nascimento, milhares de oócitos imaturos em folículos pré-antrais, constituindo o estoque para a sua vida reprodutiva. No entanto, a maioria desses folículos não se desenvolve plenamente devido à atresia (Wu, Liu, Zhang 2021), sendo o mecanismo necessário para assegurar o desenvolvimento apenas dos nascimentos compatíveis.

Desenvolver um sistema eficaz, com o estabelecimento de condições de cultivo otimizadas aliado à investigação dos fatores que controlam a ativação e o crescimento folicular, é fundamental para ativar e cultivar *in vitro* esses folículos, permitindo a obtenção de oócitos maduros e fertilizáveis e minimizando as perdas foliculares naturais (Ferré et al. 2020; Silva et al., 2024). Para que esse potencial seja plenamente alcançado, é fundamental o estabelecimento de condições de cultivo otimizadas, aliado à investigação dos fatores que controlam a ativação e o crescimento folicular. Nesse contexto, a correlação entre a taxa de ativação de folículos primordiais *in vitro* e a contagem folicular antral (CFA), um marcador quantitativo consolidado da resposta ovariana e da fertilidade em bovinos (Morotti et al., 2017), surge como uma linha de investigação-chave.

A foliculogênese ovariana é um processo complexo controlado pela interação entre fatores de crescimento locais, como Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e gonadotrofinas. Desta forma, a identificação e a avaliação do efeito desses fatores e hormônio são de suma importância. Alguns estudos demonstraram que a adição do hormônio estimulante (FSH) no meio de cultivo promove a inibição de apoptose e a formação do antro, em grandes folículos secundários isolados de diferentes espécies (murina: McGee, Perlas, Lapolt, 1997; humana: Wright et al., 1999; ovina: Cecconi et al., 1999; bovina: Gutierrez et al., 2000; suína: Mao et al., 2002). Referente aos fatores de crescimento, o EGF tem a capacidade de

induzir o desenvolvimento folicular *in vitro* (Uju; Unniappan, 2024). Além disso, é considerado um fator mitogênico e está envolvido na regulação dos diversos processos ovarianos (Silva, VAN-Den-Hurk, Figueiredo, 2006a), incluindo proliferação e diferenciação celular (Saha et al., 2000; Wang et al., 2007). O GDF-9, é promotor do crescimento do oócito, proliferação de células da granulosa e diferenciação de células da teca em pequenos e grandes folículos antrais bovinos (Spicer et al., 2006, 2008). Além disso, Orisaka et al. (2006) mostraram que o GDF-9 mantém a viabilidade e o crescimento folicular durante a transição da fase pré-antral para a fase antral inicial em ratas.

Para elucidar os mecanismos por meio dos quais a CFA e os fatores exógenos modulam a ativação folicular *in vitro*, é necessário investigar não apenas os desfechos morfofuncionais, mas também as alterações no microambiente ovariano e na regulação gênica local (Simon, Kumar, Duncan 2020). O nicho dos folículos primordiais, composto pelas células estromais circundantes e pela matriz extracelular (especialmente as fibras colágenas), fornece sinais físicos e químicos essenciais para a manutenção da quiescência ou o desencadeamento do crescimento (Wu, Liu, Zhang 2021). Alterações na densidade desses componentes podem, portanto, refletir e influenciar diretamente o potencial de ativação do tecido cultivado (Silva; Félix, 2025). Paralelamente, a avaliação da expressão de genes associados à proliferação celular como o gene *PCNA* (Xu et al., 2011), à comunicação intercelular (como *GDF-9* e *CCN2*) (Elvin et al., 1999; Abulghasem; Price, 2025) e à resposta a fatores de crescimento no próprio tecido ovariano oferece uma visão molecular dos eventos desencadeados pelo cultivo.

Este estudo parte da hipótese de que a alta CFA reflete maior fertilidade em bovinos, associada a uma elevada taxa de ativação de folículos primordiais e expressão de genes-chave (*PCNA*, *GDF-9*, *CCN2*). Para comprová-lo, objetiva-se demonstrar a relação entre a CFA e a ativação folicular *in vitro* e desenvolver um meio de cultivo otimizado com FSH, EGF e GDF-9. Especificamente, buscar-se-á quantificar a expressão desses mRNAs e avaliar parâmetros de ativação, sobrevivência e ultraestrutura dos folículos antes e após o cultivo *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ovogênese e foliculogênese em bovinos

O ovário caracteriza-se como um órgão de natureza dinâmica, exercendo funções essenciais para o sistema reprodutor por meio de duas atividades primordiais: a produção hormonal (função endócrina) e a liberação de gametas (função gametogênica) (Dalbies-Tran et al., 2020). A porção medular, situada na região central, é constituída por tecido nervoso, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela irrigação e pelo suporte do órgão. Já a porção cortical, localizada na periferia, representa a zona funcional do ovário, abrigando um estroma rico em células conjuntivas e os folículos ovarianos (Bahr, 2018).

O folículo ovariano é reconhecido como a unidade morfofuncional do ovário, sendo formado por um oócito envolto por camadas de células somáticas (da granulosa e/ou da teca). Esta estrutura desempenha papel fundamental no suporte e na nutrição do oócito, promovendo seu desenvolvimento até que seja selecionado para a ovulação (Coxir et al., 2023). Tanto o córtex quanto a medula apresentam estroma com propriedades particulares, sendo a maioria dos folículos alojada no estroma cortical, onde se desenvolvem, para posteriormente amadurecerem no estroma da região medular (Sheng et al., 2022). A representação esquemática da arquitetura ovariana de mamíferos, evidenciando os folículos em suas diferentes fases de desenvolvimento, é ilustrada na Figura 1.

Os ovários dos mamíferos contêm milhares de células germinativas que serão utilizadas ao longo da vida reprodutiva da fêmea, desempenhando a função de liberar oócitos maduros para a fertilização (Zussman et al., 2025). As células germinativas primordiais (CGPs) são derivadas do endoderma do saco vitelínico do embrião. Os principais fatores envolvidos na diferenciação destas células são os membros da família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), especialmente a BMP-4 e a BMP-8b, que são secretadas a partir do ectoderma extra-embrionário (Lawson et al., 1999; Wang et al., 2014). Após a proliferação celular, as células germinativas migram do saco vitelínico até a crista gonadal, onde colonizam a gônada primitiva, formando os cordões sexuais (Pepling; Spradling, 2001; Adams et al., 2008). A migração das CGPs do saco vitelínico para a crista gonadal é estimulada por diversos fatores, como o Kit Ligante (KL), que tem como função regular a migração, proliferação e/ou sobrevivência celular (Gu et al., 2009).

Após a colonização da crista gonadal, as CGPs continuam a divisão mitótica seguida de uma reorganização das organelas, originando as oogônias (Sathananthan, Selvaraj, Trounson, 2000). Estudos recentes mostraram que a ativação do receptor do ácido retinoico regula o início da meiose em camundongos (Anderson et al., 2008). Isto sugere que os genes ativados pelo ácido retinoico, como o gene 8 (*STRA8*), podem ser importantes para sobrevivência oocitária em bovinos

(Koshimizu; Watanabe; Nakatsuji, 1995) e em camundongas (Menke; Koubova; Page; 2003). Com a interrupção da meiose I na fase de prófase, as oogônias diferenciam-se em oócitos primários (Hirshfield, 1991). Em seguida, os oócitos são circundados por uma camada de células da pré-granulosa, as quais podem ser derivadas do mesonéfron ou do epitélio da superfície ovariana (McNatty et al., 2000). Na grande maioria dos folículos primordiais recém-formados, as células pré-granulosas param de se multiplicar e entram num período de quiescência (Sawyer et al., 2002), juntamente com o oócito.

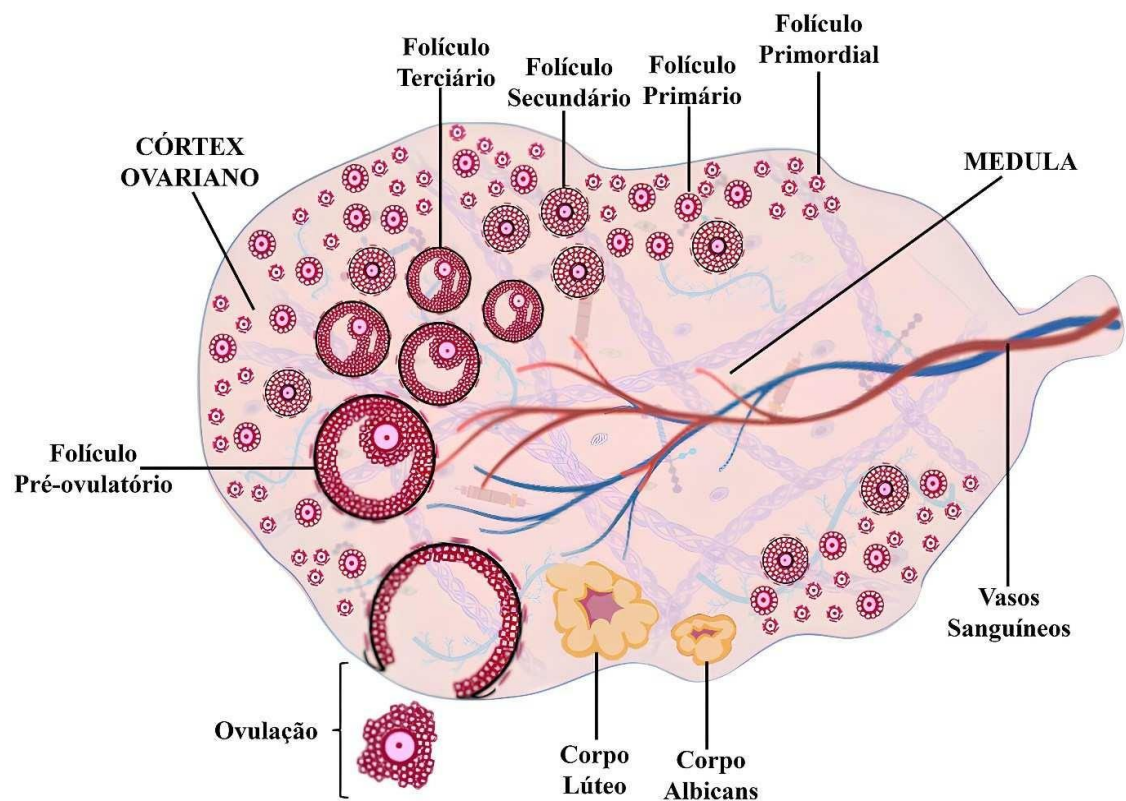


Figura 1. Esquema representativo do ovário de mamíferos, demonstrando a localização dos folículos em variadas etapas de desenvolvimento no interior do estroma do córtex ovariano.
Fonte: Azevedo, 2025.

A foliculogênese constitui um processo que acompanha e dá suporte à oogênese, caracterizando-se por alterações morfológicas progressivas nos folículos, as quais envolvem sua ativação,

crescimento e maturação. Este processo desenvolve-se em duas etapas fundamentais: a fase pré-antral e a fase antral. A fase pré-antral compreende os folículos primordiais, primários e secundários, que correspondem a 90-95% da reserva folicular total. Essas estruturas não apresentam dependência de gonadotrofinas para seu desenvolvimento, embora sejam capazes de responder a esses hormônios (Seneda et al., 2021). A fase antral, por sua vez, abrange os folículos terciários (ou antrais) e os folículos pré-ovulatórios.

Cabe ressaltar que o folículo antral em estágio inicial também não possui dependência gonadotrófica, apesar de responder a estímulos hormonais. A dependência efetiva de gonadotrofinas manifesta-se apenas nas etapas posteriores, que envolvem o recrutamento, a seleção e a dominância folicular, processos que precedem a ovulação (Jinno, 2025). Os folículos que se tornam dependentes de gonadotrofinas, presentes nas fases de seleção e dominância, desempenham papel fundamental na produção de hormônios esteroides e na preservação da viabilidade do oócito até o momento da ovulação (Seneda et al., 2021).

Na fase pré-antral, os folículos primordiais são recrutados para o crescimento folicular, iniciando uma transição progressiva que resulta na formação dos folículos primários (Fiorentino et al., 2023). Morfologicamente, os folículos primários distinguem-se pela presença de uma camada completa de células da granulosa, de formato cuboide, envolvendo o oócito. É nesse estágio inicial do desenvolvimento que ocorre a deposição da zona pelúcida, uma estrutura glicoproteica acelular que envolve o oócito e permanece presente durante toda a foliculogênese, sendo essencial para processos como a interação espermatozoide-oócito e a proteção do gameta (Dompe et al., 2021). Com a contínua divisão das células da granulosa, o folículo evolui para o estágio secundário. Posteriormente, forma-se uma cavidade repleta de líquido folicular, denominada antro, caracterizando os folículos antrais (ou terciários). Essa etapa representa um marco no desenvolvimento folicular, pois está associada à rápida expansão folicular e ao início da dependência de gonadotrofinas para sua progressão e maturação (Seneda et al., 2021).

Em bovinos, o desenvolvimento dos folículos antrais ocorre em duas fases distintas. A primeira fase é caracterizada por um crescimento inicial mais lento, tendo início com a formação do antro em folículos com aproximadamente 300 µm de diâmetro, os quais evoluem até constituírem um pool de pequenos folículos antrais (Mihm; Bleach, 2003). A segunda fase corresponde a um período de crescimento acelerado, que se manifesta por meio de ondas foliculares, geralmente duas ou três por ciclo estral, a partir de folículos com cerca de 3 mm (Adams; Singh, 2021). Cada onda folicular compreende três etapas fundamentais: recrutamento, seleção e dominância. No recrutamento, um grupo de folículos

antrais emerge do reservatório disponível e inicia seu desenvolvimento sob estímulo gonadotrófico. A fase seguinte envolve a seleção e o estabelecimento da dominância, quando um folículo adquire crescimento superior em relação aos demais, tornando-se o dominante da onda. Esse processo é regulado principalmente pelo FSH e pelo hormônio luteinizante (LH). Em resposta a esses estímulos, o folículo dominante produz quantidades elevadas de estradiol, que atuam na regulação da liberação hipofisária de gonadotrofinas. Esses eventos culminam na formação do folículo pré-ovulatório e na ovulação de um oócito maduro em metáfase II (MII), desencadeada pelo pico pré-ovulatório de LH associado à queda nos níveis de progesterona. Esse momento marca a fase final da onda folicular e o término da foliculogênese (Adams; Singh, 2021).

Nos ovários bovinos, apenas um folículo atinge o estágio ovulatório por ciclo estral, enquanto cerca de 99% dos folículos antrais são destinados à degeneração por atresia, um processo fisiológico de morte celular programada que impacta diretamente a reserva de oócitos disponíveis (Costa; Fair; Seneda, 2023). O folículo dominante exerce efeito inibitório sobre os folículos subordinados, suprimindo seu crescimento e induzindo sua regressão por atresia, fenômeno que está associado a mecanismos endócrinos e locais, como a redução dos níveis de FSH e a ação de fatores parácrinos (Sartori et al., 2016).

Após a puberdade, mediante o pico pré-ovulatório de LH, o oócito retoma a meiose, progressão que havia sido interrompida no estágio de prófase I ainda na vida fetal. Com a retomada, o oócito avança para a metáfase II, etapa em que ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar, caracterizando sua maturação e aquisição da competência para ser fertilizado. Caso ocorra a fertilização, o oócito conclui a divisão meiótica com a eliminação do segundo corpúsculo polar, finalizando, assim, a oogênese (Seneda et al., 2021). Dessa forma, os processos integrados de foliculogênese e oogênese asseguram a produção de um gameta feminino plenamente capacitado para a fertilização.

2.2 Formação, ativação e crescimento de folículos primordiais

Alguns hormônios regulam a formação dos folículos primordiais, dentre eles pode-se citar o Estradiol (E2) e a Progesterona (P4) que reduzem a quantidade de folículos formados durante o cultivo de ovários de camundongas recém-nascidas (Chen et al., 2007). O FSH atua regulando a expressão do E2 no tecido ovariano durante a formação de folículos primordiais em hamsters (Wang; Prossnitz; Roy, 2008). Outras substâncias também estão envolvidas na formação dos folículos primordiais, como as caderinas, que são glicoproteínas de membrana presentes na superfície celular

e são importantes para a morfogênese. As N-caderinas estão envolvidas na adesão das células somáticas ao oócito durante a formação de folículos primordiais, enquanto que as E-caderinas controlam a migração de oócitos durante a formação de folículos primordiais em hamster (Wang; Roy, 2010).

Após sua formação, alguns folículos primordiais podem iniciar o crescimento imediatamente ou entrar em quiescência, quando as células da pré-granulosa param de se multiplicar até receberem sinais para entrar no pool de folículos em crescimento (McGee; Hsueh, 2000). O início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (Van Den Hurk; Zhao, 2005), sendo considerado o maior evento biológico que controla o potencial reprodutivo das fêmeas (McLaughlin; Mciver, 2009).

Após sua formação, os folículos primordiais podem seguir três possíveis destinos, ou seja, (1) atresia, (2) permanecer no estágio primordial ou (3) iniciar a transição para a fase de crescimento. O início do crescimento de folículos primordiais, também conhecido como ativação, é um processo que ocorre através da transição dos folículos do *pool* de reserva, ou folículos quiescentes, para o *pool* de folículos em crescimento (transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório) (Rüsse, 1983; Lima et al., 2016). O primeiro sinal da ativação folicular é a retomada da proliferação das células da granulosa, com a mudança na morfologia dessas células, que passam de pavimentosas para cúbicas, bem como o crescimento oocitário (Hirshfield, 1991). A manutenção da quiescência, a sobrevivência e a ativação dos folículos primordiais são reguladas por complexos mecanismos moleculares coordenados por eventos inibitórios e/ou estimulatórios que envolvem diferentes substâncias.

Em vários trabalhos foi destacada a atuação de uma série de substâncias que estimulam esse processo de ativação tais como: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Chen et al., 2020; Xie et al., 2024), BMP-4 (Knight; Glistler, 2006; Moctezuma; González-Aretia; Hernández-Coronado, 2024) FSH (Silva et al., 2004; Bartková et al., 2024), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) (Martins et al., 2008; Huang et al., 2024), Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) (Matos et al., 2007; Matos et al., 2011; Bartková et al., 2024), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (Bruno et al., 2009; Zhang et al., 2024), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina – 1 (IGF-1) (Bartková et al., 2024), Fator de Crescimento Epidérmico - EGF (Silva et al., 2004; Li et al., 2024), Ativina-A (Silva et al., 2006), Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) (Bruno et al., 2010), E2, P4 (Lima-Verde et al., 2010), Proteína Morfogenéticas Óssea -7 (BMP-7) (Araújo et al., 2010)

e Fator de Linhagem Germinativa Alfa (FIGLA) (Joshi et al., 2007). Outros estudos *in vitro* mostram que o Kit Ligante (KL) atua melhorando a sobrevivência celular em oócitos de folículos primordiais através da fosforilação da via da Proteína Kinase (AKT) (Luan et al. 2024). Além disso, em ovários neonatais de ratas foi observado que o Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGFb) pode promover a ativação dos folículos primordiais (Pan et al., 2024) e esse efeito pode ser devido à sua capacidade de aumentar a expressão do KL (Nilsson; Skinner, 2004). Mais recentemente, estudos *in vivo* indicam que a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/fosfatase e o homólogo da tensina (PTEN)/Akt, o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a kinase terminal c-Jun-N-terminal (JNK) e rotas de sinalização Hippo estão envolvidos na ativação de folículos primordiais (Terren; Munaut, 2021). Finalmente, estudo recente incluiu o modulador do receptor gama ativado pelo proliferador-peroxissomo (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma ou PPAR γ) que pode participar da ativação e do desenvolvimento *in vitro* do folículo primordial, possivelmente mediado, em parte, pela cascata de sinalização PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 (Yoon et al., 2020).

2.3 Modelo endócrino/molecular/celular de ativação dos folículos primordiais

2.3.1 Sinalização PI3K/PTEN/AKT/FOXO3

Os PI3Ks são divididos em três classes: I, II e III. O PI3K de classe I é subdividido em duas famílias, classe IA e classe IB. A subfamília IA, a mais estudada, é composta por lipídios quinases que possuem uma subunidade reguladora p85 e uma subunidade catalítica p110 e fosforilam o grupo 3'-OH no anel de inositol dos fosfolipídios de inositol (Engelman; Luo; Cantley, 2006; Cully et al., 2006; Katso et al., 2001). O p110 é responsável por transformar PIP2 em PIP3 (Lee; Engelman; Cantley, 2007). O PIP3, por sua vez, atrai a quinase 1 dependente de fosfatidilinositol (PDK1) e a proteína serina-treonina quinase Akt para a membrana celular, onde PDK1 fosforila e ativa a Akt. A partir disso, a Akt fosforila diversos substratos, incluindo o inibidor do ciclo celular p27 (também conhecido como p27KIP1), glicogênio sintase quinase 3, esclerose tuberosa 2 (TSC2) e as famílias dos fatores de transcrição da caixa *forkhead* (FOXO) (Cully et al., 2006; Gencel-Augusto et al., 2026). Assim, a rede de sinalização PI3K desempenha um papel importante na proliferação celular, entrada no ciclo celular e sobrevivência celular (Manning; Cantley, 2007; Liang et al., 2002).

Alguns estudos mostram que a via PI3K pode desempenhar um papel na regulação da ativação de folículos primordiais (Reddy et al., 2005). No entanto, o PTEN, uma fosfatase lipídica, conhecida como uma antagonista da via PI3K, provoca supressão da ativação dos folículos primordiais através da manutenção da dormência desses folículos (Reddy et al., 2008). O *PTEN* bloqueia a sinalização de PI3K, pois reverte PIP3 em PIP2. Esse papel importante do *PTEN* na ativação do folículo primordial ovariano é evidenciado pelo fato de que a exclusão específica do gene *PTEN* no oócito resulta na superativação de um grupo de folículos primordiais (Reddy et al., 2008).

A utilização de bisperoxo dipotássio (5-hidroxi-piridina-2-carboxílico) oxovanadato (V) (bpV (HOpic)), derivado de vanadato e um inibidor de *PTEN*, em fragmentos ovarianos bovinos, aumentou a porcentagem de folículos em crescimento, comparada ao controle (Maidarti et al., 2019). Em humanos, os resultados são semelhantes quando se utiliza o inibidor de *PTEN*, comprovando sua ação na ativação de folículos primordiais como regulador negativo da função PI3K (Novella-Maestre et al., 2015).

Além da via de sinalização PI3K/PTEN existe o substrato de Akt chamado Forkhead Transcription Factor (FOXO3), um fator de transcrição, que juntamente com essa via participa da ativação do folicular (Hosaka et al., 2004; Carlsson; Mahlapuu, 2002). A via de sinalização PI3K controla a ativação do folículo através da entrada e saída do FOXO3 dentro do núcleo e do citoplasma. Durante a ativação, o FOXO3 é transferido para o núcleo e, posteriormente, exportado para o citoplasma (Zhao et al., 2021). Esses achados sugerem que a hipoativação ou regulação negativa da via PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 pode causar atraso na ativação folicular e atresia excessiva do folículo primordial.

2.3.2 Sinalização TSC – mTORC1

A molécula mTORC1 é uma serina/treonina quinase que controla o crescimento e o metabolismo celular, possibilitando vários processos metabólicos, como a biossíntese de proteínas, lipídios e organelas (Laplante; Sabatini, 2012). Ela exerce funções como a ativação da quinase S6K1 (S6K1) e da proteína ribossômica S6 (rpS6) e inibe o fator de iniciação da tradução eucariótica 4E-BP (4E-BP), promovendo a síntese proteica, a biogênese ribossômica e o crescimento celular (Fingar; Blenis, 2004).

A regulação negativa de mTORC1 nas células é controlada por um complexo heterodímero que consiste em proteína 1 de esclerose tuberosa (TSC1) e proteína 2 de esclerose tuberosa (TSC2) (Adhikari et al., 2010; Laplante, Sabatini, 2012), que são os produtos dos genes supressores de tumor Tsc1 e Tsc2 e atuam na manutenção da quiescência dos folículos primordiais (Wang et al., 2025). O complexo TSC1/TSC2 inibe a ativação de mTORC1 através do domínio da proteína ativadora de GTPase de TSC2, e TSC1 mantém a estabilidade de TSC2, evitando sua ubiquitinação e degradação (Yang et al., 2021). Alguns estudos apontam que a sinalização de mTORC1 em células pré-granulosas é necessária para a ativação de folículos primordiais (Tanaka et al. 2012; Huang et al., 2013). Ao realizar o nocaute de Tsc1 e/ou Tsc2 em células pré-granulosas e oócitos, observou-se a ativação total dos folículos primordiais (Adhikari et al., 2009). Além disso, o nocaute condicional de Rptor (complexo de proteína reguladora mTOR1) em células pré-granulosas pode inativar a sinalização mTORC1, o que suprime a ativação folicular e evita o despertar de oócitos inativados (Adhikari et al., 2009). Em um estudo, verificou-se que TSC e PTEN manipulam a ativação folicular através da regulação negativa da Proteína Ribossomal S6 (rpS6) (Adhikari et al., 2009). Na ausência das moléculas que promovem a sobrevivência dos folículos primordiais, incluindo PDK1 e rpS6, todos os folículos primordiais são perdidos prematuramente a partir do seu estado quiescente (Reddy et al., 2009).

A ativação inicial do folículo primordial envolve a diferenciação e proliferação das células pré-granulosas, seguida do crescimento dos oócitos no ovário (Gougeon; Chainy, 1987). Zhang et al. (2004) revelaram que a sinalização de mTORC1 nas células pré-granulosas ativa o receptor KIT na superfície dos oócitos, elevando a expressão do ligante KIT (KITL) nas células pré-granulosas de ovários de camundongos Tsc1 ^{-/-}. Quando KITL se liga ao receptor KIT, ocorre a fosforilação do KIT na posição Y719, ativando a sinalização da via PI3K nos oócitos de camundongos. A PI3K ativada fosforila Akt, resultando na movimentação de FOXO3 do núcleo para o citoplasma, o que leva à ativação dos folículos primordiais (John et al., 2008).

2.3.3 Funções do EGF, GDF-9 e FSH na ativação folicular

O hormônio folículo estimulante (FSH) demonstrou efeitos significativos na ativação e crescimento de folículos primordiais em estudos com caprinos (Ferreira et al., 2020; Matos et al., 2007). Isso sugere que o FSH pode desempenhar um papel importante na promoção da ativação de

folículos primordiais também em outras espécies, como bovinos, quando cultivados *in vitro* com FSH (Ribeiro et al., 2015). Durante o cultivo de folículos pré-antrais bovinos, o FSH foi associado ao aumento do diâmetro folicular, indicando seu potencial em influenciar o crescimento e a maturação folicular precoce (Hulshof et al., 1995). Esses resultados ocorrem de forma indireta através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (Van Den Hurk; Zhao, 2005). O FSH também regula a expressão de vários fatores de crescimento, como KL, BMP-15 e principalmente o GDF-9 e EGF, que têm um papel importante na ativação e no crescimento folicular posterior (Joyce et al., 1999; Thomas et al., 2005; Celestino et al., 2009).

O GDF-9 é essencial para a diferenciação das células somáticas em células da pré-granulosa, conforme observado em estudos com oócitos de folículos primordiais de hamster (Wang; Roy, 2006). Essa função sugere que o GDF-9 pode desempenhar um papel crucial na determinação do destino folicular e na manutenção da viabilidade folicular. Estudos com camundongos deficientes para GDF-9 indicam que a ausência desse fator de crescimento está associada à falta de genes essenciais como o *PTEN*, destacando seu papel regulatório na saúde folicular (Reddy et al., 2008). Pesquisas utilizando modelos murinos demonstraram que a inibição farmacológica de *PTEN* (com o inibidor bpV) em camundongos knockout condicionais para o gene *Exoc1* (mediado por GDF9 - Cre) resultou no resgate da ativação folicular e no aumento do diâmetro oocitário em folículos primordiais. Esse achado reforça a interação funcional entre a via mediada por GDF-9 e a regulação exercida por *PTEN* no controle da ativação precoce de folículos ovarianos (Liu et al., 2025)

O EGF demonstrou a capacidade de induzir o desenvolvimento folicular *in vitro*, como observado em estudos com caprinos (Celestino et al., 2009). Isso sugere que o EGF pode ser um componente significativo para a ativação e crescimento dos folículos primordiais durante o cultivo *in vitro*. Estudos com outras espécies, como ovinos e ratos, mostraram que o EGF não apenas promove a ativação de folículos primordiais, mas também mantém a sua viabilidade ao longo do tempo de cultivo (Andrade et al., 2005). Um estudo recente, embora conduzido em peixes, descreve mecanismos moleculares conservados em mamíferos e suporta o papel do EGF na sinalização celular. Segundo Kundu, Kumar Das e Das Gupta (2024), o EGF promove o crescimento e diferenciação celular via receptor EGFR, estando implicado na supressão da apoptose e na potencialização da esteroidogênese induzida por gonadotrofinas. Adicionalmente, os autores

confirmam que o IGF-I influencia a maturação de oócitos diretamente pela via da PI3 quinase, um mecanismo que pode ser extrapolado para a ação do EGF na ativação de vias de sobrevivência celular, como a PI3K/AKT.

A interação entre EGF, GDF-9 e FSH no tecido ovariano bovino cultivado *in vitro* pode criar um ambiente propício para a ativação e o desenvolvimento dos folículos primordiais. Esses fatores de crescimento não apenas mantêm a viabilidade dos folículos, mas também influenciam positivamente seu processo de ativação (através da via PTEN/PI3K/AKT/FOXO3/mTOR), fornecendo uma base teórica e experimental para explorar novas estratégias em técnicas de reprodução assistida e preservação da fertilidade.

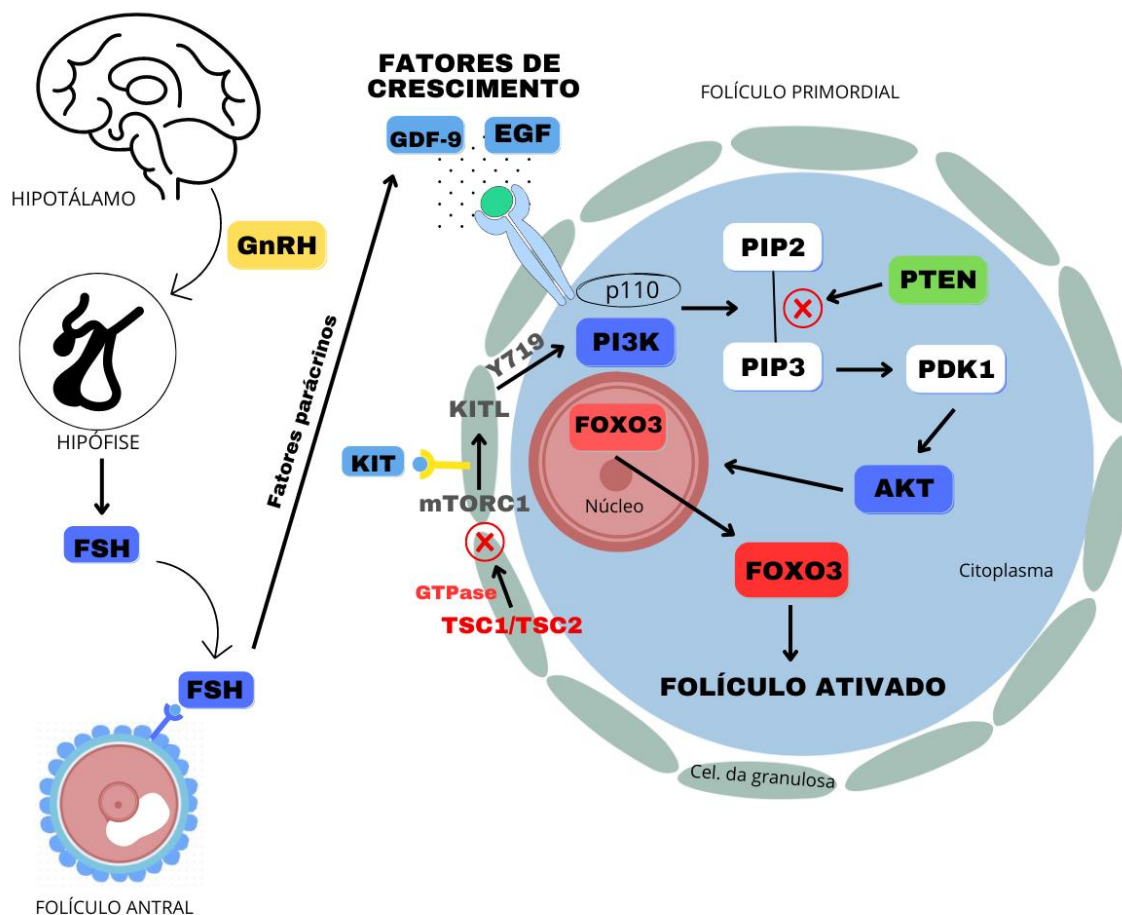


Figura 2. Modelo endócrino, molecular e celular da ativação do folículo primordial. Esta figura ilustra as principais vias envolvidas no recrutamento de folículos primordiais e sua interação com fatores de crescimento, como GDF-9 (fator de crescimento e diferenciação-9), EGF (fator de crescimento epidérmico) e o hormônio FSH (hormônio folículo-estimulante). O hipotálamo secreta o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que é transportado pela corrente sanguínea até a

hipófise anterior. Na hipófise, o GnRH estimula as células gonadotróficas a produzir FSH. O FSH se liga aos receptores nas células da granulosa dos folículos antrais e atua indiretamente na ativação dos folículos primordiais, promovendo a liberação de fatores parácrinos e aumentando a expressão de GDF-9 e EGF. Esses fatores de crescimento ativam a via de sinalização PI3K, que leva à ativação da via Akt por meio da conversão de PIP2 em PIP3. O PIP3 recruta PDK1 e Akt para a membrana celular, onde PDK1 fosforila e ativa a Akt. A ativação da Akt resulta na hiperfosforilação de FOXO3 e sua exportação do núcleo, desencadeando a ativação do folículo primordial. O PTEN atua como um regulador negativo da via PI3K/Akt, inibindo a conversão de PIP2 em PIP3. Além disso, a via de sinalização mTORC1 também está envolvida, aumentando a expressão do ligante KIT (KITL) nas células da granulosa. O KITL se liga ao receptor KIT na superfície do oócito, resultando na ativação da cascata de sinalização PI3K/AKT. O complexo TSC1/TSC2 inibe a ativação de mTORC1 através do domínio da proteína ativadora de GTPase.

Fonte: Do Autor, 2026.

2.3.4 Via Hippo

Em mamíferos, a via Hippo, reconhecida por seu alto grau de conservação evolutiva, tem sido associada aos processos de crescimento e ativação dos folículos ovarianos. Estudos de *microarray* demonstraram a presença de todos os elementos que compõem a cascata de sinalização Hippo no ovário de bovinos (Clarck et al., 2022). Essa via atua como uma cascata de quinases cuja função é modular a atividade dos coativadores transcricionais YAP (Yes-associated protein) e TAZ (transcriptional coactivator com domínio de ligação PDZ) (Dos Santos et al., 2023). Quando ocorre a inibição ou desregulação da via Hippo, observa-se a desfosforilação da proteína YAP, resultando no acúmulo dessa proteína no núcleo celular. Uma vez no compartimento nuclear, a YAP interage com fatores de transcrição da família TEAD, promovendo a expressão gênica aumentada de proteínas da família *CCN* (envolvidas na regulação do crescimento celular) e de proteínas inibidoras de apoptose, como as BIRC (baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing). Esse conjunto de eventos moleculares contribui para a estimulação da proliferação, sobrevivência e crescimento celular, processos fundamentais para o desenvolvimento folicular (Clark et al., 2022; Kawamura et al., 2013; Figura 2).

Estudos recentes também apontam para uma complexa interação entre a via Hippo e outras

vias cruciais para a ativação folicular, como a via PI3K/Akt/mTOR, sugerindo que esses mecanismos de sinalização não atuam de forma isolada, mas sim em uma rede integrada que regula finamente o destino dos folículos ovarianos (Devos et al., 2023). Pesquisas com moduladores farmacológicos, como a esfingosina-1-fosfato (S1P), que atua inibindo LATS, ou o verteporfim (VERT), que bloqueia a interação YAP-TEAD, continuam a desvendar o potencial terapêutico de manipular essa via para controlar a ativação folicular e, possivelmente, retardar o esgotamento da reserva ovariana ou melhorar os resultados de tratamentos de fertilidade (Devos et al., 2023; Huang C. et al., 2024).

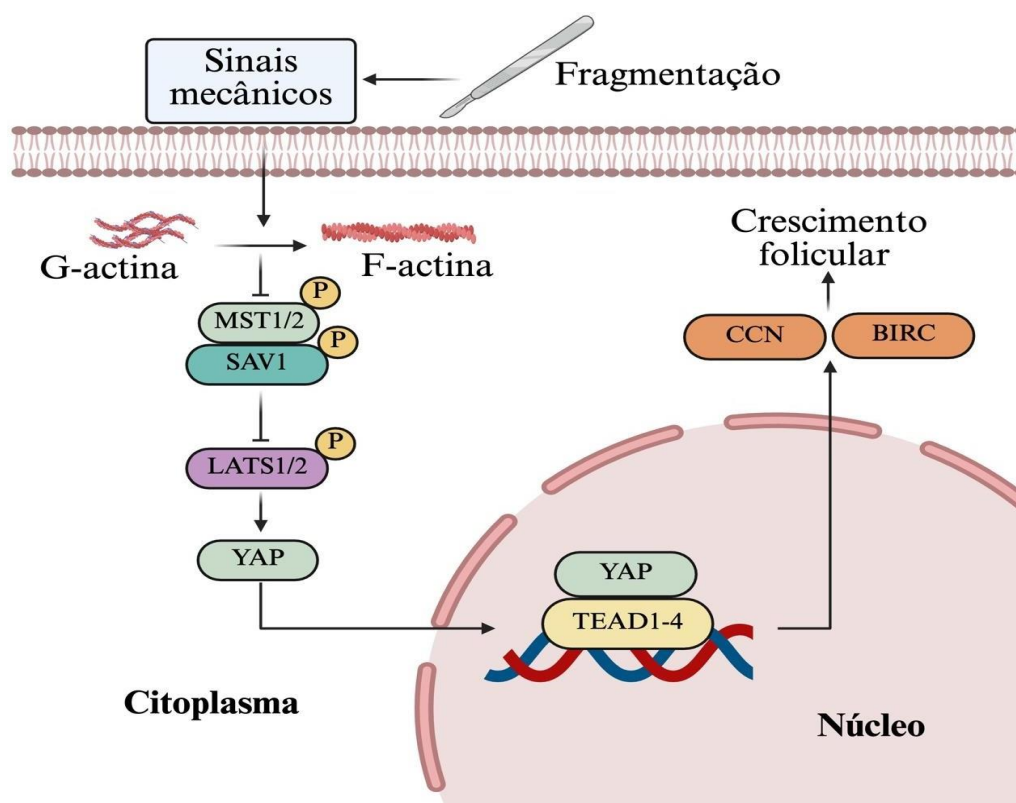


Figura 3. A interrupção da via Hippo em resposta a estímulos mecânicos no ovário. Estímulos como a fragmentação cirúrgica do córtex ovariano, incisões ou perfurações induzem a polimerização da actina, promovendo a conversão de G-actina (actina globular) em F-actina (actina filamentosa). Esta reorganização do citoesqueleto desencadeia a supressão da cascata de quinases da via Hippo, impedindo a fosforilação dos efetores YAP/TAZ. Na ausência de fosforilação, YAP (Yes-associated protein) transloca-se para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição TEAD (domínio de ligação transcricional aprimorado). Essa interação ativa a expressão de genes

alvo envolvidos na sobrevivência e proliferação celular, como *CCN2* (fator de crescimento do tecido conjuntivo) e *BIRC* (inibidores de apoptose contendo repetições do baculovírus), promovendo o crescimento e a ativação folicular.

Fonte: Costa (2025).

2.4 Crescimento de folículos primários e secundários

Com a ativação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa que circundam o oócito sofrem alterações morfológicas passando de pavimentosas a cúbicas. Estas, por sua vez, se multiplicam acompanhando o crescimento do oócito, dando origem ao folículo primário. Nesses folículos, as glicoproteínas que irão formar a zona pelúcida (Zona pelúcida 1 - ZP1, Zona pelúcida 2 – ZP2 e Zona pelúcida 3 – ZP3) (Lee et al., 2000; Rankin et al., 2001) começam a ser sintetizadas, tornando-se claramente visíveis apenas em folículos secundários (Matos et al., 2004). Em bovinos, o diâmetro dos folículos primários varia de 40 a 60 μm , com o oócito medindo cerca de 30 a 40 μm de diâmetro (Bizarro-Silva; Seneda, 2021). Embora a foliculogênese pré-antral não seja dependente de gonadotrofinas, os receptores para FSH (R-FSH) já são encontrados em folículos primários (Oktay et al., 1997).

Os fatores locais que agem no crescimento dos folículos primários para secundários são: GDF-9 (roedores: Nilsson, Skinner, 2002, 2003; Wang, Roy, 2004, cabras: Martins et al., 2008, mulheres: Hreinsson et al., 2002), BMP-7 (ratas: Lee et al., 2004), BMP-15 (ovelha: Galloway et al., 2000, roedores: Fortune, 2003), Ativina (vacas: Zoheir et al., 2017, ratas: Zhao et al., 2001, camundongas: Smitz et al., 1998, cabras: Silva et al., 2006), EGF (vacas: Gutierrez et al., 2000, roedores: Romano et al., 1994, mulheres: Roy, Kole, 1998, cabras: Silva et al., 2004), FGF-2 (vacas: Bartková et al., 2024), gatas: Jewgenow, 1996), ratas: Nilsson; Parrott.;Skinner, 2001) FGFb (vaca: Vernon; Spicer, 1994), Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β) (camundonga: Liu et al., 1999).

Com a contínua proliferação das células da granulosa, ocorre a formação do folículo secundário, caracterizado pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica ao redor do oócito. Durante esta fase, ocorre uma intensa atividade mitótica nas células da granulosa, que é regulada por inúmeros fatores, dentre os quais pode ser destacado o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (*PCNA*), uma proteína nuclear que atua como cofator para

a DNA polimerase e se expressa diferentemente de acordo com o ciclo celular. A sua taxa de síntese é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular. Essa proteína constitui-se em um marcador de células em proliferação, sendo expressa durante a replicação do DNA, no início da fase G1, com expressão máxima na fase S e declínio na fase G2 (Gan et al., 1995; Wandji et al., 1996). Sendo assim, um marcador operacional de proliferação celular marcando células tanto em proliferação como em células em reparo (Pich et al., 2025). A PCNA vai atuar quando três subunidades dessa proteína se ligam à braçadeira deslizante que está ligada à DNA polimerase durante a replicação do DNA.

Quando esses folículos apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa, ocorre o aparecimento das células da teca, aumentando a vascularização, possibilitando a atuação das gonadotrofinas nas células da granulosa e no oócito (Van Den Hurk; Zhao, 2005). As células da teca são originárias de células precursoras presentes no estroma ovariano (Honda et al., 2007) e apresentam características estruturais de células secretoras de esteróides, incluindo mitocôndria com cristas vesiculares, retículo endoplasmático agranular e vesículas lipídicas (Magoffin, 2005). A mitocôndria contém a primeira enzima na via esteroidogênica, a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol através do citocromo P450 - CYP11A e o retículo endoplasmático contém o restante das enzimas necessárias para produzir os andrógenos, que são necessários para a produção de estradiol nas células da granulosa. A expressão do RNAm que codifica as enzimas esteroidogênicas foi observada em células da teca de folículos pré-antrais de bovinos (Báo, Garverick, 1998).

O desenvolvimento das células da teca ao redor do folículo aumenta progressivamente sua vascularização, que está sob influência direta do VEGF. Em estudos recentes, foi demonstrado aumento da expressão de VEGF em células da teca de folículos de roedores, bovinos e suínos à medida que esses folículos alcançam o estágio de ovulação (Ravindranath et al., 1992; Redmer et al., 2001; Taylor et al., 2004). Por outro lado, a supressão de gonadotrofinas com um antagonista do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) resulta na redução da proliferação de células tecaais e endoteliais e em baixa densidade vascular nos folículos antrais (Taylor; Hillier; Fraser, 2004).

Evidências demonstram que os precursores das células da teca residem no estroma ovariano e são recrutados por fatores liberados pelos folículos após serem ativados. Com isso, alguns fatores podem ser responsáveis pelo recrutamento destas células, enquanto outros podem promover a diferenciação e a proliferação. Dentre esses fatores temos o KL (Parrot, Skinner 1997), FGFb

(Nilsson, Skinner, 2004), Fator inibidor da leucemia - LIF (Nilsson, Skinner et al., 2002) e Fator de crescimento do keratinócito - KGF (Price, 2016) que estão envolvidos no recrutamento do estroma, enquanto que o Hormônio luteinizante- LH e IGF (Magoffin, Weitsman, 1994), Insulina (Barbieri; Makris; Ryan, 1984), KL (Parrot, Skinner 1997), GDF-9 (Spicer et al., 2008; Otsuka; Mctavish; Shimasaki, 2011) e KGF (Parrot et al., 1994) estão envolvidos na proliferação e diferenciação das células da teca.

Estudos mostram que diversas citocinas e fatores de crescimento influenciam no crescimento de folículos secundários, entre eles pode-se destacar o GDF-9 (vacas: Spicer et al., 2008, cabras: Silva et al., 2005; Santos et al., 2023, camundongas: Hayashi et al., 1999; Demini et al., 2023), BMP-15 (ovelhas: Juengel et al., 2002), Ativina-A (vacas: McLaughlin; Telfer, 2010, ratas: Zhao et al., 2001, ovelhas: Thomas et al., 2003), TGF- β (camundongas: Liu et al., 1999), BMP-6 (vacas: Glister et al., 2004, ovelhas: Juengel, McNatty, 2005, cabras: Silva et al., 2006), BMP-7 (caprinos: Araújo et al., 2010), FGF-2 (caprinos: Almeida et al., 2012), EGF e IGF-1 (vacas: Gutierrez et al., 2000), Hormônio do Crescimento - GH (ratas: Liu et al., 1998) e FGFb (vacas: Wandji et al., 1996). Além dessas substâncias, gonadotrofinas como FSH em vacas (Gutierrez et al., 2000) e porcas (Mao et al., 2002) e LH em camundongas (Wu et al., 2000) também exercem esse efeito sobre os folículos secundários.

2. 5 Crescimento dos folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios)

Com o desenvolvimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em múltiplas camadas ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, que confere a classificação dos folículos terciários em antrais e posteriormente em pré-ovulatórios (Turley; Leong; Chan, 2024). Com o desenvolvimento desses folículos, as células da granulosa são diferenciadas em células do *cumulus* (mais próximas ao oócito) e células murais (Sugiura et al., 2023). O fluido antral formado é um composto rico em substâncias reguladoras derivadas do sangue (gonadotrofinas) que flui através dos capilares da teca ou das secreções das células foliculares, como por exemplo, esteróides, fatores de crescimento e proteoglicanos. A produção desse fluido é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos que ocorre com o desenvolvimento do folículo. A formação do líquido folicular ocorre em função da síntese de moléculas osmoticamente ativas oriundas das células da granulosa, como os

glicosaminoglicanos, que atuam carreando líquido para o interior do folículo, formando assim o fluido folicular. Em estudos anteriores foi evidenciado que a bomba de sódio contribui para o aumento da pressão osmótica na cavidade antral do folículo pré-ovulatório (Turley et al., 2024). Dentre os proteoglicanos que atuam na formação do antro, os mais importantes são as Hialuronidases sintetase 1 e 2 (HAS 1 e 2), Versican e Perlecan. Com isso, podemos destacar o ácido hialurônico que é sintetizado por três enzimas (HAS 1, HAS 2 e HAS 3) presentes nas células da granulosa. Sabe-se que a HAS 2 pode ser induzida por gonadotrofinas em células da granulosa de bovinos (Schoenfelder; Einspanier, 2003). Alguns estudos mostram que o proteoglicano sulfato de condroitina é um importante regulador do potencial osmótico no fluido folicular (Clarke et al., 2006). Em relação às outras proteínas, foi identificado que o Versican também está presente no fluido folicular de bovinos (Lemire et al., 2002; McArthur et al., 2000; Eriksen et al., 1999). Essa proteína, juntamente com outras do grupo das hialuronidases, é alvo de proteoglicanases ADAMTS, cuja regulação é essencial para o desenvolvimento folicular e a ovulação (Li et al., 2025). Outras proteínas como Perlecan (McArthur et al., 2000) e seus RNAs (Princivalle et al., 2001, Irving-Rodgers et al., 2004) foram detectadas em células da granulosa de folículos pré-antrais (McArthur et al., 2000) e antrais bovinos (McArthur et al., 2000). Com a progressão do desenvolvimento, os folículos antrais tornam-se dependentes de FSH. Com isso, o desenvolvimento desses folículos pode ser subdividido nas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (Van Den Hurk; Zhao, 2005). O recrutamento de um grupo de folículos antrais e a seleção de um folículo dominante são as principais características desta fase, e nas espécies monovulatórias, como a bovina, somente um folículo será ovulado (Baerwald et al., 2003), o que difere das multi-ovulatórias por mecanismos ainda não totalmente elucidados (Sirotkiv et al., 2017).

2.6 População folicular e atresia

A população folicular antral pode refletir processos que a antecedem, tais como a ativação folicular e a ocorrência de atresia via morte celular programada que ocorrem ao longo das diversas fases de desenvolvimento folicular. Além disso, existe uma relação positiva entre a população folicular pré-antral e a contagem folicular antral (Vasconcelos et al., 2020).

O número de folículos primordiais é estabelecido durante o desenvolvimento ovariano e tem sido estimado em aproximadamente 300.000 na vaca (Erickson et al., 1986). Conforme descrito

anteriormente, a foliculogênese ovariana é um processo biológico complexo que envolve diferentes tipos celulares e suas interações (Bonnet; Dalbiès-Tran; Sirard, 2008). O número de folículos primordiais, que constitui a reserva ovariana, é estabelecido durante o desenvolvimento fetal e apresenta grande variação entre indivíduos (Koyama et al., 2024; Cushman et al., 2024). Essa reserva sofre um declínio progressivo e natural ao longo da vida reprodutiva do animal (Monferini et al., 2024).

Dos milhares de folículos presentes nos ovários bovinos ao nascimento, os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular, sendo que 95% desse total é composto por folículos primordiais (Cushman et al., 2024). Todavia, apesar da grande população folicular, cerca de 99,9% não atingem a ovulação, pois morrem por um processo natural denominado atresia (Orozco-Galindo et al., 2025). Esse processo tem a capacidade de reduzir significativamente o número de oócitos que seriam ovulados, diminuindo, assim, o potencial reprodutivo das fêmeas.

A atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (Vo; Kawamura, 2021; Figueiredo et al., 2008). A via degenerativa da atresia inicia-se com a redução da oxigenação celular durante a isquemia, resultando na diminuição da produção de ATP, afetando o funcionamento da bomba de sódio e potássio presente na membrana celular. Isso resulta no aumento de íons sódio (Na^+), acúmulo de íons cálcio (Ca^{2+}), aumento do volume de água intracelular, agregação da cromatina, vacuolização citoplasmática, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Além da isquemia, outros fatores que podem levar à degeneração são estímulos tóxicos, degenerativos e imunológicos. Com a evolução da degeneração, a morte celular é identificada histologicamente como necrose (Padanilam et al., 2003; Barros; Hermosilla, Castro, 2001). Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local.

A apoptose ou morte celular programada pode ser reconhecida por algumas características morfológicas e bioquímicas como a retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, as mitocôndrias podem apresentar ruptura da membrana externa e a cromatina sofre condensação (Ziegler; Groscurth, 2004). Outra característica marcante da apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA e formação de “corpos apoptóticos” (Saraste; Pulkki, 2000). A apoptose é um fenômeno pelo qual os folículos que não são selecionados para ovular são eliminados. Esse processo é altamente dependente da expressão de genes (Barnett et al., 2006). O balanço estabelecido entre os genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos pode determinar a apoptose

(Hussein, 2005). Além disso, os inibidores de proteínas de apoptose (IAPs) estão envolvidos na sobrevivência de folículos (Slot et al., 2006; Fujino et al., 2008).

A progressão da apoptose pode ser dividida nas fases de iniciação, execução e terminação. A fase de iniciação pode ser promovida por fatores que irão ativar a via extrínseca, tais como citocinas (ex. Fator de Necrose tumoral- α , *Fas ligand*) e proteínas virais ou pela remoção de fatores de crescimento. Essa fase de execução também pode ser induzida por fatores que irão ativar a via intrínseca, tais como a irradiação ou o estresse oxidativo. Independentemente dos tipos de via, ocorre o envolvimento de uma ou mais caspases de iniciação, conhecidas como caspase 8 e caspase 9 (Ahmed; Tait, 2025; Nadendla et al., 2025). A fase de execução é caracterizada por mudanças na membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação do DNA. Esta fase é considerada irreversível e ocorre devido à ativação das caspases efetoras (caspase 3, caspase 6 e caspase 7). Finalmente, a fase de terminação consiste na fagocitose de corpos apoptóticos fragmentados através de um processo não inflamatório (Johnson, 2003). A apoptose ovariana na rota extrínseca está ligada à ativação de fatores tais como o *FAZ* (ligado à morte celular) que inicia uma cascata de eventos envolvendo a ativação de proteínas pró-apoptóticas, sendo a *BAX* um importante marcador dessa atividade. Nessa rota de eventos, a *GADD45* é também outro marcador associado ao reparo de DNA, indicando a funcionalidade das células foliculares (Portela et al., 2015).

O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (Zhang et al., 2025). Após a formação do folículo antral ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa (Rodgers et al., 2010).

2.7 Contagem de Folículos Antrais em Bovinos: Aspectos Conceituais, Metabólicos, Moleculares e Aplicações Biotecnológicas

A contagem de folículos antrais (CFA), definida pelo número de folículos visualizados por ultrassonografia, é uma ferramenta difundida em estudos de fertilidade por sua correlação direta com a reserva de folículos nos ovários (Moon et al., 2025). O valor da CFA como ferramenta prognóstica

é reforçado por sua alta repetibilidade dentro do mesmo indivíduo e pela grande variação observada entre diferentes animais (Gobikrushanth et al., 2017; Koyama; Koyama; Sugimoto, 2018).

Os folículos antrais constituem um pool de estruturas sensíveis às gonadotrofinas, com potencial para completar seu desenvolvimento e ovular. Assim, a CFA não apenas atua como um indicador da capacidade reprodutiva, mas também fornece informações sobre o estado metabólico da fêmea, influenciando tanto os desfechos biológicos quanto a eficiência econômica do sistema produtivo (Morotti et al., 2022).

Folículos ovarianos com mais de 2 mm de diâmetro podem ser detectados por ultrassonografia. Segundo Burns et al. (2005), os ovários podem ser classificados de acordo com a contagem de população folicular antral encontrada em baixa (<15 folículos antrais; n=20), intermediária (16-20 folículos antrais; n = 20), alta (21-25) e muito alta (>25) quantidade de folículos antrais (Burns et al., 2005). Durante a fase folicular inicial, folículos antrais saudáveis têm 4 a 6 mm de diâmetro (Gougeon, Lefevre, 1983) e o número de pequenos folículos antrais (2-5 mm) está altamente correlacionado com o número de folículos antrais maiores (2 a 10 mm; $r = 0,95$; $P < 0,001$). Portanto, a contagem de folículos antrais identificáveis de 2 a 10 mm de diâmetro via ultrassonografia transretal é o método mais prático e eficaz na predição da fertilidade e reserva ovariana da fêmea (Bancsi et al., 2002).

O número de folículos antrais está positivamente associado às variadas mensurações indiretas de fertilidade em espécies monovulatórias, como em bovinos e humanos. Modina et al. (2014) observaram que vacas de alta produção de leite com contagem folicular antral baixa (<10 folículos antrais por ovário) e descartadas por baixa fertilidade foram caracterizadas histologicamente por senescência ovariana prematura comparadas com vacas de faixa etária semelhante (4 - 8 anos), descartadas por outros motivos.

A aplicação da CFA como ferramenta de seleção de doadoras para programas de produção de embriões tem sido amplamente documentada. Estudos evidenciam correlação positiva entre a CFA e o número de ovócitos viáveis recuperados por sessão de aspiração folicular (OPU), bem como com a quantidade de embriões produzidos *in vitro* (Bó et al., 2015; Zangirolamo et al., 2018). Pesquisas demonstraram que a concentração sérica do hormônio antimülleriano (AMH), produzido pelas células da granulosa de folículos antrais pequenos e altamente correlacionado com a CFA, apresenta associação positiva com o número de ovócitos viáveis recuperados em programas comerciais de PIVE. Em vacas das raças Bonsmara, Braford e Brangus, os coeficientes de correlação

entre AMH e ovócitos viáveis variaram de 0,32 a 0,63, e entre AMH e embriões produzidos, de 0,16 a 0,39 (Bó GA et al., 2015). Em fêmeas da raça Senepol, foi detectada relação expressiva entre CFA e ovócitos viáveis ($R^2 = 0,96$), ovócitos clivados ($R^2 = 0,69$) e total de embriões produzidos ($R^2 = 0,34$), indicando que doadoras com alta CFA podem produzir maior quantidade de ovócitos e embriões (Faria, 2020).

Além disso, a CFA também exerce influência considerável sobre os mecanismos hormonais e metabólicos em bovinos. Os achados indicam que animais com baixa CFA apresentam concentrações elevadas de colesterol e reduzidas de BHBA, sugerindo um balanço metabólico mais vantajoso e uma possível superioridade na atividade lútea. Em contrapartida, vacas classificadas com alta CFA demonstram maior desenvolvimento folicular, o que parece acarretar incremento na demanda energética, refletido em níveis superiores de BHBA (Tohumcu et al., 2025). Tais observações reforçam a relevância da CFA não apenas como indicador da capacidade reprodutiva, mas também como parâmetro associado ao status metabólico energético, consolidando seu papel como biomarcador promissor na avaliação integrada da fêmea leiteira.

A compreensão dos mecanismos moleculares que diferenciam fêmeas com alta e baixa CFA tem avançado significativamente. Estudos transcriptômicos em novilhas Nelore revelaram padrões distintos de expressão gênica em oócitos e células do cumulus de acordo com a categoria de CFA. Nos oócitos de animais com baixa CFA, observou-se expressão aumentada de 11 genes, incluindo *BMP15*, *HAS2*, *EGFR*, *H1FOO* e *IGFBP2*, enquanto genes como *TFAM*, *PRDX3* e *XBP1* apresentaram expressão diminuída em comparação com oócitos de alta CFA. Coletivamente, esses genes estão relacionados à comunicação intercelular, controle meiótico, modulação epigenética, recrutamento folicular e respostas celulares ao estresse (De Lima et al., 2020).

Apesar dos avanços reportados na literatura, não foram identificados, até o momento, estudos que tenham investigado a associação entre a classificação da CFA e o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino, com enfoque na ativação de folículos primordiais e na expressão de genes-chave para o desenvolvimento folicular inicial. Espera-se que os achados desta pesquisa possam contribuir para o refinamento de protocolos de cultivo de tecido ovariano e para a compreensão mais aprofundada da biologia folicular em fêmeas bovinas com distintos potenciais reprodutivos.

2. 8 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* (CIV) de folículos pré-antrais (FPAs) tem se destacado como uma das linhas de pesquisa mais promissoras. Essa metodologia consiste na coleta dos folículos presentes na região cortical do ovário e seu subsequente cultivo em laboratório, com o objetivo de permitir seu desenvolvimento. Dessa forma, o sistema funciona como um ovário artificial, capaz de mimetizar etapas da foliculogênese fora do organismo (Figueiredo et al., 2020; Zhang; Zhang; Sheng, 2024). O CIV de FPAs foi inicialmente concebido para investigar os mecanismos que regulam o crescimento folicular e a maturação oocitária. Atualmente, suas aplicações potenciais incluem a obtenção de oócitos competentes para fertilização em programas de reprodução assistida, a preservação da fertilidade de fêmeas ameaçadas de extinção ou de alto mérito genético, o atendimento a mulheres que enfrentam tratamentos gonadotóxicos, além da avaliação de substâncias bioativas (Figueiredo et al., 2020).

O cultivo pode ser realizado a partir de fragmentos da camada cortical ou até mesmo de ovários inteiros, desde que mantida a estrutura estromal original (Tanaka et al., 2021). O comportamento dos FPAs nesse ambiente é fortemente modulado pela organização e composição do tecido que os envolve (Simon; Kumar; Duncan, 2020). O córtex ovariano é composto por uma diversidade de tipos celulares como fibroblastos, células imunes, pericitos e endoteliais imersos em uma MEC rica em proteínas estruturais, incluindo colágeno, elastina, fibronectina e laminina. Essa rede tridimensional não apenas sustenta fisicamente as células, mas também lhes confere estímulos bioquímicos e biomecânicos fundamentais para a manutenção da arquitetura folicular (Grosbois et al., 2023; Grubliauskaitė et al., 2024). As células do estroma, em particular, exercem funções que vão além do suporte estrutural: elas medeiam a comunicação intercelular no microambiente ovariano, transmitindo sinais que são captados pelas células da granulosa e pelo oócito (Sheng et al., 2022).

Durante o período de cultivo, a MEC sofre alterações dinâmicas na região adjacente aos folículos, o que resulta em diminuição da tensão mecânica local e melhora na difusão de oxigênio e de fatores regulatórios. Essas mudanças criam condições mais favoráveis à reativação do desenvolvimento folicular *in vitro* (Grosbois et al., 2023). Nesse contexto, a manutenção das conexões entre os folículos, as células estromais e a MEC mostra-se determinante para o sucesso do cultivo, influenciando diretamente a sobrevivência e o avanço folicular (Vitale; Dolmans, 2024; Costa et al., 2025).

A configuração experimental mais adotada para o cultivo de fragmentos de córtex ovariano continua sendo a placa de cultura convencional. Nesse sistema, os explantes teciduais são mantidos submersos em uma camada fixa de meio líquido, sob atmosfera controlada com concentrações definidas de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) (Catapano et al., 2019).

Estudos recentes têm explorado o cultivo de tecido ovariano bovino como modelo experimental para estimular o crescimento folicular em condições controladas, conforme documentado por diversos autores nos últimos anos (Cavalcante et al., 2019; Costa et al., 2022; Caetano et al., 2024; Da Silva et al., 2024; Bezerra et al., 2024; Costa et al., 2025; Barroso et al., 2025).

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- 1) A ativação dos folículos primordiais está intimamente ligada à maior quantidade de folículos antrais, indicando assim maior fertilidade desses animais.

- 2) O EGF, GDF-9 associados ou não entre si e ao FSH, mantêm a viabilidade folicular e influenciam positivamente a ativação de folículos primordiais bovinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano cultivados *in vitro*.
- 3) O EGF e o GDF-9 associados ou não ao FSH afetam positivamente a expressão de RNA mensageiro para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* em folículos primordiais bovinos cultivados *in vitro*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Demonstrar a existência de uma relação entre a quantidade de folículos antrais superficiais e as taxas de ativação de folículos primordiais durante o cultivo *in vitro*.

- Desenvolver um meio de cultivo, que contenha EGF, GDF-9 e/ou FSH, definindo as melhores proporções entre estes, para suportar o crescimento e ativação *in vitro* de um grande número de folículos primordiais.

5.2 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão dos RNAs mensageiros para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* em fragmentos ovarianos bovinos, antes e após o cultivo *in vitro*.
- Analisar morfológicamente os folículos pré-antrais bovinos inclusos em tecido ovariano e cultivados *in vitro* por seis dias.
- Avaliar a ativação e sobrevivência do folículo primordial, densidade de células estromais ovarianas e distribuição de colágeno na matriz extracelular.

6 CAPÍTULO 1

Influência da contagem de folículos antrais sobre parâmetros morfológicos, ativação

**folicular, matriz extracelular e expressão gênica (*PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*) em folículos
pré-antrais bovinos cultivados *in vitro***

**Artigo redigido conforme a NBR 6023 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da contagem de folículos antrais (CFA) na morfologia, ativação folicular, densidade estromal, distribuição de colágeno na matriz extracelular (MEC) e expressão gênica do antígeno nuclear de proliferação celular (*PCNA*), fator de crescimento e diferenciação – 9 (*GDF-9*) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (*CCN2*) em fragmentos de córtex ovariano bovino cultivados *in vitro*. Ovários de vacas cruzadas (n = 12 pares) foram coletados em abatedouro, transportados ao laboratório e classificados de acordo com a CFA em

três grupos: baixa (≤ 15 folículos), média (16–30 folículos) e alta (≥ 31 folículos). Fragmentos do córtex ovariano (3 mm $\times$ 3 mm $\times$ 1 mm) foram cultivados por seis dias em meio α -MEM suplementado com insulina, transferrina e selênio (ITS), glutamina, hipoxantina, antibióticos e albumina sérica bovina, a 38,5 °C e 5% de CO₂. Amostras não cultivadas e cultivadas foram processadas para análise histológica (morfologia folicular, densidade estromal e fibras colágenas) e quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real. Os tecidos com CFA média e alta apresentaram maior sobrevivência folicular que a CFA baixa ($p < 0,05$). Após o cultivo, todas as classes ativaram folículos primordiais, porém a CFA média promoveu maior ativação folicular que as demais ($p < 0,05$). Quanto à porcentagem de colágeno, a CFA média preservou maior quantidade de colágeno após o cultivo ($p < 0,05$) comparada à CFA baixa e alta. A densidade estromal foi maior nos tecidos não cultivados, sem diferença entre as classes após o cultivo ($p > 0,05$). A expressão de *PCNA* não foi alterada pelo cultivo em nenhuma CFA ($p > 0,05$). Nos tecidos não cultivados, *CCN2* foi maior na CFA média. Após o cultivo, as expressões de *GDF-9* e *CCN2* foram maiores na CFA alta. Na CFA média houve maior ativação folicular, preservação do colágeno e expressão adequada de *CCN2* e *GDF-9*, apesar da redução da densidade estromal em todas as classes. Esses achados evidenciam a influência da reserva folicular inicial no sucesso do cultivo *in vitro*, contribuindo para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas.

Palavras-chave: biotécnicas reprodutivas; córtex ovariano; reserva ovariana; sobrevivência folicular.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of antral follicle count (AFC) on morphology, follicle activation, stromal density, collagen distribution in the extracellular matrix (ECM), and gene expression of proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*), growth differentiation factor-9 (*GDF-9*), and connective tissue growth factor (*CCN2*) in cultured bovine ovarian cortex fragments. Ovaries from Holstein/Zebu crossbred cows (n = 12 pairs) were collected at a slaughterhouse, transported to the laboratory, and classified according to AFC into three groups: low (≤ 15 follicles), medium (16–30 follicles), and high (≥ 31 follicles). Ovarian cortex fragments (3 mm $\times$ 3 mm $\times$ 1 mm) were cultured for six days in α -MEM medium supplemented with ITS, glutamine, hypoxanthine,

antibiotics, and bovine serum albumin, at 38.5 °C and 5% CO₂. Non-cultured and cultured samples were processed for histological analysis (follicular morphology, stromal density, and collagen fibers) and gene expression quantification by real-time PCR. Follicular survival was higher in tissues with medium and high AFC compared to low AFC ($p < 0.05$). After culture, all classes activated primordial follicles, but medium AFC promoted greater follicular activation than the others ($p < 0.05$). Regarding collagen percentage, medium AFC preserved a higher amount of collagen after culture ($p < 0.05$) compared to low and high AFC. Stromal density was higher in non-cultured tissues, with no difference between classes after culture ($p > 0.05$). *PCNA* expression was not altered by culture in any AFC ($p > 0.05$). In non-cultured tissues, *CCN2* was higher in medium AFC. After culture, *GDF-9* and *CCN2* expression were higher in high-AFC samples. Medium AFC showed greater follicular activation, collagen preservation, and adequate expression of *CCN2* and *GDF-9*, despite the reduction in stromal density across all classes. These findings highlight the influence of initial follicular reserve on the success of *in vitro* culture, contributing to the improvement of reproductive biotechniques.

Keywords: reproductive biotechniques; ovarian cortex; ovarian reserve; follicular survival.

1 INTRODUÇÃO

A reserva ovariana é composta por um número finito de folículos primordiais formados ainda na vida fetal. A maioria permanece quiescente e poucos são ativados para crescer, geralmente culminando em atresia (Wu et al., 2021). Compreender os mecanismos que regulam essa reserva é essencial para aprimorar biotécnicas reprodutivas, como o cultivo *in vitro* de folículos, visando à produção de oócitos competentes para reprodução assistida, preservação genética e conservação da biodiversidade (Ferré et al., 2020; Silva et al., 2024).

Para isso, é fundamental conhecer o potencial reprodutivo do indivíduo, e um dos métodos para avaliar indiretamente essa reserva é a contagem de folículos antrais (CFA), uma técnica não invasiva que quantifica os folículos visíveis na superfície ovariana e correlaciona-se positivamente com o tamanho do pool de folículos primordiais (Moon et al., 2025). Estudos demonstram que a CFA está positivamente associada à competência reprodutiva, influenciando a quantidade de oócitos viáveis recuperados, a produção *in vitro* de embriões (Bó et al., 2015), os perfis hormonais e metabólicos (Tohumcu et al., 2025), além de se correlacionar com padrões distintos de expressão gênica em oócitos de doadoras com baixa e alta CFA (De Lima et al., 2020). No entanto, o impacto direto da CFA na capacidade intrínseca do tecido ovariano de responder ao cultivo *in vitro* ainda é pouco explorado. Acredita-se que a densidade folicular inicial possa influenciar não apenas a taxa de ativação, mas também a dinâmica de remodelação da matriz extracelular (MEC) e a viabilidade do estroma, componentes cruciais que atuam como nicho regulador do crescimento folicular (Berkholtz, Shea e Woodruff, 2006; Woodruff; Shea, 2011).

A MEC, rica em fibras de colágeno, fornece suporte estrutural e sinalizações bioquímicas que modulam a proliferação celular e o desenvolvimento folicular (Irving-Rodgers; Rodgers, 2003; Picton et al., 2008). Alterações na rigidez e na composição do estroma podem afetar a disponibilidade de fatores de crescimento locais (Grosbois et al., 2023). Dentre esses fatores, destacam-se o GDF-9 (Fator de Diferenciação e Crescimento 9), produzido pelo oócito e essencial para a ativação e a progressão foliculares (Anderson; Pankhurst 2025), e o *CCN2* (Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo 2) também conhecido como CTGF, uma proteína da matriz envolvida na angiogênese, na remodelação tecidual e na sinalização parácrina entre o estroma e os folículos em crescimento (Abulghasem; Price 2025). Acompanhando esses processos, o PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) atua como um marcador clássico da proliferação das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular (Oktay et al., 1995).

Diante do exposto, considerando a hipótese de que fatores determinantes da reserva folicular (avaliada pela CFA) podem modular a resposta do tecido ovariano ao cultivo *in vitro*, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes classes de CFA (baixa, média e alta) na morfologia, ativação folicular, densidade estromal, distribuição de colágeno na MEC e na expressão gênica de *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* em fragmentos de córtex ovariano bovino submetidos ao cultivo *in vitro* por seis dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados após a aprovação do projeto com protocolo de número 010/23 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, Brasil. O experimento foi conduzido no LABIREP (Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução) vinculado à Universidade Federal do Ceará (UFC).

2.1. Produtos químicos

Os meios de cultura e outros produtos químicos utilizados no estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, EUA).

2.2 Obtenção e classificação dos ovários

Ovários (n = 12 pares) de vacas cruzadas Holandês-Zebu foram coletados em um abatedouro local. Imediatamente após o abate, os ovários foram lavados uma vez em álcool 70% durante 20 segundos e duas vezes em solução salina 0,9% e transportados até o laboratório em solução salina contendo antibióticos (100 IU/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina) a 4 °C, em um período máximo de 1 hora. No laboratório, todos os folículos antrais visíveis na superfície dos ovários foram contados e marcados sequencialmente para evitar duplicidade. Os ovários (um por animal, sem distinção de lado) foram classificados de acordo com uma adaptação do protocolo de Burns et al. (2005), nos seguintes grupos: baixa (≤ 15 folículos antrais; n = 4), média (16–30 folículos antrais; n = 4) e alta (≥ 31 folículos antrais; n = 4). Foram realizadas quatro repetições de cada classe de CFA (baixa, média e alta).

2.3 Cultivo *in vitro* dos fragmentos

Após a classificação dos ovários em diferentes CFAs, os tecidos do córtex ovariano de cada vaca (n = 12) foram cortados em 12 fragmentos (3 mm × 3 mm × 1 mm) em α -MEM suplementado com estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 µg/mL). Para cada vaca (CFA baixa, média e

alta), quatro fragmentos corticais foram fixados em formaldeído tamponado neutro (10%) por 24 h a 4 °C para avaliar a morfologia folicular, a densidade de células estromais e a distribuição das fibras de colágeno na MEC por histologia clássica. Dois fragmentos do córtex também foram armazenados a -80 °C para avaliar a expressão gênica de mRNA (*PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*). Os outros seis fragmentos foram cultivados *in vitro*, em placas de cultivo de 24 poços durante seis dias, a 38,5 °C em 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada. O meio de cultura utilizado foi o α -MEM (pH 7,2–7,4) suplementado com ITS (10 μ g/mL de insulina, 5,5 μ g/mL de transferrina e 5 ng/mL de selênio), glutamina 2 mM, hipoxantina 2 mM, antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina. Os fragmentos foram cultivados em 1 mL de alfa-MEM em cada poço e a cada dois dias, metade (500 μ L) do meio de cultivo foi substituída por meio fresco. Foram realizadas duas repetições por placa de cultivo (Figura 1). Após o período de cultivo de seis dias, os fragmentos ovarianos foram destinados à análise da morfologia do tecido e da expressão gênica.

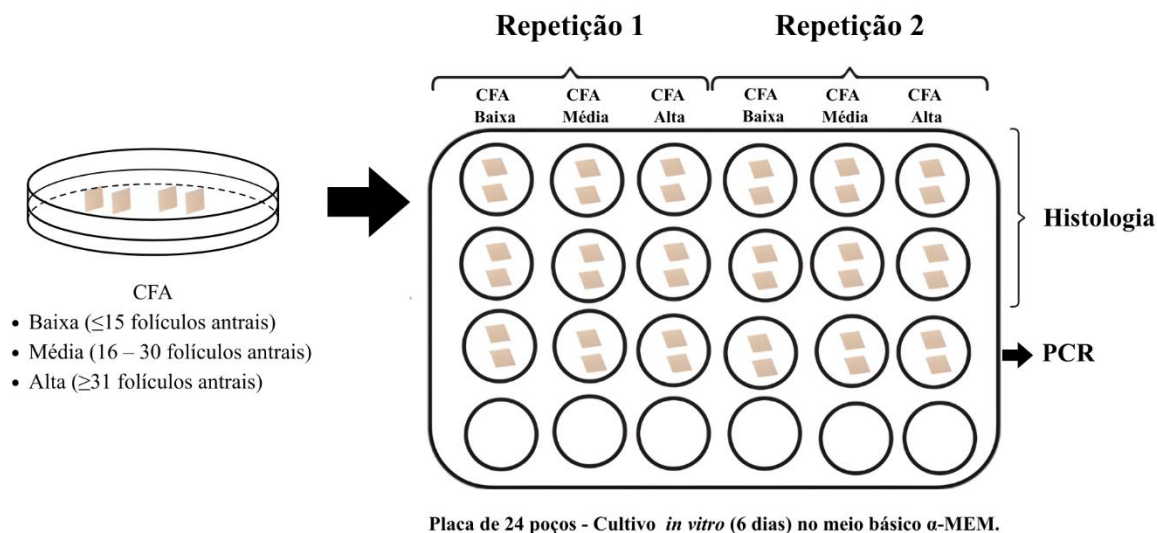


Figura 1. Protocolo de cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano bovino (3 × 3 × 1 mm) provenientes de ovários classificados quanto à CFA baixa, média e alta, de acordo com Burns et al.(2005), cultivados em meio básico α -MEM por seis dias, destinados a análises histológicas e de reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.4 Avaliação da ativação e sobrevivência folicular *in vitro*

Após seis dias de cultivo *in vitro*, os fragmentos ovarianos foram fixados por 24 horas à temperatura ambiente em 4 % de paraformaldeído em solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4), para estudos de análise histológica. Após a fixação, os fragmentos de tecido foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificados com xileno e embebidos em cera de parafina. Para cada pedaço de córtex ovariano, seções de 7 µm foram montadas em lâminas e coradas com eosina e hematoxilina. Lâminas anonimizadas codificadas foram examinadas sob um microscópio ótico (Nikon, Eclipse, TS 100, Tokyo, Japan) com ampliação de $\times 100$ e $\times 400$ por um único observador. Os folículos foram classificados como primordiais (uma camada de células granulosas achatadas ao redor do oócito) ou em desenvolvimento (primários: uma camada de células granulosas cuboides ao redor do oócito e secundários: duas ou mais camadas de células granulosas cuboides ao redor do oócito) de acordo com (Figueiredo; Lima, 2017). Estes folículos também foram classificados como normais: oócito intacto, cercado por células da granulosa, organizadas em uma ou mais camadas, sem núcleo picnótico; degenerados: oócito retraído, com núcleo picnótico e/ou circundado por células da granulosa desorganizadas, separadas da membrana basal, de acordo com Silva et al. (2000). Foram avaliados 200 folículos aleatoriamente por tratamento.

2.5 Avaliação da densidade de células estromais ovarianas

A avaliação da densidade celular estromal foi realizada em tecidos não cultivados e em tecidos cultivados por seis dias, nas classes baixa, média e alta de CFA. Para cada animal, 15 campos aleatórios de diferentes cortes de todos os animais foram avaliados com o auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio (Nikon, Eclipse, TS 100, Japão), e as imagens foram analisadas pelo software *Image J* (versão 1.51). O número de células estromais foi contado manualmente em uma área de 100 µm² conforme descrito anteriormente (Cavalcante et al., 2019). Todas as avaliações e medições foram realizadas por um único operador.

2.6 Análise da matriz extracelular

As fibras colágenas presentes na matriz extracelular do córtex ovariano foram visualizadas

usando o método de coloração *Picrosirius Red* (Kit Abcam), conforme descrito por Rittié (2017) com algumas adaptações. Resumidamente, secções de 7 µm de espessura foram desparafinadas em xileno e incubadas em solução de Sirius Red (0,1%) por 1 hora à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido com solução ácida acética (0,5%), seguido da desidratação dos cortes e da montagem em lâminas para observação em um microscópio óptico (Nikon, Eclipse, TS 100, Tóquio, Japão) com ampliação de 400×. A análise foi realizada em 15 campos diferentes de cada animal, utilizando uma câmera DS Cooled DS-Ri1 acoplada ao microscópio. As imagens foram processadas utilizando o software Image J (versão 1.51p, 2017) para medir a porcentagem da área ocupada por fibras colágenas. A coloração *picrosirius* marcou exclusivamente as fibras colágenas em vermelho, enquanto os folículos permaneceram incolores. O *software* automaticamente excluiu a área dos folículos não corados da contagem total de área marcada em vermelho. A intensidade da coloração das fibras colágenas foi quantificada medindo a intensidade média dos pixels na área visualizada, após a subtração do fundo.

2.7 Quantificação de RNAs mensageiros para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*

A quantificação dos RNAs mensageiros, *primers* específicos para bovinos de *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* nos folículos pré-antrais foi realizada após 0 e 6 dias de cultivo, a partir das amostras de tecido ovariano armazenadas a -80 °C. Primeiramente, o isolamento do RNA total e a digestão do DNA foram realizados com um kit de purificação Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para isto, 800 µL de solução Trizol® foram adicionados a cada amostra congelada, sendo o lisado, em seguida, aspirado através de agulhas de calibre 20 antes de serem centrifugados a 10.000 g por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os lisados foram diluídos 1:1 em 70% de etanol e colocados em uma minicoluna presente no kit. Após ligação do RNA à coluna, a digestão do DNA foi realizada com a utilização de DNase livre de RNase (340 Kunitz units/ml) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem das colunas por três vezes, o RNA foi coletado com 30 µl de água ultra-pura.

As amostras de RNA foram avaliadas quanto à sua qualidade e quantidade num espectrofotômetro (BioDrop, Cambridge, Inglaterra) através da leitura da absorbância a 260 nm e verificação da pureza a 280 nm. Antes da reação de transcrição reversa, as amostras de RNA foram incubadas por 5 minutos a 70 °C e em seguida resfriadas em gelo. A transcrição reversa foi

realizada em um volume total de 20 µl composto de 10 µl da amostra de RNA, 4 µl de tampão da transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 8 unidades de RNasein, 150 unidades de transcriptase reversa Superscript III, 0,036 U de primers aleatórios, 10 mM de DTT e 0,5 mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A mistura foi incubada a 42 °C por 1 hora, em seguida a 80 °C por 5 minutos e, posteriormente, estocada a -20 °C. O controle negativo foi preparado nas mesmas condições, mas sem adição de transcriptase reversa.

A quantificação dos RNA mensageiros para os fatores envolvidos em apoptose foi realizada com a utilização de SYBR Green. Cada reação em tempo real (15 µl) possuía 7,5 µl de SYBRGreen Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5,5 µl de água ultra-pura, 1 µl de cDNA e 0,5 µM de cada *primer*. Os *primers* foram projetados para amplificar especificamente RNAs mensageiros para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* (Tabela 1). As reações de amplificação do cDNA por PCR consistiram de desnaturação inicial e ativação da polimerase por 10 minutos a 95 °C, seguidas por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 30 segundos a 72 °C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a 72 °C. Todas as reações foram realizadas em um instrumento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), que foi expresso no mesmo nível em todas as células, foi utilizado para normalizar as quantidades iniciais do material. As curvas de dissociação foram analisadas após a amplificação para garantir que havia apenas um produto e que não havia dímeros formados pelos *primers*. Finalmente, 10 µl do produto foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio. Um marcador de DNA, a cada 100 pares de bases (Gibco BRL), foi incluído como referência para identificar os fragmentos de DNA amplificados.

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados em PCR em tempo real.

Gene alvo	Sequência do primers (5'→3')	Sentido (S), Antissenso (As)	Número de acesso do Genbank
<i>GAPDH</i>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	S	GI: 402744670
	ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	AS	
<i>PCNA</i>	TGCCGAGATCTCAGTCACAT	S	GI:77735938
	STATGGCAACAGCTTCCTCCT	AS	
<i>GDF-9</i>	ACAACACTGTTTCGGCTCTTCACCC	S	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	AS	
<i>CCN2</i>	AGCTGACCTGGAGGAGAACA	S	GI: 1740302
	GTCTGTGCACACTCCGCAGA	AS	

2.8 Análise estatística

As porcentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento, bem como daqueles morfológicamente normais após seis dias de cultivo, nas diferentes categorias de CFA foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (GraphPad Prism). Dados sobre a distribuição de fibras colágenas, a densidade de células estromais, bem como os níveis de mRNA para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* foram analisados por ANOVA e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito das diferentes CFAs na morfologia folicular

A Figura 2 ilustra folículos normais e degenerados em amostras de tecido ovariano após seis dias de cultivo *in vitro*. A proporção de folículos morfológicamente normais nos tecidos ovarianos foi maior nas classes de CFA média e alta do que na CFA baixa ($p < 0,05$), porém não houve diferença significativa entre as duas primeiras classes (CFA média e alta; Figura 2).

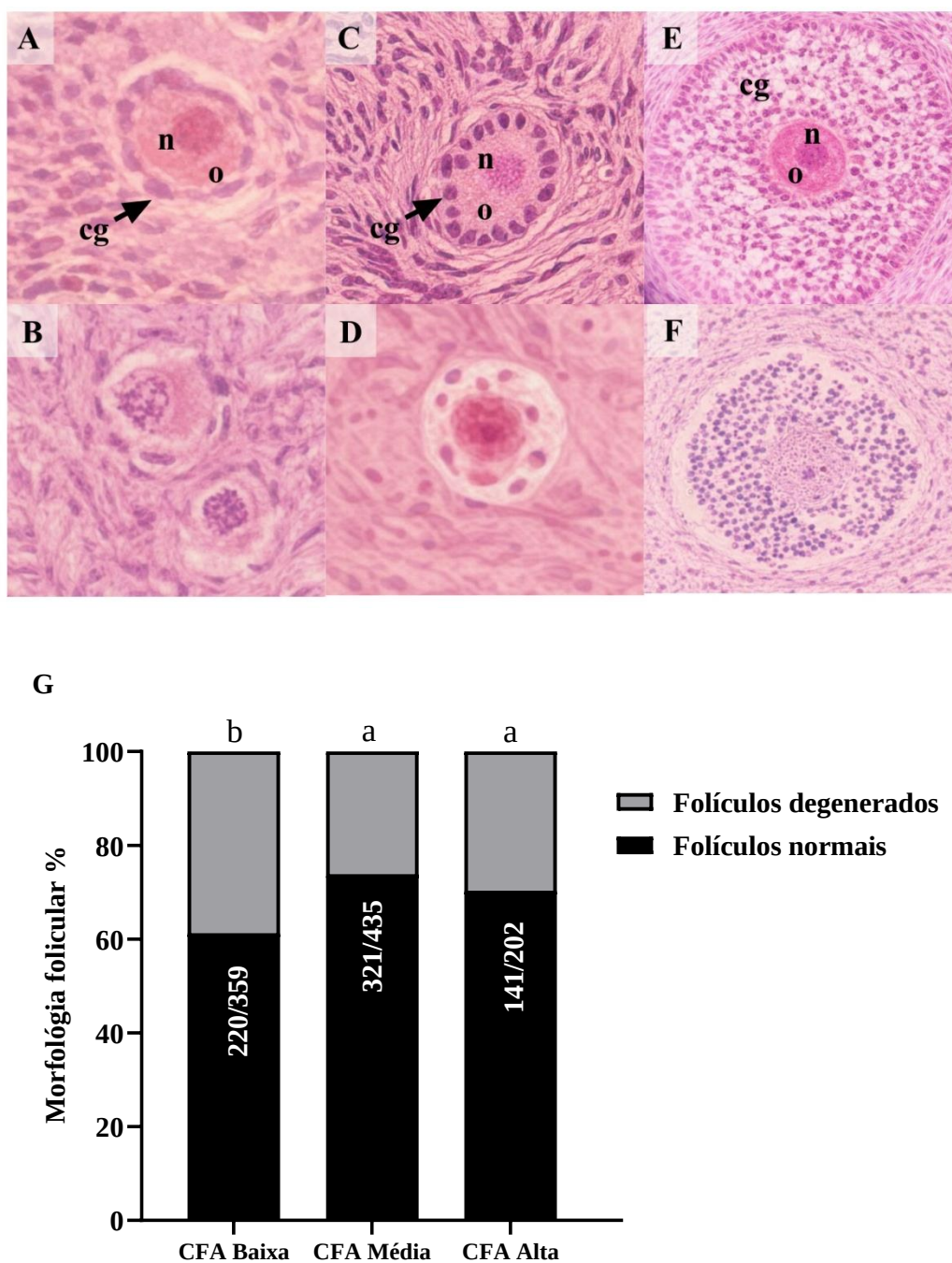
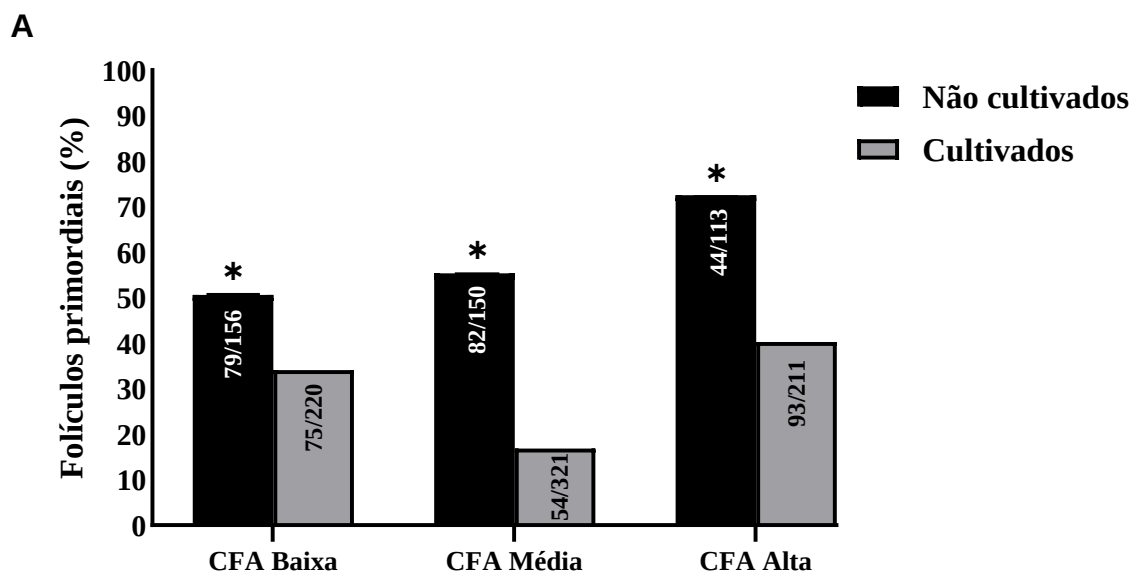


Figura 2. Morfologia (A–F) e percentagens (G) de folículos normais em amostras cultivadas durante seis dias em meio (α -MEM) de ovários classificados com CFA baixa, média e alta. Observam-se folículos normais e, em atresia, nas fases primordial (A, B), primária (C, D) e secundária (E, F). Células da granulosa (cg); oócito (o); núcleo do oócito (n). Letras distintas

(a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$). O número de folículos normais e o total de folículos avaliados encontram-se indicados no interior de cada coluna.

3.2 Relação entre as classes de CFAs na ativação e no desenvolvimento de folículos primordiais

Os tecidos não cultivados apresentam predominantemente folículos na fase primordial (Figura 3A). Após seis dias de cultivo, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) na proporção de folículos em desenvolvimento (Figura 3B) em todas as classes de CFA avaliadas, quando comparadas aos tecidos não cultivados. No entanto, os tecidos ovarianos cultivados com CFA média exibiram proporção significativamente maior ($p < 0,05$) de folículos em desenvolvimento em relação àqueles cultivados com CFA baixa ou CFA alta, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$; Figura 4).



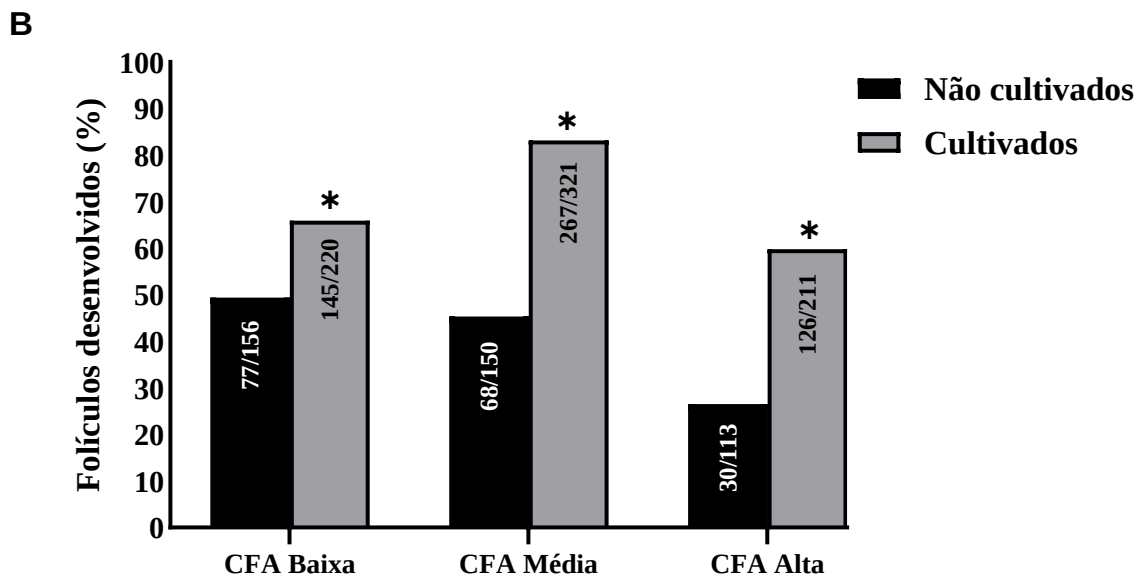


Figura 3. Incidência de folículos primordiais (A) e em desenvolvimento (B) em amostras não cultivadas e em amostras cultivadas por seis dias em meio (α -MEM) de ovários classificados com CFA baixa, média e alta. O número de folículos primordiais e em desenvolvimento avaliados é indicado em cada coluna. *Difere significativamente dos tecidos não cultivados ($p < 0,05$).

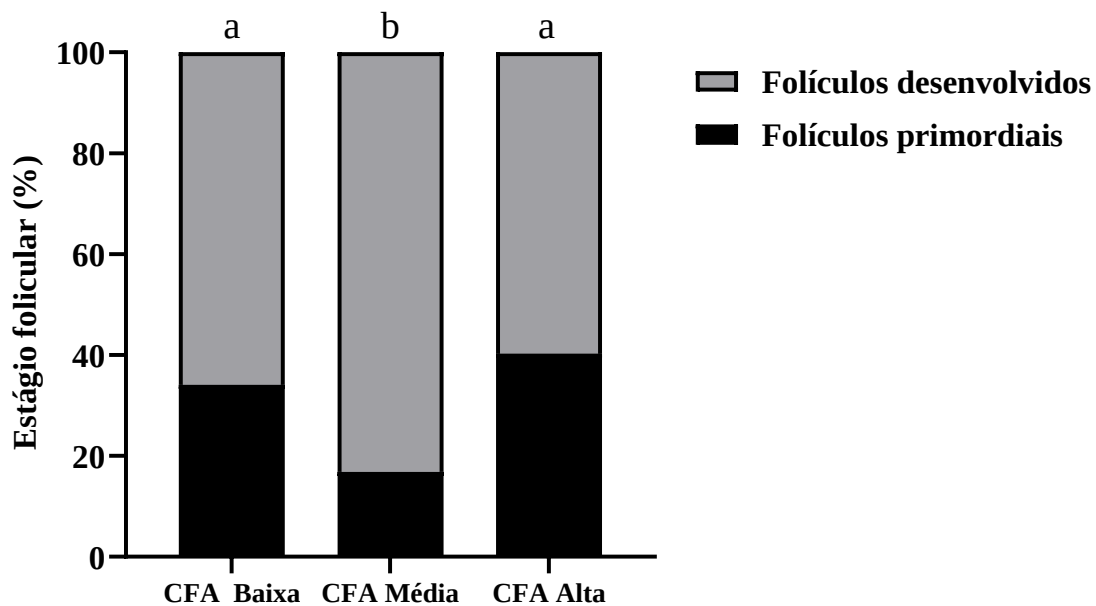


Figura 4. Proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento em amostras cultivadas durante seis dias em meio (α -MEM) de ovários classificados com CFA baixa, média e alta. Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$). Barra de escala = 100 μ m.

3.3 Avaliação das fibras de colágeno e da densidade celular do estroma

Os tecidos ovarianos classificados como CFA baixa e alta apresentaram redução significativa na porcentagem de colágeno na matriz extracelular após o cultivo *in vitro* ($p < 0,05$). Em contraste, os tecidos com CFA média apresentaram maior porcentagem de fibras colágenas quando cultivados, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$; Figura 5).

Entre os tecidos cultivados, não houve diferença significativa na densidade estromal entre as diferentes classes de CFA ($p > 0,05$). No entanto, os tecidos não cultivados apresentaram maior densidade de células estromais em comparação aos tecidos cultivados, independentemente da classe de CFA avaliada (Figura 6).

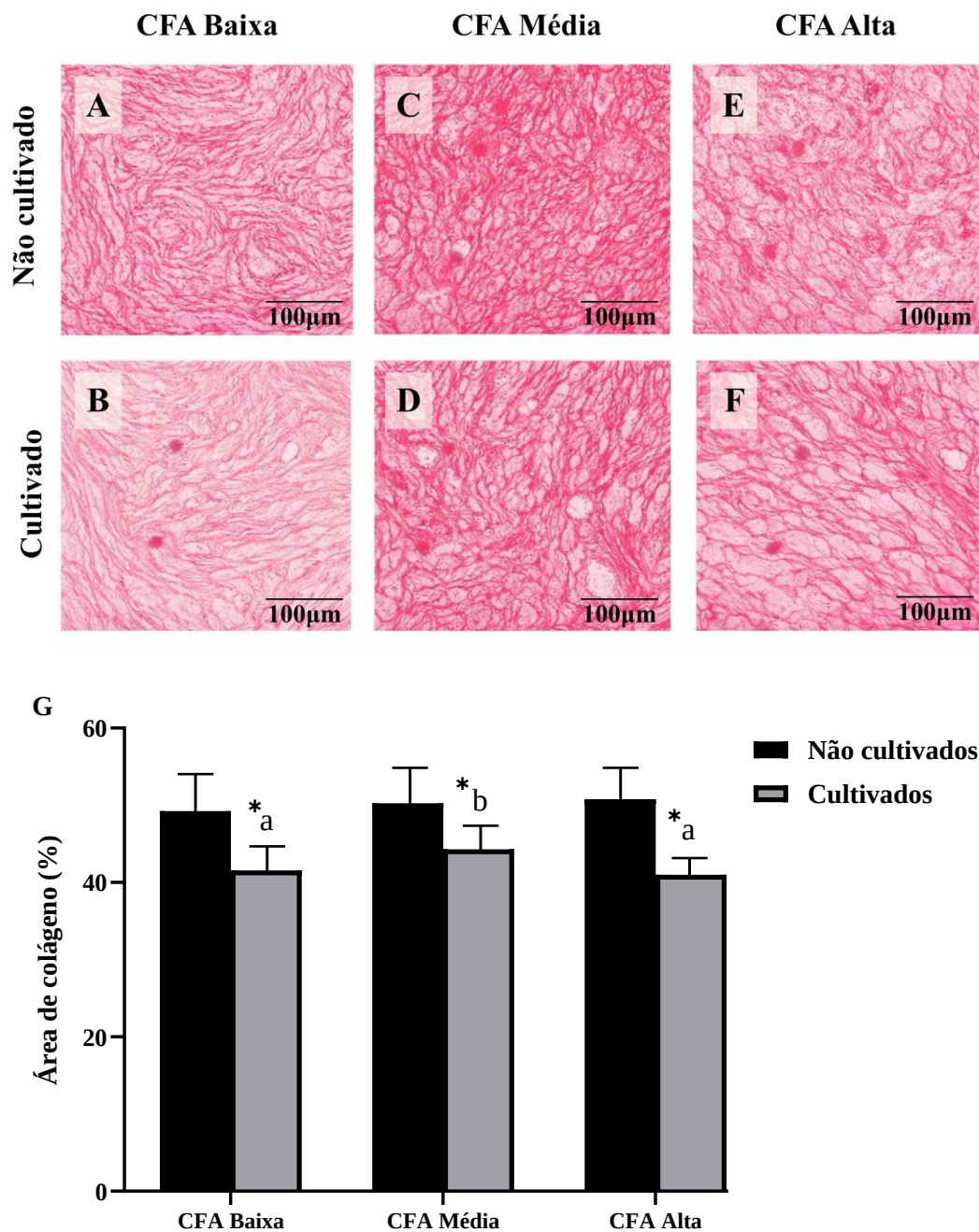


Figura 5. Morfologia (A–F) e percentual da área de colágeno (G) em amostras não cultivadas e cultivadas por seis dias em meio de cultivo (α -MEM) em ovários com CFA baixa, média e alta. *Difere significativamente dos tecidos não cultivados correspondentes a cada CFA ($p < 0,05$). Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$). Barra de escala = 100 μ m.

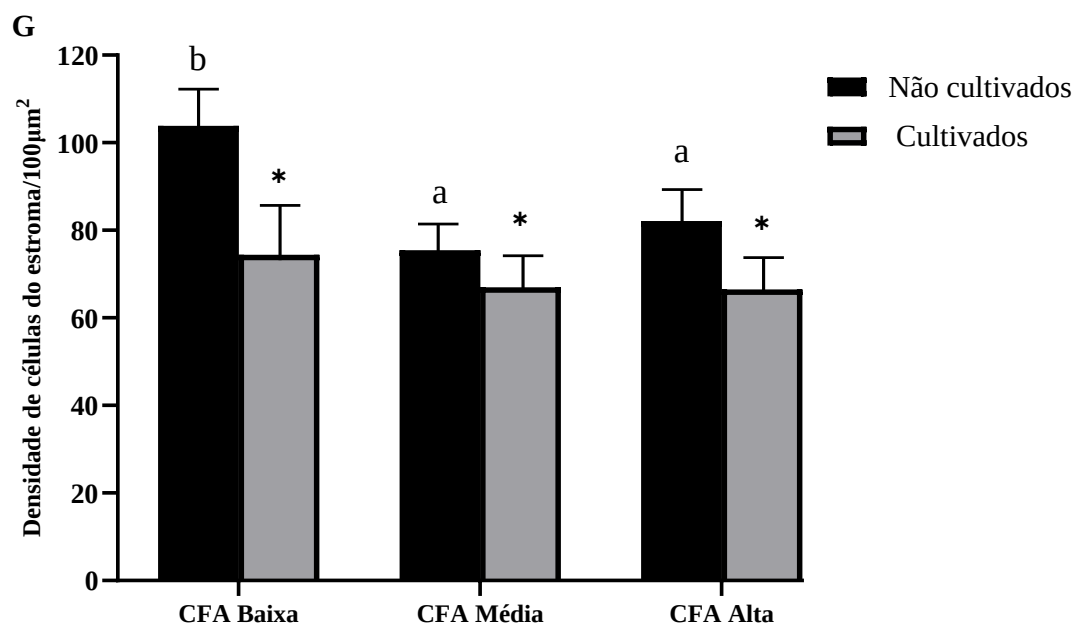
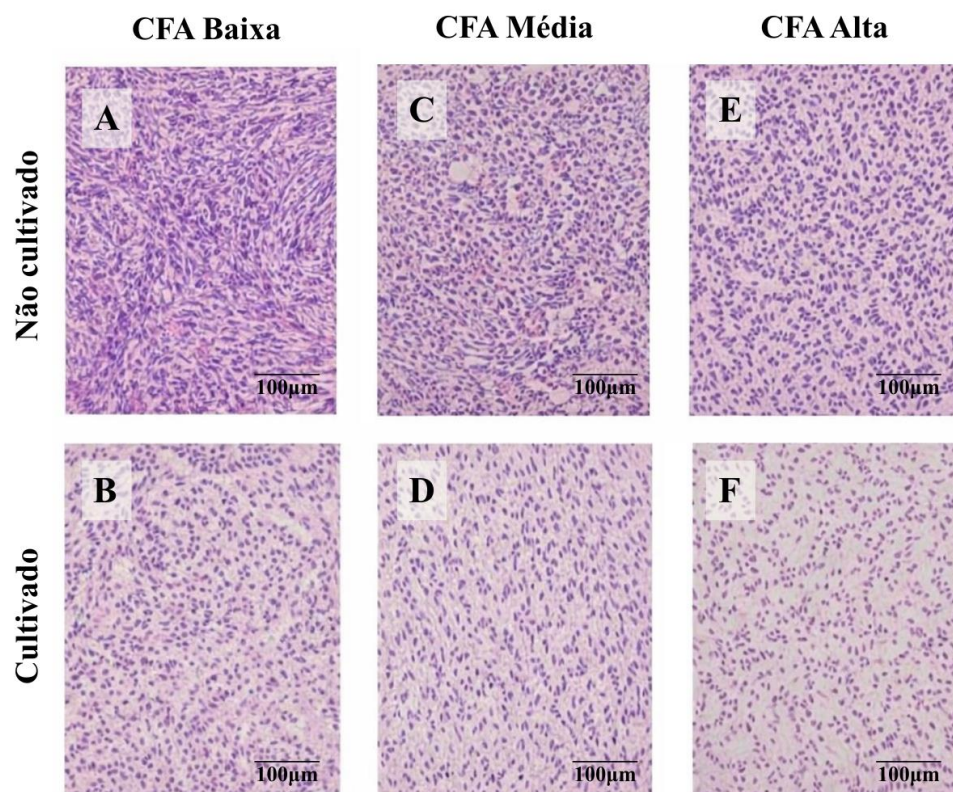
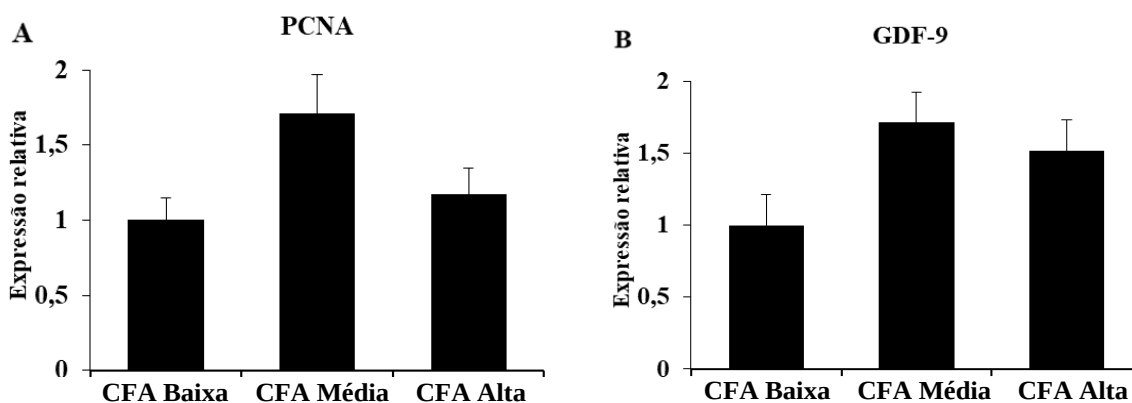


Figura 6. Morfologia (A a F) e número (média $\pm$ E.P.M.) de células do estroma (G) em amostras não cultivadas e cultivadas por seis dias em meio de cultivo (α -MEM) em ovários com CFA baixa, média e alta. *Difere significativamente dos tecidos não cultivados correspondentes a cada CFA ($p < 0,05$). Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos não cultivados ($p < 0,05$). Barra de escala = 100 μ m.

3.4 Avaliação da expressão gênica para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*

A expressão de mRNA para *PCNA* não foi influenciada pelo cultivo *in vitro* dos tecidos ovarianos em meio α -MEM, independentemente da classe de CFA avaliada (Figura 7). Resultado semelhante foi observado para a expressão de *GDF-9* nos tecidos não cultivados. Em relação ao *CCN2*, os níveis de mRNA foram maiores nos tecidos não cultivados com CFA média quando comparados àqueles com CFA baixa ou alta, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Figura 7 C). Em tecidos cultivados, para *GDF-9*, o grupo CFA alta apresentou maior expressão, diferindo da CFA média, enquanto a CFA baixa apresentou valores intermediários, não diferindo dos demais (Figura 8 B). Para a *CCN2*, a maior expressão foi observada em CFA alta, diferindo da CFA média, enquanto a CFA baixa apresentou valores intermediários, sem diferença em relação aos grupos (Figura 8 B).



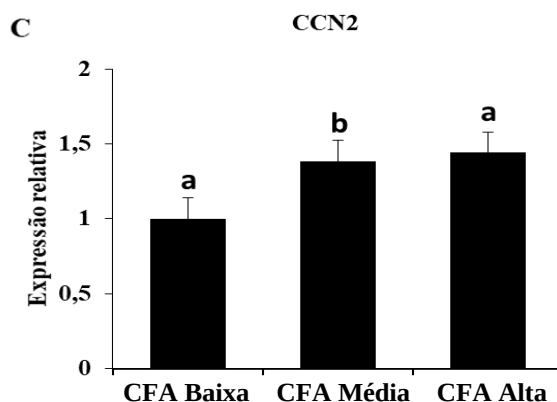


Figura 7. Expressões relativas de mRNA (média $\pm$ E.P.M.) para *PCNA* (A), *GDF-9* (B), *CCN2* (C) em amostras não cultivadas *in vitro* durante seis dias em meio de cultivo (α -MEM) em ovários com CFA baixa, média e alta. Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos não cultivados ($p < 0,053$).

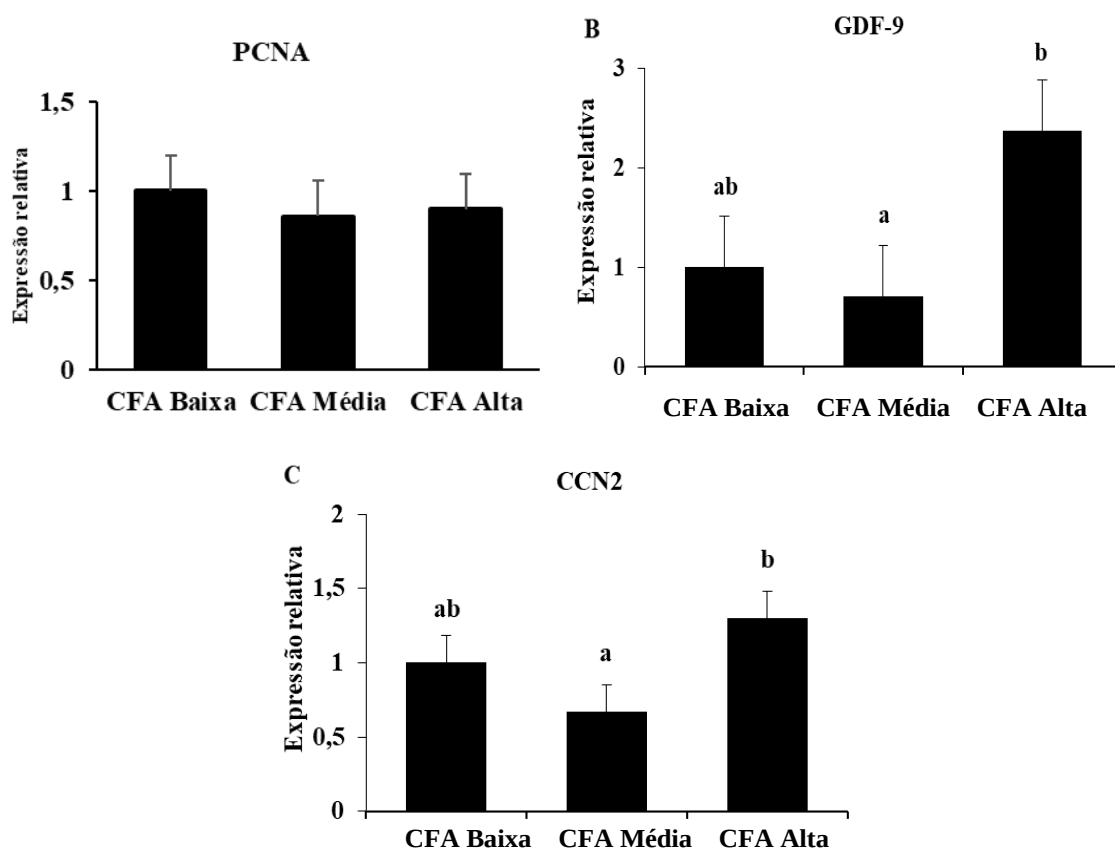


Figura 8. Expressões relativas de mRNA (média $\pm$ E.P.M.) para *PCNA* (A), *GDF-9* (B), *CCN2* (C) em amostras cultivadas *in vitro* durante seis dias em meio de cultivo (α -MEM) em ovários com CFA baixa, média e alta. Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, pioneiramente, que a reserva folicular ovariana, avaliada segundo classes de CFA, modula a resposta do córtex ovariano bovino ao cultivo *in vitro*. Anteriormente, a CFA já é consolidada como ferramenta eficaz para predizer o potencial reprodutivo de doadoras (Bó Ga et al., 2015; Zangirolamo et al., 2018) estando positivamente correlacionada com a produção de oócitos e embriões (Bó Ga et al., 2015), associada a perfis metabólicos distintos (Tohumcu et al., 2025) e a padrões diferenciais de expressão gênica em oócitos e células do cumulus relacionados à competência celular (De Lima et al., 2020). Os resultados revelam que tecidos provenientes de ovários com CFA média (16-30 folículos) apresentam resposta tecidual mais equilibrada e favorável após seis dias de cultivo, caracterizada pela maior proporção de folículos em desenvolvimento, melhor preservação da MEC e taxas de sobrevivência folicular intermediárias. Em contraste, os extremos da CFA baixa e alta resultaram em fenótipos de cultivo distintos e potencialmente menos vantajosos para a manutenção da homeostase tecidual a longo prazo.

A ativação folicular é um processo complexo que envolve a integração de sinais inibitórios e estimulatórios provenientes do estroma e da MEC (Rodgers; Irving-Rodgers, 2010; Woodruff; Shea, 2007). O cultivo induziu a ativação folicular em todas as classes de CFA, o que era esperado devido à liberação da pressão inibitória exercida por fatores ovarianos intrínsecos (Grosbois et al., 2023). No entanto, o grupo de CFA média destacou-se por apresentar a maior taxa de transição de folículos primordiais para o desenvolvimento. Este achado sugere que uma densidade folicular inicial intermediária pode criar um microambiente mais propício à ativação. Uma hipótese é que uma quantidade muito baixa de folículos (CFA baixa) resulte em um nicho com sinalização parácrina insuficiente para sustentar a ativação em larga escala (Sirotkin et al., 2017; Anderson; Pankhurst, 2025), enquanto uma densidade muito alta (CFA alta) poderia levar a uma competição exacerbada

por fatores de crescimento locais ou a uma inibição física/mecânica mais intensa (Wang; Yang, 2025), refletida na menor taxa de ativação observada.

A integridade da MEC é importante para o cultivo de tecidos, pois atua como reservatório de fatores de crescimento e suporte estrutural (Picton et al., 2008; Dadashzadeh et al., 2025). Nossos dados mostram que o cultivo induziu uma perda significativa de colágeno nos grupos de CFA baixa e alta, enquanto o grupo de CFA média foi capaz de manter uma porcentagem maior de colágeno no MEC. Essa preservação diferencial da MEC no grupo CFA média pode explicar, em parte, sua maior taxa de ativação folicular, uma vez que a rigidez e a composição da matriz são sensores mecânicos que influenciam diretamente o destino celular e a disponibilidade de fatores como o GDF-9 (Grosbois et al., 2023). A manutenção do colágeno sugere uma remodelação mais controlada no grupo CFA médio. Paralelamente, a redução da densidade de células estromais após o cultivo em todas as CFAs (Figura 6) era esperada, refletindo a adaptação do tecido às condições *in vitro* (Grosbois et al., 2023). Essa redução está diretamente ligada à ativação folicular. No ovário, o estroma e a MEC formam um nicho mecânico que comprime os folículos primordiais, mantendo-os quiescentes via regulação do FOXO3 (Grosbois et al., 2023; Wang, Yang, 2025). O cultivo *in vitro* reduz a densidade estromal e degrada a MEC, aliviando essa pressão e desencadeando a translocação do FOXO3, o que ativa os folículos (Grosbois et al., 2023). Assim, essa redução não é mera degeneração, mas parte da adaptação tecidual que permite a ativação folicular.

Para investigar os mecanismos moleculares subjacentes a essas diferenças fenotípicas, foi avaliada a expressão de genes-chave. A ausência de alteração na expressão de *PCNA* entre os grupos (Figuras 7A e 8A) sugere que, no período de 6 dias, o potencial proliferativo das células da granulosa não é o principal fator limitante ou diferencial entre as classes de CFA. Esse resultado está em concordância com estudos em caprinos que demonstraram manutenção da expressão de *PCNA* em células da granulosa após 5 dias de cultivo, apesar da ativação folicular observada (Silva et al., 2004). Entretanto, contrasta com estudos em outros contextos, onde a expressão de *PCNA* varia significativamente durante o desenvolvimento folicular (Takekida et al., 2003), em resposta a fatores como $TNF\alpha$ e $TGF\beta$ (Deguchi et al., 1996) ou a diferentes concentrações de agentes farmacológicos (Cardone et al., 2026).

Nos tecidos não cultivados, a expressão de *CCN2* foi maior no grupo CFA média

(Figura 7C), sugerindo que um nicho com reserva intermediária já possui uma assinatura molecular mais favorável à remodelação tecidual e à sinalização parácrina (Silva et al., 2009; Abulghasem, Price, 2025). Após o cultivo, observou-se uma inversão: o grupo CFA alta tornou-se o de maior expressão para ambos os genes (Figuras 8B e 8C). Esse aumento pode ser interpretado de duas maneiras não mutuamente exclusivas. Primeiro, pode ser uma resposta compensatória do tecido com alta densidade folicular para tentar gerenciar a intensa atividade de remodelação e sinalização necessária para sustentar tantos folículos em um ambiente *in vitro* limitado. Segundo, considerando que o *GDF-9* é produzido pelo oócito (Anderson, Pankhurst, 2025) e o *CCN2* pelo estroma (Rageh et al., 2001), o aumento coordenado de ambos pode indicar uma tentativa de comunicação bidirecional mais intensa no grupo de CFA alta, possivelmente como um sinal de estresse, dado que a taxa de ativação nesse grupo foi menor. Isso contrasta com o grupo CFA média, que, partindo de uma base mais sólida (maior *CCN2 ex vivo*), alcançou um equilíbrio funcional sem necessitar de uma superexpressão gênica compensatória pós-cultivo. Isso acontece, pois o *CCN2* é responsável por manter a homeostase da matriz extracelular (Kubota; Takigawa, 2015), conferindo resiliência tecidual quando expresso em níveis basais adequados, reduzindo a necessidade de respostas transcricionais exacerbadas durante o cultivo (Hsueh; Kawamura, 2020).

5 CONCLUSÃO

Na CFA média (16-30 folículos) houve maior ativação folicular, preservação da porcentagem de colágeno na matriz extracelular e manutenção das expressões basais adequadas de *CCN2* e *GDF-9* após o cultivo *in vitro* de tecidos ovarianos bovinos. O cultivo *in vitro*, no entanto, reduz a densidade de células estromais independentemente da classe de CFA avaliada.

O microambiente mais favorável ao desenvolvimento folicular na CFA média no cultivo de folículos ovarianos fornece informações importantes sobre a influência da reserva folicular inicial no sucesso do cultivo *in vitro*, contribuindo para o aprimoramento de técnicas reprodutivas tanto em animais quanto em humanos. Essa é uma constatação original e formulada, para nosso conhecimento, pela primeira vez na espécie bovina, sendo que estudos sequenciais são necessários.

REFERÊNCIAS

- ABULGHASEM, E. A.; PRICE, C. A. The influence of CCN family proteins on ovarian physiology and pathology. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 37, RD24199, maio 2025.
- ANDERSON, N. J.; PANKHURST, M. W. Is preovulatory follicle selection influenced by the production of oocyte-secreted factors? **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 37, RD24149, maio 2025.
- BERKHOLTZ, C. B.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Extracellular matrix functions in follicle maturation. **Seminars in Reproductive Medicine**, New York, v. 24, n. 4, p. 262-269, set. 2006.
- BÓ, G. A. et al. Serum antimullerian hormone concentrations and *in vitro* embryo production in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 28, n. 2, p. 219, 2015.
- BURNS, D. S. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, n. 1, p. 54-62, jul. 2005.
- CARDONE, D. A. et al. Concentration-dependent effects of allopregnanolone on bovine pre-antral follicles in ovarian cortical tissue cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 249, 117655, 2026.
- CAVALCANTE, B. N. et al. Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 54, p. 1567–1573, 2019.
- DADASHZADEH, A. et al. Engineering the ovarian niche: Environmental control of folliculogenesis *in vitro*. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 175, 103639, 2025.
- DE LIMA, M. A. et al. Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, 19557, nov. 2020.
- DEGUCHI, J. et al. Tumor necrosis factor alpha regulates the proliferative activity and differentiated function of granulosa cells: *in vitro* study with a porcine model. **Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, Tokyo, v. 48, n. 11, p. 1043-1050, 1996.
- FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production:

reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020.

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F. Artificial ovary technology: applications, state of art, limitations and prospects. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 41, n. 1, p. 248-253, 2017.

GROSBOIS, J.; BAILIE, E. C.; KELSEY, T. W.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during *in vitro* culture. **Human Reproduction, Oxford**, v. 38, n. 3, p. 444-458, mar. 2023.

HSUEH, A. J. W.; KAWAMURA, K. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients. **Fertility and Sterility**, New York, v. 114, n. 3, p. 458-464, 2020.

KUBOTA, S.; TAKIGAWA, M. Cellular and molecular actions of *CCN2/CTGF* and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, London, v. 128, n. 3, p. 181-196, 2015.

MOON, J. et al. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count as predictors for optimal selection of Hanwoo donor cows in superstimulated oocyte collection. **Journal of Animal Science and Technology**, Seoul, v. 67, n. 4, p. 773-785, jul. 2025.

OKTAY, K.; SCHENKEN, R. S.; NELSON, J. F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 53, n. 2, p. 295-301, ago. 1995.

PICTON, H. M. et al. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703-715, 2008.

RAGEH, M. A. E. et al. Steroidal regulation of connective tissue growth factor (*CCN2*; *CTGF*) synthesis in the mouse uterus. **Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology**, v. 54, n. 5, p. 338-346, 2001.

RITTIÉ, L. Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1627, p. 395–407, 2017.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. The roles of the ovarian extracellular matrix in fertility. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 67, p. 217-230, 2010.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; RUSSELL, D. L. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. **Reproduction**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 415-424, 2003.

SILVA, B. R. et al. Melatonin acts through different mechanisms to control oxidative stress and primordial follicle activation and survival during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Domestic Animal Endocrinology**, Amsterdam, v. 86, 106824, 2024.

SILVA, J. R. V. et al. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 273-286, 2004.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 71, n. 8, p. 1193-1208, 2009.

SILVA, J.R. et al. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 809-822, 2000.

SIROTKIN, A. V. et al. Interrelationships between ovarian follicles grown in culture and possible mediators. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 1, p. 97-104, 2017.

TAKEKIDA, S. et al. GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 202, n. 1-2, p. 155-164, 2003.

TOHUMCU, V. et al. Hormonal and metabolic effects on antral follicle count in dairy cows. **Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Şanlıurfa, v. 14, n. 1, p. 25-30, 2025.

WANG, H.; YANG, L. Ovarian Mechanobiology: Understanding the Interplay Between Mechanics and Follicular Development. **Cells**, Basel, v. 14, n. 5, 355, 2025.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 28, n. 1, p. 3-6, jan. 2011.

WOODRUFF, Teresa K.; SHEA, Lonnie D. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 14, n. 8 Suppl, p. 6-10, 2007.

WU, Z.; LIU, K.; ZHANG, C. Clinical applications of *in vitro* primordial follicle activation. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 18, p. 194–200, 2021.

ZANGIROLAMO, A. F. et al. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3, p. 310-315, jul./set. 2018.

7 CAPITULO 2

Efeito do FSH, EGF e GDF-9 sobre o crescimento, a ativação e a expressão gênica (*PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*) em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro*

Artigo redigido conforme a NBR 6023 (ABNT, 2025) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

A reserva ovariana de folículos pré-antrais é crucial para a fertilidade, e sua ativação é regulada por fatores como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) e hormônios como o hormônio folículo-estimulante (FSH). Embora seus efeitos individuais sejam conhecidos, estudos sobre suas interações no cultivo *in vitro* são escassos. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação com FSH, EGF e GDF-9, isolados ou associados, sobre a ativação, sobrevivência e qualidade de folículos pré-antrais bovinos classificados com contagem de folículos antrais (CFA) média, cultivados por seis dias. Fragmentos de córtex ovariano com CFA média foram cultivados em meio essencial mínimo alfa (α -MEM) suplementado com diferentes combinações: 100 ng/mL de FSH, 10 ng/mL do EGF, 200 ng/mL do GDF-9, EGF (10 ng/mL) em associação com GDF-9 (200 ng/mL) e FSH (100 ng/mL) associado com EGF (10 ng/mL) e GDF-9 (200 ng/mL). Foram analisadas a morfologia folicular, densidade estromal, distribuição de colágeno e expressão gênica do antígeno nuclear de proliferação celular (*PCNA*), do *GDF-9* e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (*CCN2*). Os resultados foram analisados por qui-quadrado, análise de variância (ANOVA) e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A associação EGF + GDF-9 promoveu maior porcentagem de folículos morfologicamente normais entre os grupos cultivados, não diferindo do controle não cultivado ($p > 0,05$). Todos os tratamentos aumentaram a proporção de folículos em desenvolvimento, sendo as maiores taxas de ativação observadas nos grupos EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH. A associação EGF + GDF-9 apresentou maior porcentagem de colágeno em comparação aos demais grupos cultivados ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas na expressão de *PCNA* e *GDF-9* entre os tratamentos ($p > 0,05$). Conclui-se que a associação EGF + GDF-9 é a estratégia mais eficaz para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos com CFA média, promovendo maior sobrevivência e ativação folicular, preservando a matriz extracelular e o microambiente estromal via regulação positiva de *CCN2*. A adição de FSH não proporcionou benefícios adicionais, indicando que a sinalização conjunta de EGF e GDF-9 é suficiente para otimizar a foliculogênese inicial *in vitro*.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; fatores de crescimento; folículos ovarianos; sobrevivência.

ABSTRACT

The ovarian reserve of preantral follicles is crucial for fertility, and its activation is regulated by factors such as follicle-stimulating hormone (FSH), epidermal growth factor (EGF), and growth differentiation factor-9 (GDF-9). Although their individual effects are well known, studies on their interactions during *in vitro* culture are scarce. This study aimed to evaluate the effect of supplementation with FSH, EGF, and GDF-9, alone or in combination, on the activation, survival, and quality of bovine preantral follicles classified as having medium antral follicle count (AFC) and cultured for six days. Ovarian cortex fragments with medium AFC were cultured in alpha-minimum essential medium (α -MEM) supplemented with different combinations: 100 ng/mL FSH, 10 ng/mL EGF, 200 ng/mL GDF-9, EGF (10 ng/mL) associated with GDF-9 (200 ng/mL), and FSH (100 ng/mL) associated with EGF (10 ng/mL) and GDF-9 (200 ng/mL). Follicular morphology, stromal density, collagen distribution, and gene expression of proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*), *GDF-9*, and connective tissue growth factor (*CCN2*) were analyzed. Data were analyzed using chi-square, analysis of variance (ANOVA), and Kruskal–Wallis tests ($p < 0.05$). The EGF + GDF-9 association promoted the highest percentage of morphologically normal follicles among cultured groups, not differing from the non-cultured control ($p > 0.05$). All treatments increased the proportion of developing follicles, with the highest activation rates observed in the EGF + GDF-9 and EGF + GDF-9 + FSH groups. The EGF+GDF-9 association showed a higher collagen percentage compared to the other cultured groups ($p < 0.05$). No significant differences were observed in *PCNA* and *GDF-9* expression among treatments ($p > 0.05$). It is concluded that the EGF + GDF-9 association is the most effective strategy for the *in vitro* culture of bovine preantral follicles with medium AFC, promoting greater follicular survival and activation, preserving the extracellular matrix and stromal microenvironment through positive regulation of *CCN2*. The addition of FSH provided no additional benefits, indicating that the combined signaling of EGF and GDF-9 is sufficient to optimize initial *in vitro* folliculogenesis.

Keywords: *in vitro* culture; growth factors; ovarian follicles; survival.

1 INTRODUÇÃO

A reserva ovariana de folículos pré-antrais, composta majoritariamente por folículos primordiais quiescentes, é fundamental para a capacidade reprodutiva feminina. A ativação desses folículos é rigidamente controlada pelo equilíbrio entre fatores inibitórios e estimulatórios que atuam na interface oócito-células da granulosa. Uma vez ativados, os folículos podem progredir até a ovulação ou ser perdidos por atresia (Wu et al., 2021). Assim, compreender os mecanismos que regulam a sobrevivência e a ativação folicular é essencial para o avanço das biotecnologias reprodutivas e para o entendimento de condições que comprometem a fertilidade (Ferré et al., 2020; Silva et al., 2024).

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos é uma biotecnologia reprodutiva que pode ser modulada através da suplementação do meio de cultivo com hormônios e fatores de crescimento. O hormônio folículo-estimulante (FSH) é reconhecido por seu papel na promoção do crescimento folicular e na inibição da apoptose em células da granulosa, atuando como fator de sobrevivência essencial em cultivos ovarianos (Shen et al., 2025). Além disso, o FSH atua na ativação de folículos primordiais e regula a expressão de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) (Joyce et al., 1999; Thomas et al., 2005; Celestino et al., 2009). Paralelamente, o EGF destaca-se como um potente mitógeno que estimula a proliferação celular e tem sido associado à ativação de folículos primordiais em diversas espécies (Andrade et al., 2005). Estudos demonstram que o EGF, ao ativar vias de sinalização como a via PI3K/AKT, promove a sobrevivência e o crescimento folicular durante o cultivo *in vitro* (Kundu; Kumar Das; Das Gupta, 2024). O GDF-9 é essencial para a diferenciação das células da pré-granulosa e para a regulação da saúde folicular, cuja deficiência está associada à desregulação de genes como o homólogo da fosfatase e tensina (*PTEN*) (Liu et al., 2025).

Apesar do conhecimento sobre as ações isoladas de FSH, EGF e GDF-9, ainda são escassos os estudos que investigam seus efeitos combinados sobre a sobrevivência e ativação folicular em cultivo *in vitro*. Compreender as interações entre esses fatores pode fornecer informações importantes para o aprimoramento de sistemas de cultivo e para a preservação da fertilidade. No entanto, a resposta folicular aos estímulos externos durante o cultivo *in*

vitro pode ser influenciada pela reserva folicular inicial, uma vez que ovários com diferente contagem folicular antral (CFA) apresentam comportamentos distintos quanto à ativação e sobrevivência folicular (Broer et al., 2011; Barbosa, 2026). Nesse contexto, a padronização da CFA torna-se uma estratégia fundamental para reduzir a variabilidade experimental e permitir uma avaliação mais precisa do efeito de hormônios e fatores de crescimento sobre a foliculogênese inicial. Estudos demonstram que ovários classificados como de CFA média respondem de forma mais favorável ao cultivo *in vitro*, comparados às CFA baixa e alta (Barbosa, 2026).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com FSH, EGF e GDF-9, isoladamente ou em associações, sobre a ativação, a sobrevivência e a qualidade de folículos pré-antrais cultivados em fragmentos de córtex ovariano bovino com CFA média durante seis dias. Para tanto, foram analisadas a morfologia folicular, a densidade de células estromais, a distribuição de fibras colágenas na matriz extracelular e a expressão gênica de antígeno nuclear de proliferação celular (*PCNA*), do *GDF-9* e do fator de crescimento do tecido conjuntivo (*CCN2*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados após a aprovação do projeto com protocolo de número 010/23 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Minas Gerais, Brasil. O experimento foi conduzido no LABIREP (Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução) vinculado à Universidade Federal do Ceará (UFC).

2.1 Produtos químicos

Os meios de cultura e outros produtos químicos utilizados no estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, EUA).

2.2 Obtenção e classificação dos ovários

Ovários de vacas cruzadas Holandês-Zebu ($n = 6$ pares) foram coletados em um abatedouro local. Os mesmos foram lavados uma vez em álcool 70% durante 20 segundos e duas vezes em solução salina 0,9%, e, logo após, transportados até o laboratório em solução salina contendo antibióticos (100 IU/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) a 4°C, em no máximo uma hora. No laboratório, todos os folículos antrais visíveis na superfície dos ovários foram contados e marcados, de forma sequencial, para evitar duplicidade. Os ovários (um por animal, sem distinção de lado) foram classificados com base em uma adaptação do protocolo de Burns et al. (2005) nos seguintes grupos: baixa (≤ 15 folículos antrais; $n = 20$), média (16–30 folículos antrais; $n = 20$) e alta (≥ 31 folículos antrais; $n = 20$). Contudo, a fim de reduzir potenciais vieses relacionados à reserva folicular inicial e isolar o efeito dos fatores de crescimento testados, optou-se por utilizar exclusivamente ovários de CFA média, os quais apresentam desempenho mais consistente e reprodutível durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (Barbosa, 2026).

2.3 Cultivo *in vitro* dos fragmentos

Foram realizadas seis repetições e seis tratamentos utilizando ovários com CFA média. Para cada animal (repetição), os ovários foram seccionados em 42 fragmentos de $3 \times 3 \times 1$ mm, em condições estéreis. Imediatamente, quatro fragmentos corticais foram fixados para análise histológica e dois fragmentos foram destinados à quantificação de mRNAs para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*, todos armazenados a -80 °C (controles não cultivados, $n = 6$). Os fragmentos restantes ($n = 36$) foram distribuídos aleatoriamente entre os 6 tratamentos nos poços de cultivo, para posterior análise histológica ($n = 4$ por tratamento) e de PCR ($n = 2$ por tratamento), conforme ilustrado na Figura 1.

O cultivo foi realizado em placas de 24 poços durante seis dias, a 38,5 °C e 5% de CO₂ em incubadora umidificada. O meio de cultura básico utilizado foi o α -MEM (pH 7,2–7,4) suplementado com ITS (10 μ g/mL de insulina, 5,5 μ g/mL de transferrina e 5 ng/mL de selênio), glutamina 2 mM, hipoxantina 2 mM, antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) e 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina. Foram realizados seis tratamentos, o primeiro utilizando somente o α -MEM e os outros o α -MEM foi suplementado com: 100 ng/mL de FSH, 10 ng/mL do EGF, 200 ng/mL do GDF-9, EGF (10

ng/mL) em associação com GDF-9 (200 ng/mL) e FSH (100 ng/mL) associado com EGF (10 ng/mL) e GDF-9 (200 ng/mL) (Figura 1). Os fragmentos foram cultivados em 1 mL de meio (básico + tratamento) por poço e a cada dois dias, metade do meio (500 µL) foi substituída por meio fresco.

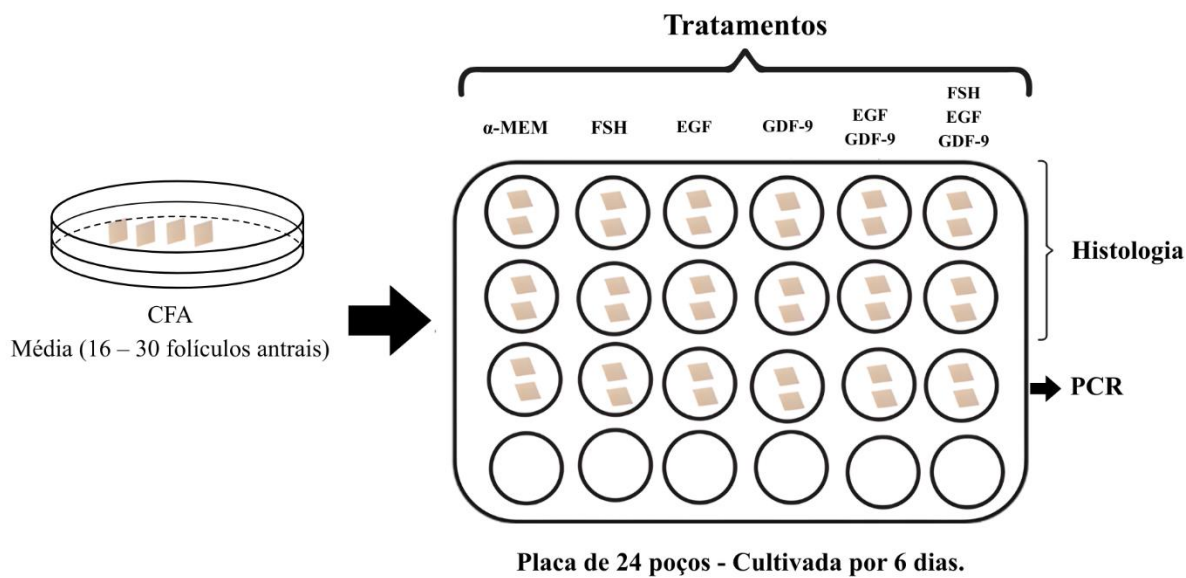


Figura 1. Protocolo de cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano bovino ($3 \times 3 \times 1$ mm) provenientes de ovários classificados quanto à contagem folicular antral (CFA) média, cultivados em α -MEM por seis dias e/ou com FSH, EGF, GDF-9, EGF + GDF-9, EGF + GDF-9 + FSH, destinados a análises histológicas e de reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.4 Avaliação da ativação e sobrevivência folicular *in vitro*

Após 6 dias de cultivo *in vitro*, os fragmentos ovarianos foram fixados durante 24 horas à temperatura ambiente em 4% de paraformaldeído em solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) para estudos de análise histológica. Após a fixação, os fragmentos de tecido foram desidratados numa série gradual de etanol, clarificados com xileno e embebidos em cera de parafina. Para cada pedaço de córtex ovariano, seções de 7 µm foram montadas em lâminas e coradas com eosina e hematoxilina. Lâminas anonimizadas codificadas foram

examinadas sob um microscópio (Nikon, Eclipse, TS 100, Tóquio, Japão) com ampliações de $\times 100$ e $\times 400$ por um único observador. Os folículos foram classificados como primordiais (uma camada de células granulosas achatadas ao redor do oócito) ou em desenvolvimento (primários: uma camada de células granulosas cuboides ao redor do oócito, e secundários: duas ou mais camadas de células granulosas cuboides ao redor do oócito) de acordo com Figueiredo e Lima (2017). Estes folículos foram classificados como: normais: oócito intacto, cercado por células da granulosa, organizadas em uma ou mais camadas, sem núcleo picnótico; degenerados: oócito retraído, com núcleo picnótico e/ou circundado por células da granulosa desorganizadas, separadas da membrana basal, de acordo com Silva et al. (2000). Amostras individuais de aproximadamente 200 folículos foram avaliadas aleatoriamente de cada tratamento.

2.5 Avaliação da densidade de células estromais ovarianas

A avaliação da densidade celular estromal foi realizada em tecidos não cultivados e em tecidos cultivados por 6 dias, em todos os tratamentos. Para cada animal, 15 campos aleatórios de diferentes cortes de todos os animais foram avaliados com o auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio (Nikon, Eclipse, TS 100, Japão), e as imagens foram analisadas pelo software *Image J* (versão 1.51p, 2017). O número de células estromais foi contabilizado manualmente em uma área de $100 \mu\text{m}^2$, conforme descrito por Cavalcante et al. (2019). Todas as avaliações e medições foram realizadas por um único operador.

2.6 Análise da matriz extracelular

As fibras colágenas presentes na matriz extracelular do córtex ovariano foram visualizadas usando o método de coloração *Picrosirius Red (Kit Abcam)*, conforme descrito por Rittié (2017) com algumas adaptações. Secções de $7 \mu\text{m}$ de espessura foram desparafinadas em xileno e incubadas em solução de *Sirius Red* (0,1%) por 1 hora à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido com solução ácida acética (0,5%), seguido de desidratação dos cortes e montagem em lâminas para observação em um microscópio óptico (Nikon, Eclipse, TS 100, Tóquio, Japão) com ampliação de 40X. A

análise foi realizada em 15 campos diferentes para cada animal, utilizando uma câmera DS Cooled DS-Ri1 acoplada ao microscópio. As imagens foram processadas utilizando o software *Image J* (versão 1.51p, 2017) para medir a porcentagem da área ocupada por fibras colágenas. A coloração picrosirius marcou exclusivamente as fibras colágenas em vermelho, enquanto os folículos permaneceram incolores. O *software* automaticamente excluiu a área dos folículos não corados da contagem total de área marcada em vermelho. A intensidade da coloração das fibras colágenas foi quantificada medindo a intensidade média dos *pixels* na área visualizada, após a subtração do fundo.

2.7 Quantificação de RNAs mensageiros para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*

A quantificação dos RNAs mensageiros, *primers* específicos para bovinos de *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* nos folículos pré-antrais foi realizada após zero e seis dias de cultivo, a partir das amostras de tecido ovariano armazenadas a -80 °C. Primeiramente, o isolamento do RNA total e a digestão do DNA foram realizados com um kit de purificação Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para isto, 800 µL de solução Trizol® foram adicionados a cada amostra congelada, sendo o lisado, em seguida, aspirado através de agulhas de calibre 20 antes de serem centrifugados a 10.000 g por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os lisados foram diluídos 1:1 em 70% de etanol e colocados em uma minicoluna presente no kit. Após ligação do RNA à coluna, a digestão do DNA foi realizada com a utilização de DNase livre de RNase (340 Kunitz units/ml) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem das colunas por três vezes, o RNA foi coletado com 30 µl de água ultra-pura.

As amostras de RNA foram avaliadas quanto à sua qualidade e quantidade num espectrofotômetro (BioDrop, Cambridge, Inglaterra) através da leitura da absorbância a 260 nm e verificação da pureza a 280 nm. Antes da reação de transcrição reversa, as amostras de RNA foram incubadas por 5 minutos a 70 °C e em seguida resfriadas em gelo. A transcrição reversa foi realizada em um volume total de 20 µl composto de 10 µl da amostra de RNA, 4 µl de tampão da transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 8 unidades de RNasein, 150 unidades de transcriptase reversa Superscript III, 0,036 U de *primers* aleatórios, 10 mM de DTT e 0,5 mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A

mistura foi incubada a 42 °C por 1 hora, em seguida a 80 °C por 5 minutos e, posteriormente, estocada a -20 °C. O controle negativo foi preparado nas mesmas condições, mas sem adição de transcriptase reversa.

A quantificação dos RNA mensageiros para os fatores envolvidos em apoptose foi realizada com a utilização de *SYBR Green*. Cada reação em tempo real (15 µl) continha 7,5 µl de *SYBRGreen Master Mix* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5,5 µl de água ultra-pura, 1 µl de cDNA e 0,5 µM de cada *primer*. Os *primers* foram projetados para amplificar especificamente RNAs mensageiros para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*. As reações de amplificação do cDNA por PCR consistiram de desnaturação inicial e ativação da polimerase por 10 minutos a 95 °C, seguidas por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 30 segundos a 72 °C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a 72 °C. Todas as reações foram realizadas em um instrumento *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), que foi expresso na mesma intensidade em todas as células, foi utilizado para normalizar. As curvas de dissociação foram analisadas após a amplificação para garantir que havia apenas um produto e que não havia dímeros formados pelos *primers*. Finalmente, 10 µl do produto foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio. Um marcador de DNA, a cada 100 pares de bases (GibcoBRL), foi incluído como referência para identificar os fragmentos de DNA amplificados (Tabela 1).

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados em PCR em tempo real.

Gene alvo	Sequência do <i>primers</i> (5'→3')	Sentido (S), Antissenso (As)	Número de acesso do Genbank
<i>GAPDH</i>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	S	GI: 402744670
	ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	AS	
<i>PCNA</i>	TGCCGAGATCTCAGTCACAT	S	GI:77735938
	STATGGCAACAGCTTCCTCCT	AS	
<i>GDF-9</i>	ACAACACTGTTTCGGCTCTTCACCC	S	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	AS	
<i>CCN2</i>	AGCTGACCTGGAGGAGAACA	S	GI: 1740302
	GTCTGTGCACACTCCGCAGA	AS	

2.8 Análise estatística

As porcentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento, bem como daqueles morfológicamente normais após seis dias de cultivo nos diferentes tratamentos foram comparadas pelo qui-quadrado (GraphPad Prism). Dados sobre a distribuição de fibras colágenas, a densidade de células estromais, bem como os teores de mRNA para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* foram analisados por ANOVA e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito das diferentes fatores de crescimento na morfologia folicular

A Figura 2 ilustra a porcentagem de folículos normais em amostras de tecido ovariano após seis dias de cultivo *in vitro*. A taxa de normalidade foi maior no grupo não cultivado, e os menores valores observados no grupo α -MEM ($p < 0,05$). A suplementação isolada com

FSH, EGF e GDF-9 resultou em valores intermediários. A associação de EGF + GDF-9 promoveu maior porcentagem de folículos normais entre os grupos cultivados, não diferindo do grupo não cultivado ($p > 0,05$). A combinação de EGF + GDF-9 + FSH também apresentou alta taxa de folículos normais, porém, sem diferença significativa em relação aos demais tratamentos com fatores de crescimento ($p > 0,05$; Figura 2).

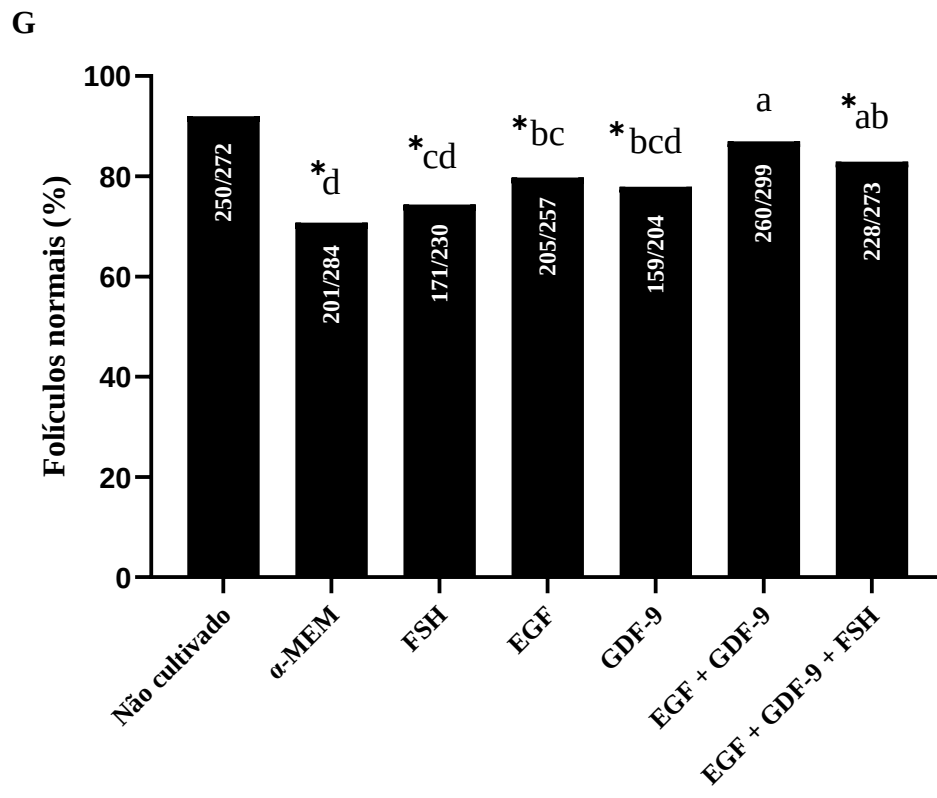
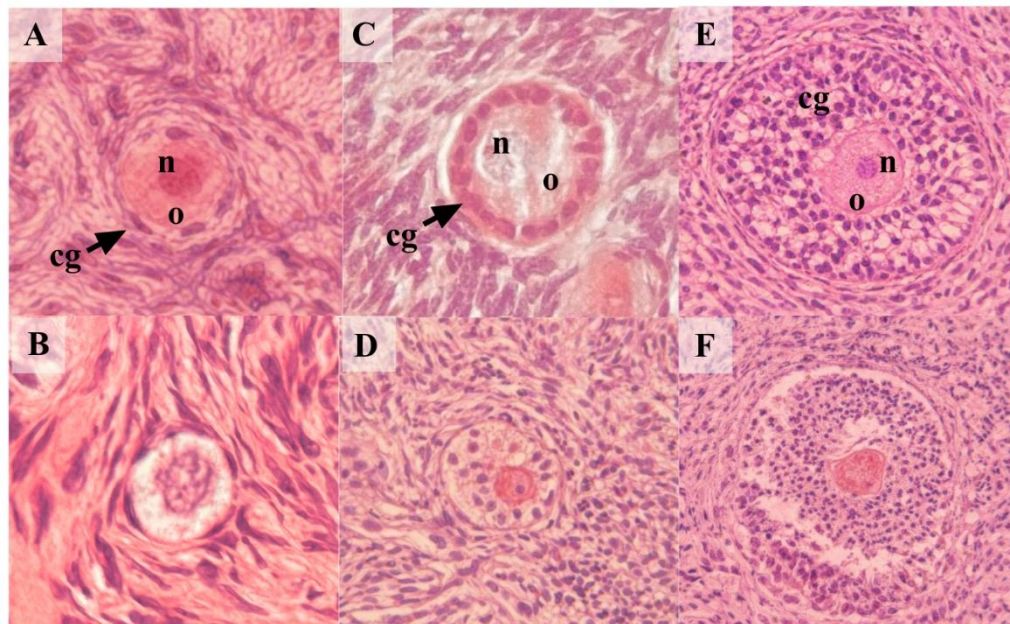


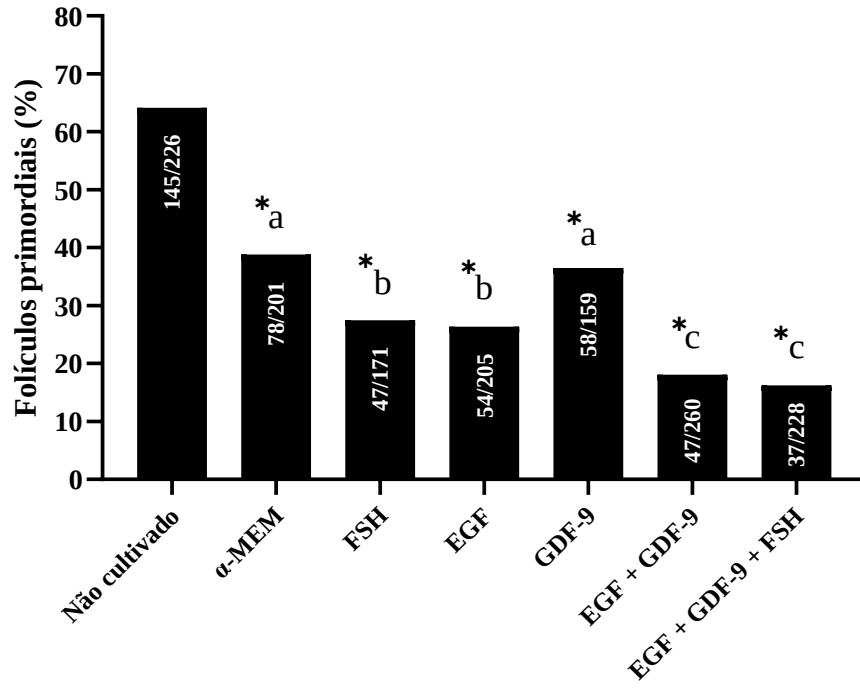
Figura 2. Morfologia (A–F) e porcentagens (G) de folículos normais em amostras não cultivadas

e em amostras cultivadas por seis dias em meio controle (α -MEM) ou com FSH, EGF, GDF-9, EGF + GDF-9, EGF + GDF-9 + FSH. Folículos primordiais (A, B), primários (C, D) e secundários (E, F) normais e atresícos. Células da granulosa (cg); oócito (o); núcleo do oócito (n). Barra de escala: 100 μ m. Letras distintas (a - d) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$). *Diferença significativa em relação ao tecido não cultivado ($p < 0,05$). O número de folículos normais e totais avaliados é indicado em cada coluna. Barra de escala = 100 μ m.

3.2 Efeito dos fatores de crescimento na ativação e no desenvolvimento de folículos primordiais

Folículos na fase primordial foram predominantes nos tecidos não cultivados (Figura 3A). Após seis dias de cultivo, observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) na proporção de folículos em desenvolvimento em todos os tratamentos avaliados, quando comparados aos tecidos não cultivados (Figura 3B). Valores intermediários de folículos primordiais e em desenvolvimento foram observados para os tratamentos com α -MEM e GDF-9 (Figura 3B). Os tratamentos com FSH e EGF reduziram a proporção de folículos primordiais, com aumento correspondente de folículos em desenvolvimento (Figura 3A e B). As associações EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH promoveram as menores porcentagens de folículos primordiais e as maiores proporções de folículos em desenvolvimento, não diferindo entre si ($p < 0,05$), ou seja, a taxa de ativação dos folículos foi mais alta nesses grupos.

A



B

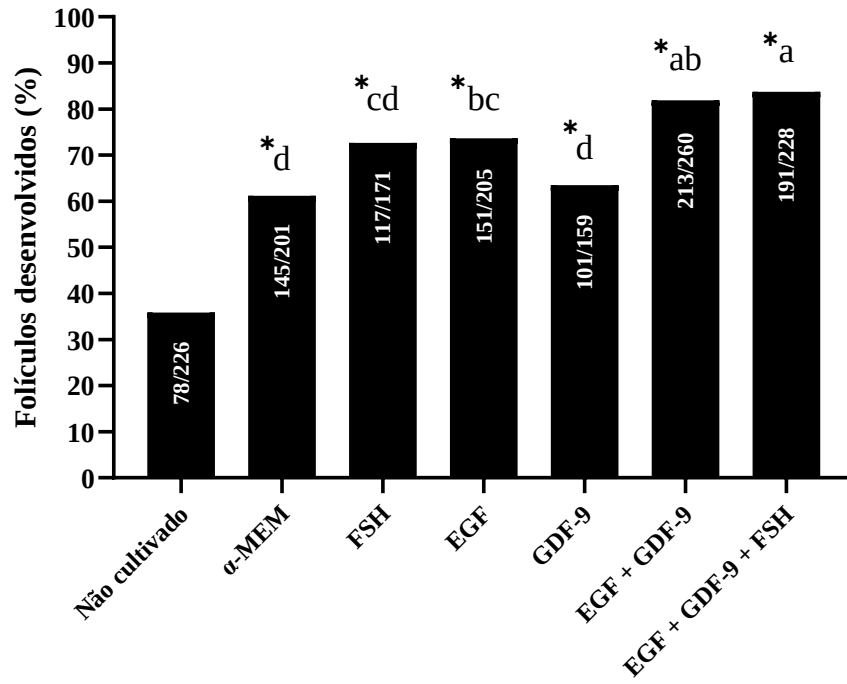


Figura 3. Incidência de folículos primordiais (A) e em desenvolvimento (B) em amostras não cultivadas e em amostras cultivadas por seis dias em meio (α -MEM) ou com FSH, EGF, GDF-9, EGF + GDF-9, EGF + GDF-9 + FSH. O número de folículos primordiais e em desenvolvimento avaliados é indicado em cada coluna. Letras distintas (a-d) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$). *Difere significativamente do tecido não cultivado ($p < 0,05$). Barra de escala = 100 μ m.

3.3 Avaliação das fibras de colágeno e da densidade celular do estroma

A porcentagem de colágeno por área diferiu entre os tratamentos ($p < 0,05$). A porcentagem de colágeno na associação EGF + GDF-9 foi maior em comparação aos demais grupos cultivados (Figura 4). Os tecidos ovarianos dos grupos α -MEM, FSH, EGF, GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH não diferiram entre si em termos de porcentagem de colágeno ($p > 0,05$; Figura 4).

Houve diferença entre os tratamentos cultivados ($p < 0,05$), em que a densidade de células estromais foi maior nas associações de EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH do que nos demais tratamentos, não diferindo entre si (Figura 5). A densidade de fibras de estroma no grupo EGF foi intermediária, diferindo dos grupos com densidades inferiores, enquanto as médias foram mais baixas nos grupos α -MEM, FSH e GDF-9, que não diferiram entre si ($p > 0,05$).

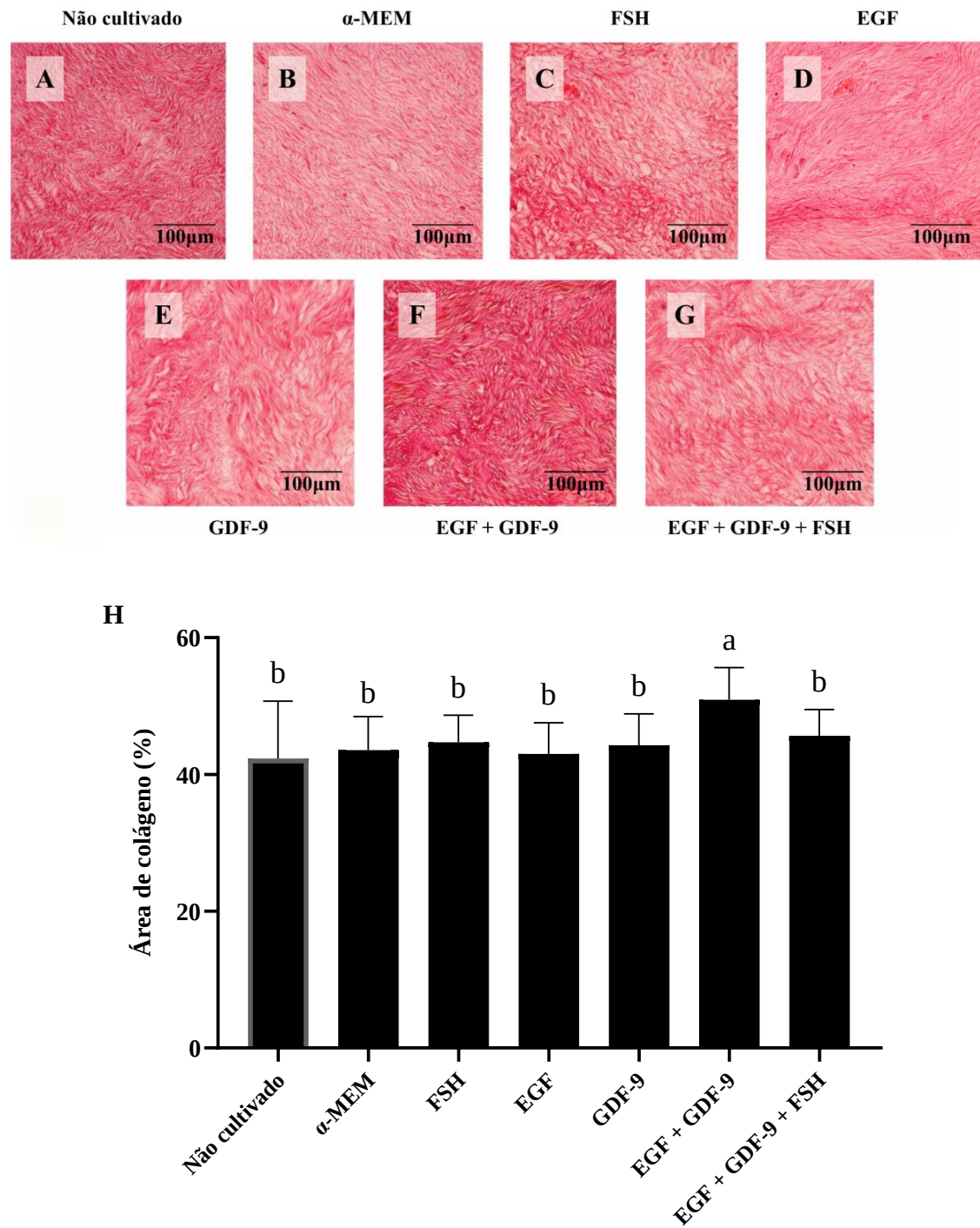


Figura 4. Morfologia (A a G) e percentual da área de colágeno (H) em amostras não cultivadas e cultivadas por seis dias em meio de cultivo (α -MEM) ou com FSH, EGF, GDF-9, EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH. Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados e não cultivados ($p < 0,05$). Barra de escala = 100 μ m.

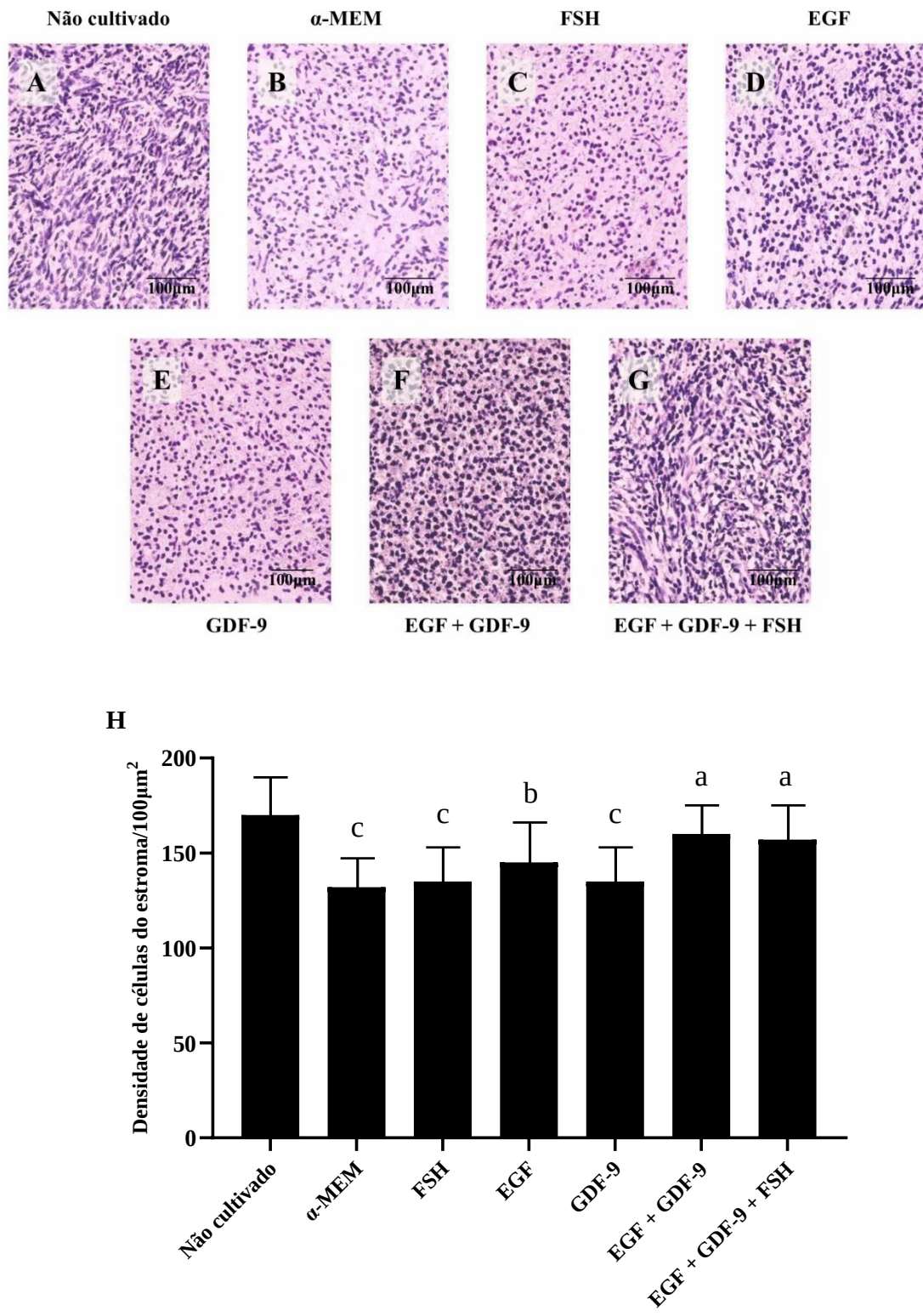


Figura 5. Morfologia (A a G) e número (média $\pm$ E.P.M.) de células do estroma (H) em amostras

não cultivadas e cultivadas por seis dias em meio de cultivo (α -MEM) ou com FSH, EGF, GDF-9, EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH. Letras distintas (a-c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$). Barra de escala = 100 μ m.

3.4 Avaliação da expressão gênica para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2*

Não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) nas expressões de mRNA de *PCNA*, *GDF-9* (Figura 6). Por outro lado, a expressão de *CCN2* foi influenciada pelos tratamentos, sendo essa maior na associação de GDF-9 + EGF, diferindo do tratamento GDF-9 + EGF + FSH ($p < 0,05$). Os valores nos tratamentos FSH, EGF e GDF-9 foram intermediários, não diferindo entre si e tampouco dos demais tratamentos ($p > 0,05$).

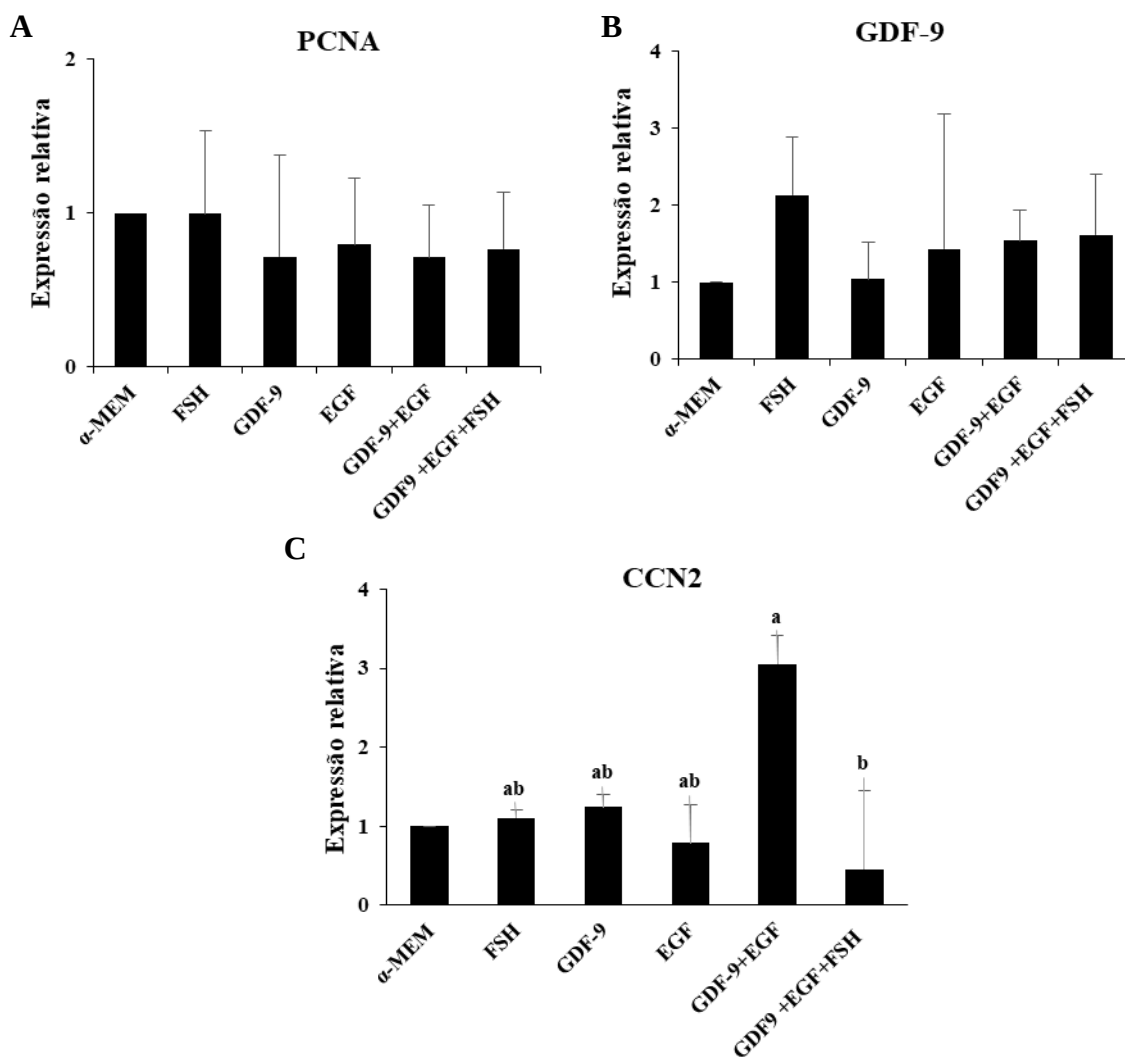


Figura 6. Expressão relativa de mRNA (média $\pm$ E.P.M.) para *PCNA*, *GDF-9* e *CCN2* em amostras cultivadas por seis dias em meio de controle (α -MEM) ou com FSH, EGF, GDF-9, EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH. Letras distintas (a, b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tecidos cultivados ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados os impactos do FSH, EGF e GDF-9, isolados ou em combinação, sobre a foliculogênese inicial em fragmentos de córtex ovariano bovino com CFA, cultivados *in vitro* por 6 dias. Os resultados demonstram que a associação entre EGF e GDF-9 foi a mais eficaz em promover a sobrevivência folicular e em estimular a ativação de folículos primordiais. Adicionalmente, o tratamento com EGF + GDF-9 foi o único que preservou a integridade da matriz extracelular, evidenciada pela maior área de colágeno, e promoveu maior densidade de células estromais, correlacionando-se com a maior expressão do gene *CCN2*. Esses achados sugerem um efeito sinérgico entre EGF e GDF-9 na regulação do microambiente ovariano e na manutenção da qualidade folicular durante o cultivo *in vitro*.

A suplementação com EGF + GDF-9 resultou na maior porcentagem de folículos morfológicamente normais entre os grupos cultivados, não diferindo do controle não cultivado ($p > 0,05$). Este efeito sinérgico provavelmente decorre da atuação complementar desses fatores: o EGF, via ativação da via PI3K/AKT, promove a proliferação e sobrevivência celular (An et al., 2022), enquanto o GDF-9 regula a diferenciação das células da granulosa e a comunicação oócito-granulosa (Fountas et al., 2024). A ação combinada pode ter criado um microambiente que mimetiza mais fielmente as condições fisiológicas, inibindo vias de apoptose e promovendo a homeostase tecidual.

Embora o FSH isoladamente possa promover o desenvolvimento folicular *in vitro* (Silva et al., 2014) e atuar em sinergia com o GDF-9 na regulação da matriz extracelular (Vasconcelos et al., 2013), a suplementação simultânea de múltiplos fatores pode tornar-se redundante quando as vias de sinalização já se encontram otimizadas pela presença de EGF e GDF-9 em concentrações adequadas. Essa hipótese é reforçada por Silva et al. (2004), que observaram em tecido ovariano caprino que a adição conjunta de FSH e EGF não acrescentou ganhos à viabilidade ou ativação folicular em relação ao uso isolado de EGF, indicando que concentrações adequadas desse fator

de crescimento são suficientes para sustentar o crescimento oocitário sem estímulo hormonal suplementar.

Quanto à ativação folicular, todos os tratamentos aumentaram a proporção de folículos em desenvolvimento em relação ao controle não cultivado ($p < 0,05$). As associações EGF + GDF-9 e EGF + GDF-9 + FSH promoveram as maiores taxas de ativação ($p < 0,05$), corroborando o papel desses fatores no desencadeamento da foliculogênese inicial (Shimizu, 2005; Yang; Zhu; Jin, 2020). Estudos demonstram que o GDF-9 atua em sinergia com a via do EGF, promovendo a expressão do receptor de EGF nas células do cumulus e potencializando a sinalização proliferativa (Su et al., 2010). Esses achados reforçam a hipótese de que a combinação EGF + GDF-9 é suficiente para maximizar a ativação folicular neste modelo experimental.

O tratamento com EGF + GDF-9 foi o único que preservou a porcentagem de colágeno em quantidades similares ao tecido não cultivado e promoveu a maior densidade de células estromais ($p < 0,05$). Adicionalmente, a expressão do gene *CCN2* foi maior neste grupo ($p < 0,05$). Isso reflete a ativação mecânica da via Hippo. Estímulos como fragmentação, incisões ou perfurações induzem a polimerização da actina (conversão de G-actina em F-actina), suprimindo a cascata de quinases da via Hippo. Isso impede a fosforilação de *YAP/TAZ*, permitindo sua translocação nuclear e a interação com o domínio de ligação transcricional aprimorado (TEAD), com consequente ativação de genes-alvo como *CCN2*. Este gene codifica uma proteína envolvida na síntese de colágeno e na interação célula-matriz, processos fundamentais para o crescimento e ativação folicular (Clark et al., 2022; Kawamura et al., 2013). A correlação entre esses achados sugere que o tratamento EGF + GDF-9 atua na regulação positiva do *CCN2*, promovendo um microambiente mais organizado e favorável ao suporte do crescimento folicular (Nishida et al., 2007).

As expressões gênicas de *PCNA* e *GDF-9* não diferiram entre os tratamentos ($p > 0,05$). A ausência de diferença para *PCNA* contrasta com estudos que demonstraram aumento na expressão deste gene em resposta ao FSH em caprinos (Portela et al., 2014) e em células da granulosa (Sosa et al., 2020), bem como em cultivos ovarianos de camundongos que apresentaram maior porcentagem de células *PCNA*-positivas após seis dias de cultivo quando comparados ao controle *in vivo* (Wang et al., 2013). A hipótese é que esta divergência pode ser atribuída à análise em tecido total, que atenua a sinalização proliferativa específica dos folículos ativados, uma vez que a resposta focalizada nos folículos em desenvolvimento pode ser mascarada quando se avalia o

córtex ovariano como um todo (Gong et al., 2023).

A associação EGF + GDF-9 mostrou-se superior na promoção da sobrevivência e ativação folicular, bem como na preservação da integridade do microambiente ovariano, por meio da manutenção da matriz de colágeno e do aumento da densidade estromal, correlacionados à regulação positiva do gene *CCN2*. Estudos futuros devem investigar as vias de sinalização envolvidas nesse sinergismo e a competência oocitária dos folículos ativados sob essa condição de cultivo.

CONCLUSÃO

A associação de EGF e GDF-9 (EGF + GDF-9) mostrou-se a estratégia mais eficaz para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos com CFA média. Este tratamento promoveu maior sobrevivência e ativação folicular, preservou a matriz extracelular e a densidade estromal e aumentou a expressão de *CCN2*. A adição de FSH à combinação não trouxe benefícios adicionais, indicando que a sinalização conjunta de EGF e GDF-9 é suficiente para otimizar a foliculogênese inicial *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AN, S.J. et al. Regulation of EGF-stimulated activation of the PI-3K/AKT pathway by exocyst-mediated exocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 119, n. 48, e2208947119, nov. 2022.

ANDRADE, E. R. et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, Nova York, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005.

BARBOSA, Natália Martins. Influência da contagem de folículos antrais na morfologia, na ativação folicular, na matriz extracelular e na expressão gênica de PCNA, GDF-9 e *CCN2* em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro*. 2025. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2025.

BROER, S. L. et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 1, p. 46-54, 2011.

BURNS, D. S. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence

for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, n. 1, p. 54-62, jul. 2005.

CAVALCANTE, B. N. et al. Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 54, p. 1567–1573, 2019.

CELESTINO, J. J. H. et al. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009.

CLARK, K. L. et al. Hippo Signaling in the Ovary: Emerging Roles in Development, Fertility, and Disease. **Endocrine Reviews**, [Bristol], v. 43, n. 6, p. 1074-1096, nov. 2022.

FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020.

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F. Artificial ovary technology: applications, state of art, limitations and prospects. **Brazilian Journal of Animal Reproduction**, v. 41, n. 1, p. 248-253, 2017.

FOUNTAS, S. et al. The Roles of GDF-9, BMP-15, BMP-4, and EMMPRIN in Folliculogenesis and *In vitro* Fertilization. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 13, n. 13, e3775, jun. 2024.

GONG, X. et al. Application of single-cell RNA sequencing in ovarian development. **Biomolecules**, Basel, v. 13, n. 1, e47, jan. 2023.

JOYCE, I. M. et al. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, San Diego, v. 214, n. 2, p. 342-353, 1999.

KAWAMURA, K. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 110, n. 43, p. 17474-17479, out. 2013.

KUNDU, S.; KUMAR DAS, B.; DAS GUPTA, S. Hormonal symphony: The dynamic duo of IGF and EGF in gonadotropin-induced fish ovarian development and egg maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 273, p. 107663, 2024.

LIU, Y. et al. Rescue of oocyte re-awakening failure in Exoc1-G-cKO mice using a PTEN inhibitor. **Cell Death Discovery**, v. 11, n. 45, p. 1-9, 2025.

NISHIDA, T. et al. CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) is essential for extracellular matrix production and integrin signaling in chondrocytes. **Journal of Cell Communication and Signaling**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 45-58, mar. 2007.

PORTELA, A. M. L. R. et al. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle-stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival, and gene expression. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 116, n. 2-3, p. 183-191, fev. 2014.

RITTIÉ, L. Method for picosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1627, p. 395–407, 2017.

SHEN, Y.-H. et al. Mechanisms of Granulosa Cell Programmed Cell Death and Follicular Atresia in Polycystic Ovary Syndrome. **Physiological Research**, v. 74, n. 1, p. 31-40, 21 mar. 2025.

SHIMIZU, T. Promotion of Ovarian Follicular Development by Injecting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) Genes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 23-32, 2005.

SILVA, A. W. B. et al. Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. **Livestock Science**, v. 160, p. 199-207, 2014.

SILVA, B. R. et al. Melatonin acts through different mechanisms to control oxidative stress and primordial follicle activation and survival during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Domestic Animal Endocrinology**, Amsterdam, v. 86, 106824, 2024.

SILVA, J. R. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, New York, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, jun. 2004.

SILVA, J.R. et al. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 809-822, 2000.

SOSA, A. S. A. et al. Expression profiling of primary cultured buffalo granulosa cells from different follicular size in comparison with their *in vivo* counterpart. **Zygote**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 233-240, jun. 2020.

SU, Y. Q. et al. Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 24, n. 6, p. 1230-1239, jun. 2010.

THOMAS, F. H. et al. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 146, n. 2, p. 941-949, 2005.

VASCONCELOS, G. L. 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**, Clayton, v. 25, n. 8, p. 1194-1203, 2013.

WANG, S. et al. Effects of culture and transplantation on follicle activation and early follicular growth in neonatal mouse ovaries. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 354, n. 2, p. 609-621, nov. 2013.

WU, Z.; LIU, K.; ZHANG, C. Clinical applications of *in vitro* primordial follicle activation. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 18, p. 194–200, 2021.

YANG, Q.; ZHU, L.; JIN, L. Human Follicle *in vitro* Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 548, 2020.

8 CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou que a reserva folicular inicial, avaliada pela contagem de folículos antrais (CFA), modula a resposta do tecido ovariano bovino ao cultivo *in vitro*, sendo que ovários com CFA média (16–30 folículos) apresentam microambiente mais favorável, com maior ativação folicular, melhor preservação da matriz extracelular e manutenção adequada da expressão de *CCN2* e *GDF-9*. Utilizando exclusivamente tecidos com CFA média, a associação entre EGF e GDF-9 (EGF + GDF-9) mostrou-se a estratégia mais eficaz de suplementação do meio de cultivo, promovendo maior sobrevivência e ativação folicular, preservação do colágeno e da densidade estromal, além de aumento da expressão de *CCN2*, via ativação da via Hippo. A adição de FSH não trouxe benefícios adicionais, indicando que a sinalização conjunta de EGF e GDF-9 é suficiente para otimizar a foliculogênese inicial *in vitro*. Recomenda-se, portanto, em vacas cruzadas (Holandes x Zebu) utilizar ovários com CFA média e suplementar o meio com EGF (10 ng/mL) e GDF-9 (200 ng/mL) para maximizar o sucesso do cultivo *in vitro* de folículos em fragmentos ovarianos bovinos. Estudos futuros devem investigar as vias de sinalização envolvidas e a competência oocitária dos folículos ativados.

REFERÊNCIAS

- ABULGHASEM, E. A.; PRICE, C. A. The influence of CCN family proteins on ovarian physiology and pathology. **Reproduction**, Fertility and Development, Clayton, v. 37, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD24199>. Acesso em: 14 fev. 2026.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, B.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72-80, Jan. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>. Acesso em: 22 fev. 2026.
- ADAMS, G. P.; SINGH, J. Ovarian follicular and luteal dynamics in cattle. **Bovine Reproduction**, Hoboken, v. 25, p. 292-323, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch25>. Acesso em: 5 mar. 2026.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, Cambridge, v. 65, n. 2, p. 257-269, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.002>. Acesso em: 03 mar. 2026.
- ADHIKARI, D. et al. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 765-770, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gap092>. Acesso em: 03 mar. 2026.
- ADIB, S.; VALOJERDI, M. R.; ALIKHANI, M. Dose optimisation of PTEN inhibitor, bpV (Hopic), and SCF for the in-vitro activation of sheep primordial follicles. **Growth Factors**, Abingdon, v. 37, n. 3-4, p. 178-189, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1680661>. Acesso em: 2 mar. 2026.
- AHMED HASSAN ELSHIEKH, A.; TAIT, S. W. G. Molecular cell biology of apoptosis in health and disease. In: GREGORY, C. D.; WOOD, W.; RAVICHANDRAN, K. (ed.). **Apoptosis and other forms of cell death in the regulation of inflammation in health and disease**. Cham: Springer Nature, 2025. p. 1-28. (Advances in experimental medicine and biology). Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-031-92785-0_1. Acesso em: 04 mar. 2026.
- ALMEIDA, A. P. et al. Gene expression and immunolocalization of fibroblast growth factor 2 in the ovary and its effect on the in vitro culture of caprine preantral ovarian follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 1, p. 20-25, fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01793.x>. Acesso em: 03 mar. 2026.
- ANDERSON, E. L. et al. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 14976-14980, Sep. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0807297105>. Acesso em: 22 fev. 2026.
- ANDRADE, E. R. et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, Nova York, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.001>. Acesso em: 03 mar. 2026.

ARAÚJO V. R. et al. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 305-310, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000400004>. Acesso em: 22 fev. 2026.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.013>. Acesso em: 22 mar. 2026.

AZEVEDO, Venância Antonia Nunes. **Efeitos do α -pineno livre ou encapsulado em lipossomas durante o cultivo de folículos pré-antrais e maturação oocitária em bovinos**. 2025. 151 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/83896>. Acesso em: 04 mar. 2026.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, n. 3, p. 1023-1031, set. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017772>. Acesso em: 03 mar. 2026.

BAHR, J. M. Ovary overview. **Reference Module in Biomedical Sciences**, Amsterdam, v. 2, p. 3-7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64389-1>. Acesso em: 03 mar. 2026.

BANCSI, L. F. et al. Predictors of poor ovarian response in *in vitro* fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**, New York, v. 77, n. 2, p. 328-336, fev. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)02983-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)02983-1). Acesso em: 04 mar. 2026.

BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/1998.7671903x>. Acesso em: 03 mar. 2026.

BARBIERI, R. L.; MAKRIS, A.; RYAN, K. J. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of human ovarian stroma and theca. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 64, n. 3 Suppl, p. 73S-80S, set. 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00006250-198409001-00019>. Acesso em: 03 mar. 2026.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 537-555, set./out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dml022>. Acesso em: 04 mar. 2026.

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 130, n. 3, p. 401-409, out. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00438-x](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00438-x). Acesso em: 04 mar. 2026.

BARROSO, P. A. A. *et al.* Chlorogenic acid increases follicle survival, stromal cell density, levels of thiol and glutathione peroxidase activity in cultured bovine ovarian tissues.

Reproduction in Domestic Animals, Berlin, v. 60, n. 4, e70053, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.70053>. Acesso em: 5 mar. 2026.

BARTKOVÁ, A. R. et al. Meiotic and developmental competence of growing pig oocytes derived from small antral follicles is enhanced in culture medium containing FGF2, LIF, and IGF1 (FLI medium). **Journal of Ovarian Research**, v. 17, n. 1, p. 54, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01360-0>. Acesso em: 04 mar. 2026.

BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2019. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p308-314%\(RB812\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p308-314%(RB812).pdf). Acesso em: 14 fev. 2026.

BEZERRA, V. S. *et al.* Punicalagin increases follicular activation, development, and activity of superoxide dismutase 1, catalase, and glutathione peroxidase 1 in cultured bovine ovarian tissues. **Reproduction, Fertility, and Development**, Melbourne, v. 36, 24029, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD24029>. Acesso em: 5 mar. 2026.

BIZARRO-SILVA, C.; SENEDA, M. M. Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 45, n. 3, p. 131-147, jul./set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.017>. Acesso em: 03 mar. 2026.

BÓ, G. A. et al. Serum antimullerian hormone concentrations and in vitro embryo production in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 28, n. 2, p. 219, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab176>. Acesso em: 04 mar. 2026.

BONNET A, DALBIÈS-TRAN R, SIRARD MA. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**. 2008 Feb;135(2):119-28. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-07-0331>. Acesso em 04 mar. 2026

BRUNO, J. B. et al Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 679-687, Dec. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD08181>. Acesso em: 22 fev. 2026.

BRUNO, J. B. et al. Vasoactive intestinal peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after *in vitro* tissue culture. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 414-421, Dec. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000272317>. Acesso em: 22 fev. 2026.

BURNS, D. S. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, n. 1, p. 54-62, jul. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>. Acesso em: 04 mar. 2026.

CAETANO, F. F. F. *et al.* Thymol increases primordial follicle activation, protects stromal

cells, collagen fibers and down-regulates expression of mRNA for superoxide dismutase 1, catalase and periredoxin 6 in cultured bovine ovarian tissues. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 266, 107514, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107514>. Acesso em: 5 mar. 2026.

CARLSSON, P.; MAHLAPUU, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. **Developmental Biology**, San Diego, v. 250, n. 1, p. 1-23, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0780>. Acesso em: 03 mar. 2026.

CATAPANO, Gerardo et al. Do Bioreactor Designs with More Efficient Oxygen Supply to Ovarian Cortical Tissue Fragments Enhance Follicle Viability and Growth In Vitro? **Processes**, Basel, v. 7, n. 7, p. 450, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr7070450>. Acesso em: 5 mar. 2026.

CAVALCANTE, B. N. *et al.* Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 54, p. 1567–1573, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.13565>. Acesso em: 5 mar. 2026.

CECCONI, S. et al. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 60, n. 3, p. 594-601, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.3.594>. Acesso em: 14 fev. 2026.

CELESTINO, J. J. H. et al. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured in vitro. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1933719108325756>. Acesso em: 03 mar. 2026.

CHEN, Y. et al. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*. **Endocrinology**, v. 148, p. 3580–3590, Aug. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2007-0088>. Acesso em: 22 fev. 2026.

CHEN, Y.; YANG, W., SHI, X., et al. The factors and pathways regulating the activation of mammalian primordial follicles in vivo. **Front. Cell Dev Biol.** 30 sept. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.575706>. Acesso em: 22 fev. 2026.

CLARK, K. L. et al. Hippo Signaling in the Ovary: Emerging Roles in Development, Fertility, and Disease. **Endocrine Reviews**, [Bristol], v. 43, n. 6, p. 1074-1096, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endrev/bnac013>. Acesso em: 5 mar. 2026.

CLARKE, H. G. et al. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, Bristol, v. 132, n. 1, p. 119-131, jul. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00960>. Acesso em: 03 mar. 2026.

COSTA, C. B.; FAIR, T.; SENEDA, M. M. Review: Environment of the ovulatory follicle: modifications and use of biotechnologies to enhance oocyte competence and increase fertility in cattle. **Animal**, Cambridge, v.17, p.100866, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100866>. Acesso em: 5 mar. 2026.

COSTA, F. C. *et al.* Ascorbic acid and resveratrol improve the structural integrity of the extracellular matrix and enhance follicular survival in cultured bovine ovarian tissue.

Theriogenology, Amsterdam, 2025. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.01.020>. Acesso em: 5 mar. 2026.

COSTA, F. D. C. *et al.* Aloe vera increases collagen fibers in extracellular matrix and mRNA expression of peroxiredoxin-6 in bovine ovarian cortical tissues cultured *in vitro*. **Zygote**, Cambridge, v. 30, p. 365–372, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1017/S0967199421000824>. Acesso em: 5 mar. 2026.

COSTA, Francisco das Chagas. **Remodelação do córtex ovariano durante o cultivo in vitro e efeitos de bioandaimos descelularizados e nanopartículas poliméricas carregadas com resveratrol no crescimento e viabilidade de folículos secundários bovinos**. 2025. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/83032> Acesso em: 5 mar. 2026.

COXIR, S. A. *et al.* From *in vivo* to *in vitro*: exploring the key molecular and cellular aspects of human female gametogenesis. **Human Cell**, Tokyo, v. 36, p. 1283–1311, 2023. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s13577-023-00921-7>. Acesso em: 04 mar. 2026.

CULLY, M.; YOU, H.; LEVINE, A. J.; MAK, T. W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nature Reviews. Cancer**, London, v. 6, n. 3, p. 184–192, mar. 2006. <https://doi.org/10.1038/nrc1819>. Acesso em: 2 mar. 2026.

CUSHMAN, R. A. *et al.* Developmental programming of the ovarian reserve in livestock. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 264, 107458, maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107458>. Acesso em: 04 mar. 2026.

DA SILVA, F. F. *et al.* Croton grewioides essential oil and anethole reduce oxidative stress and improve growth of bovine primordial follicles during culture of ovarian tissue. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Oxford, v. 76, p. 1609-1619, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jpp/rgae093>. Acesso em: 5 mar. 2026.

DALBIES-TRAN, R. *et al.* Comparative Analysis of Oocyte Development in Mammals. **Cells**, Basel, v. 9, n. 4, p. 1002-1029, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9041002>. Acesso em: 04 mar. 2026.

DE BEM, A. R.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. **Efeito do intervalo de corte do tecido ovariano no tissue chopper sobre o número de folículos pré-antrais isolados a partir de ovários de vacas nelore**. XII REUNIÃO ANUAL DA SBTE, Foz do Iguaçu-PR. Anais da XII Reunião Anual da SBTE, v. 25, p. 178-178, 1997.

DE LIMA, M. A. *et al.* Ovarian follicular dynamics, progesterone concentrations, pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low antral follicle count. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, 19557, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76601-5>. Acesso em: 04 mar. 2026.

DEMINI, L. *et al.* Inactivation of Exosc10 in the oocyte impairs oocyte development and

maturation, leading to a depletion of the ovarian reserve in mice. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 19, n. 4, p. 1080-1093, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.72889>. Acesso em: 03 mar. 2026.

DEVOS, M. et al. Regulation of follicular activation signaling pathways by in vitro inhibition of YAP/TAZ activity in mouse ovaries. **Scientific Reports**, London, v. 13, n. 1, p. 15346, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41954-0>. Acesso em: 05 mar. 2026.

DOMPE, C. *et al.* Human granulosa cells—stemness properties, molecular cross-talk and follicular angiogenesis. **Cell**, Basel, v. 10, n. 6, p. 1396, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10061396>. Acesso em: 5 mar. 2026.

DOS SANTOS, E. C. et al. Is the Hippo Pathway Effector Yes-Associated Protein a Potential Key Player of Dairy Cattle Cystic Ovarian Disease Pathogenesis? **Animals**, Basel, v. 13, n. 18, p. 2851, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13182851>. Acesso em: 5 mar. 2026.

ELVIN, J. A. et al. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 13, n. 6, p. 1035-1048, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0310>. Acesso em: 14 fev. 2026.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 7, n. 8, p. 606–619, ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg1879>. Acesso em: 2 mar. 2026.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, New York, v. 4, n. 3, p. 233-254, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1022504>. Acesso em: 04 mar. 2026.

ERIKSEN, G. V. et al. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid. **Biochemical Journal**, London, v. 340, n. Pt 3, p. 613-620, jun. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj3400613>. Acesso em: 03 mar. 2026.

FARIA, Ana Cláudia Fagundes et al. Influence of antral follicle count on in vitro embryo production, sexual precocity and conception rate of Senepol cattle. **Animal Production Science**, v. 61, n. 14, p. 1418–1424, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/AN20355>. Acesso em: 29 abr. 2026.

FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>. Acesso em: 14 fev. 2026.

FERREIRA, A. C. A. et al. Pituitary porcine FSH, and recombinant bovine and human FSH differentially affect growth and relative abundances of mRNA transcripts of preantral and early developing antral follicles in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 219, p. 106461, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106461>. Acesso em: 03 mar. 2026.

FIGUEIREDO, J. R. de et al. Advances in in vitro folliculogenesis in domestic

ruminants. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 16, n. 1, p. 52-65, jan./mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-123>. Acesso em: 5 mar. 2026.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 303-327.

FINGAR, D. C.; BLENIS, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene**, Londres, v. 23, n. 18, p. 3151-3171, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>. Acesso em: 03 mar. 2026.

FIORENTINO, G. et al. Biomechanical forces and signals operating in the ovary during folliculogenesis and their dysregulation: implications for fertility. **Human reproduction**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 1-23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac031>. Acesso em: 5 mar. 2026.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00088-5). Acesso em: 03 mar. 2026.

FUJINO, K. et al. Survivin gene expression in granulosa cells from infertile patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, New York, v. 89, n. 1, p. 60-65, jan. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.018>. Acesso em: 04 mar. 2026.

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, Nova York, v. 25, n. 3, p. 279-283, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/77033>. Acesso em: 03 mar. 2026.

GAN, L. et al. Proliferating cell nuclear antigen colocalization with corneal epithelial stem cells and involvement in physiological cell turnover. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, Oxford, v. 73, n. 6, p. 491-495, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.1995.tb00322.x>. Acesso em: 03 mar. 2026.

GENCEL-AUGUSTO, J.; GRANDIS, J. R.; JOHNSON, D. E. Conventional and alternative approaches for targeting PIK3CA and PTEN alterations in head and neck, breast, and other cancers. **Advanced Biological Regulation**, Amsterdam, v. 99, 101117, mar. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2025.101117>. Acesso em: 2 mar. 2026.

GLISTER, C.; KEMP, C. F.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, Bristol, v. 127, n. 2, p. 239-254, fev. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00090>. Acesso em: 03 mar. 2026.

GOBIKRUSHANTH, M. et al. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an

expected day of follicular wave emergence in dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 92, p. 90-94, abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018>. Acesso em: 04 mar. 2026.

GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 433-442, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810433>. Acesso em: 03 mar. 2026.

GOUGEON, A.; LEFÈVRE, B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 497-502, nov. 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690497>. Acesso em: 04 mar. 2026.

GROSBOIS, J. *et al.* Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during *in vitro* culture. **Human Reproduction**, Oxford, v. 38, p. 444–458, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/dead008>. Acesso em: 5 mar. 2026.

GRUBLIAUSKAITĖ, M. *et al.* Influence of ovarian stromal cells on human ovarian follicle growth in a 3D environment. **Human Reproduction**, Oxford, v. 2024, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hropen/hoad052>. Acesso em: 5 mar. 2026.

GUPTA, P. S. P. *et al.* Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, n. 1, p. 57–63, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S096719940700442X>. Acesso em: 22 mar. 2026.

GU, Y.; RUNYAN, C.; SHOEMAKER, A.; SURANI, A.; WYLIE, C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. **Development**, v. 136, p. 1295–1303, apr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.030619>. Acesso em: 22 fev. 2026.

GUTIERREZ, C. G. *et al.* Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, n. 5, p. 1322–1328, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1322>. Acesso em: 14 fev. 2026.

HAYASHI, M. *et al.* Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, Philadelphia, v. 140, n. 3, p. 1236-1244, mar. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6548>. Acesso em: 03 mar. 2026.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/s0074-7696>. Acesso em: 22 fev. 2026.

HONDA, A. *et al.* Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 104, n. 30, p. 12389-12394, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0703787104>. Acesso em: 03 mar. 2026.

HOSAKA, T. *et al.* Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in

mice reveals their functional diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 101, n. 9, p. 2975-2980, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0400093101>. Acesso em: 03 mar. 2026.

HREINSSON, J. G. et al. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Chevy Chase, v. 87, n. 1, p. 316-321, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8185>. Acesso em: 03 mar. 2026.

HUANG, C. et al. Growth differentiation factor 9 activates the TGF- β pathway in follicle atresia of Muscovy ducks. **Poultry Science**, v. 103, n. 12, p. 104278, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104278>. Acesso em: 22 fev. 2026.

HUANG, L. et al. Specific disruption of Tsc1 in ovarian granulosa cells promotes ovulation and causes progressive accumulation of corpora lutea. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, e54052, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054052>. Acesso em: 03 mar. 2026.

HUANG, Zichao et al. Sphingosine Phosphate Enhances Primordial Follicle Activation via LATs Inhibition in the Hippo Signaling Pathway. 2024. (Preprint). Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4567121/v1>. Acesso em: 05 mar. 2026.

HULSHOF, S. C. J. et al. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, Nova York, v. 44, n. 2, p. 217-226, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00171-4](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00171-4). Acesso em: 03 mar. 2026.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 162-177, mar./abr. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi001>. Acesso em: 04 mar. 2026.

IBGE. Agropecuária impulsiona crescimento do PIB em 2025 com alta de 11,7% no setor. Rio de Janeiro: IBGE, 2026. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 mar. 2026.

IRVING-RODGERS, H. F.; HARLAND, M. L.; RODGERS, R. J. A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle. **Matrix Biology**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 207-217, jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.05.008>. Acesso em: 03 mar. 2026.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, Nova York, v. 45, n. 4, p. 889-895, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00017-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00017-9). Acesso em: 03 mar. 2026.

JINNO, M. Ovarian stimulation by promoting basal follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 23, 35, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12958-025-01356-5>. Acesso em: 4 mar. 2026.

JOHN, G. B. et al. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, San Diego, v. 321, n. 1, p. 197-204, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.017>. Acesso em: 03 mar. 2026.

JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 185-201, out. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00090-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00090-3). Acesso em: 04 mar. 2026.

JOSHI, S.; DAVIES, H.; SIMS, L. P.; LEVY, S. E.; DEAN, J. Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 67, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-67>. Acesso em: 22 fev. 2026.

JOYCE, I. M. et al. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, San Diego, v. 214, n. 2, p. 342-353, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9437>. Acesso em: 03 mar. 2026.

JUENGEL, J. L. et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, n. 6, p. 1777-1789, dez. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>. Acesso em: 03 mar. 2026.

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 143-160, mar./abr. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh061>. Acesso em: 03 mar. 2026.

KATSO, R.; OKKENHAUG, K.; AHMADI, K.; WHITE, S.; TIMMS, J.; WATERFIELD, M. D. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 615-675, nov. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.615>. Acesso em: 2 mar. 2026.

KAWAMURA, K. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 110, n. 43, p. 17474-17479, out. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110>. Acesso em: 5 mar. 2026.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191-206, ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>. Acesso em: 22 fev. 2026.

KOSHIMIZU, U.; WATANABE, M.; NAKATSUJI, N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 168, p. 683-685, apr. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1113>. Acesso em: 22 fev. 2026.

KOYAMA, K.; KOYAMA, T.; SUGIMOTO, M. Repeatability of antral follicle count according parity in dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 64, n. 6, p. 535-539, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-062>. Acesso em: 04 mar. 2026.

KOYAMA, T. et al. Assessment of anti-Müllerian hormone levels as a reproductive indicator in Japanese Black cattle. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 70, n. 6, p.

389-395, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2024-047>. Acesso em: 04 mar. 2026.

KUNDU, S.; KUMAR DAS, B.; DAS GUPTA, S. Hormonal symphony: The dynamic duo of IGF and EGF in gonadotropin-induced fish ovarian development and egg maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 273, p. 107663, 2024. Disponível em: <https://10.1016/j.anireprosci.2024.107663>. Acesso em: 17 mar. 2026.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, Cambridge, v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>. Acesso em: 03 mar. 2026.

LAWSON, K. A. et al. BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes & Development**, v. 13, p. 424-436, feb. 1999, Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.424>. Acesso em: 14 fev. 2026.

LEE, J. Y.; ENGELMAN, J. A.; CANTLEY, L. C. Biochemistry: PI3K charges ahead. **Science**, New York, v. 317, n. 5835, p. 206-207, jul. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1146073>. Acesso em: 2 mar. 2026.

LEE, V. H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, n. 2, p. 401-408, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.401>. Acesso em: 03 mar. 2026.

LEMIRE, J. M. et al. Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 190, n. 1, p. 38-45, jan. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.10043>. Acesso em: 03 mar. 2026.

LI, M. D. et al. An update on the role of ADAMTS proteoglycanase in female reproductive system. **Sheng Li Xue Bao**, [Beijing], v. 77, n. 1, p. 151-166, 25 fev. 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40065623/>. Acesso em: 03 mar. 2026.

LI, Y. et al. EGF-like growth factors upregulate pentraxin 3 expression in human granulosa-lutein cells. **Journal of Ovarian Research**, v. 17, p. 106, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01430-3>. Acesso em: 22 fev. 2026.

LIANG, J. et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. **Nature Medicine**, New York, v. 8, n. 10, p. 1153-1160, out. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm761>. Acesso em: 2 mar. 2026.

LIMA, L. F. de; BRUNO, J. B.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. de. Papel da homeopatia na regulação da foliculogênese in vivo e in vitro. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p. 112-119, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.recli.2016.04.004>. Acesso em: 22 fev. 2026.

LIMA-VERDE, I. B. et al. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles E2 and FSH in the culture of goat preantral follicles. **Cells. Tissues Organs**, v. 191, p. 240-247, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000231484>. Acesso em: 22 fev. 2026.

LIU X et al. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice.

Endocrinology, 1999 Jun;140(6):2480-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6827>. Acesso em: 03 mar. 2026.

LIU, X. et al. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. **Endocrinology**, Philadelphia, v. 139, n. 5, p. 2342-2347, maio 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.139.5.5987>. Acesso em: 03 mar. 2026.

LIU, Y. et al. Rescue of oocyte re-awakening failure in Exoc1-G-cKO mice using a PTEN inhibitor. **Cell Death Discovery**, v. 11, n. 45, p. 1-9, 2025. Disponível em: <https://10.1038/s41420-025-02291-5>. Acesso em: 17 mar. 2026.

LUAN, Y. et al. KIT in oocytes: a key factor for oocyte survival and reproductive lifespan. **EBioMedicine**, v. 106, p. 105263, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105263>. Acesso em: 22 fev. 2026.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n. 7, p. 1344-1349, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016>. Acesso em: 03 mar. 2026.

MAGOFFIN, D. A.; WEITSMAN, S. R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 51, n. 4, p. 766-775, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.4.766>. Acesso em: 03 mar. 2026.

MAIDARTI, M. et al. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 297-307, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/dey354>. Acesso em: 2 mar. 2026.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, Cambridge, v. 129, n. 7, p. 1261-1274, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>. Acesso em: 2 mar. 2026.

MAO, J. et al. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, n. 4, p. 1197-1203, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.003152>. Acesso em: 14 fev. 2026.

MARTINS, F. S.; et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 916-924, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/rd08108>. Acesso em: 22 fev. 2026.

MATOS, M. H. T. et al. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, may. 2007. Disponível

em: <https://doi.org/10.1017/S0967199407004169>. Acesso em: 22 fev. 2026.

MATOS, M. H. T. et al. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, Nova York, v. 62, n. 1-2, p. 65-80, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.025>. Acesso em: 03 mar. 2026.

MATOS, M.H.T. et al. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Research in Veterinary Science**, v. 90, p. 404–411, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.007>. Acesso em: 22 fev. 2026.

McARTHUR, M. E. et al. Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, n. 3, p. 913-924, set. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.913>. Acesso em: 03 mar. 2026.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200–214, apr. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>. Acesso em: 22 fev. 2026.

MCGEE, E. A.; PERLAS, E.; LAPOLT, P. S. Follicle-Stimulating Hormone Enhances the Development of Preantral Follicles in Juvenile Rats. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 57, n. 5, p. 990–998, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.990>. Acesso em: 14 fev. 2026.

McLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v. 137, p. 1-11, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-08-0118>. Acesso em: 22 fev. 2026.

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**, Bristol, v. 139, n. 6, p. 971-978, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0025>. Acesso em: 03 mar. 2026.

McNATTY, K. P. et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 11–20, may. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/s0303-7207>. Acesso em: 22 fev. 2026.

MENKE, D. B.; KOUBOVA, J.; PAGE, D. C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. **Developmental Biology**, v. 262, p. 303–312, oct. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00391-9](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00391-9). Acesso em: 22 fev. 2026.

MIHM, M.; BLEACH, E. C. L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3-4, p. 217-237, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00092-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00092-7). Acesso em: 5 mar. 2026.

MOCTEZUMA, Z. B., GONZÁLEZ-ARETIA, D., HERNÁNDEZ-CORONADO, C. G. Effects and action mechanism of gonadotropins on ovarian follicular cells: A novel role of Sphingosine-1-Phosphate (S1P). A review. **General and comparative endocrinology**, v. 357,

p.114593, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2024.114593>. Acesso em: 22 fev. 2026.

MODINA, S. C. et al. Reductions in the number of mid-sized antral follicles are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, Clayton, v. 26, n. 2, p. 235-244, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD12295>. Acesso em: 04 mar. 2026.

MONFERINI, N. et al. Age-dependent high-yield isolation of primordial, primary, and early secondary follicles from the bovine ovarian cortex. **Reproduction**, Bristol, v. 167, n. 6, e240060, jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-24-0060>. Acesso em: 04 mar. 2026.

MOON, J. et al. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count as predictors for optimal selection of Hanwoo donor cows in superstimulated oocyte collection. **Journal of Animal Science and Technology**, Seoul, v. 67, n. 4, p. 773-785, jul. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.5187/jast.2024.e51>. Acesso em: 04 mar. 2026.

MOROTTI, F. et al. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 14, n. 3, p. 514-521, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR994>. Acesso em: 14 fev. 2026.

MOROTTI, F. et al. Evaluation of three classification methods of antral follicle count and fertility to the timed artificial insemination in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, e20210121, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0121>. Acesso em: 04 mar. 2026.

NADENDLA, E. K. et al. Caspases: structural and molecular mechanisms and functions in cell death, innate immunity, and disease. **Cell Discovery**, London, v. 11, n. 1, 42, maio 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41421-025-00791-3>. Acesso em: 04 mar. 2026

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, n. 3, p. 1018-1024, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002527>. Acesso em: 03 mar. 2026.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 214, p. 19–25, feb. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.12.001>. Acesso em: 22 fev. 2026.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 175, n. 1-2, p. 123-130, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00391-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00391-4). Acesso em: 03 mar. 2026.

NOVELLA-MAESTRE, E. et al. Short-Term PTEN Inhibition Improves In Vitro Activation of Primordial Follicles, Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, e0127786, 29 maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127786>. Acesso em: 2 mar. 2026.

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 developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682–1686, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013029>. Acesso em: 22 mar. 2026.

OKTAY, K. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, Nova York, v. 67, n. 3, p. 481-486, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)80073-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)80073-8). Acesso em: 03 mar. 2026.

ORISAKA, M. et al. Growth Differentiation Factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2456-2468, oct. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2005-0357>. Acesso em: 14 fev. 2026.

OROZCO-GALINDO, B. V. et al. Folliculogenesis: a cellular crosstalk mechanism. **Current Issues in Molecular Biology**, Basel, v. 47, n. 2, 113, fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cimb47020113>. Acesso em: 04 mar. 2026.

OTSUKA, F.; MCTAVISH, K. J.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 78, n. 1, p. 9-21, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>. Acesso em: 03 mar. 2026

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 4, p. F608-F627, abr. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00284.2002>. Acesso em: 04 mar. 2026.

PAN, J. et al. Research progress on the regulation of primordial follicle activation. **Journal of Shandong University (Health Sciences)**, v. 62, n. 9, p. 1-7, 2024. Disponível em: <http://yxbwk.njournal.sdu.edu.cn/EN/Y2024/V62/I8/74>. Acesso em: 22 fev. 2026.

PARROTT, J. A. et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 135, n. 2, p. 569-575, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.135.2.8033804>. Acesso em: 03 mar. 2026.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 138, n. 9, p. 3819-3827, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5368>. Acesso em: 03 mar. 2026.

PEPLING, M. E.; SPRADLING, A. C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Developmental Biology**, v. 234, p. 339–351, jun. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>. Acesso em: 22 fev. 2026.

PICH, K. et al. Intelectin-1 promotes granulosa cells' proliferation and modulates apoptosis via ERK1/2, AKT, and insulin receptor signaling pathways in Large White and Meishan pigs. **General and Comparative Endocrinology**, v. 362, 114722, 2025. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2025.114722>. Acesso em: 03 mar. 2026.

PORTELA, V. M. et al. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 92, n. 1, 14, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121376>. Acesso em: 04 mar. 2026.

PRICE, C. A. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 228, n. 2, p. R31-R43, fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0414>. Acesso em: 03 mar. 2026.

PRINCIVALLE, M. et al. Anticoagulant heparan sulfate proteoglycans expression in the rat ovary peaks in preovulatory granulosa cells. **Glycobiology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 183-194, mar. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/11.3.183>. Acesso em: 03 mar. 2026.

RANKIN, T. L. et al. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 7, p. 1119-1126, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.128.7.1119>. Acesso em: 03 mar. 2026.

RAVINDRANATH, N. et al. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 131, n. 1, p. 254-260, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.131.1.1612003>. Acesso em: 03 mar. 2026.

REDDY, P. et al. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, San Diego, v. 281, n. 2, p. 160–170, 15 maio 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.013>. Acesso em: 2 mar. 2026.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, New York, v. 319, n. 5863, p. 611–613, 1 fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1152257>. Acesso em: 2 mar. 2026.

REDDY, P. et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 18, n. 15, p. 2813–2824, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp217>. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/18/15/2813/636014>. Acesso em: 21 mar. 2026.

REDMER, D. A. et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 65, n. 3, p. 879-889, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.879>. Acesso em: 03 mar. 2026.

RIBEIRO, Regislane P. et al. Effects of jacalin and follicle-stimulating hormone on in vitro goat primordial follicle activation, survival and gene expression. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 537–549, ago. 2015. DOI: [10.1017/S0967199414000173](https://doi.org/10.1017/S0967199414000173). Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199414000173>. Acesso em: 21 mar. 2026.

RODGERS, R. J. et al. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, Bristol, v. 139, n. 2, p. 309-318, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-09-0177>. Acesso em: 04 mar. 2026.

ROMANO, M. et al. Comparison between transforming growth factor alpha and epidermal

growth factor in the protection of rat gastric mucosa against drug-induced injury. **Italian Journal of Gastroenterology**, Roma, v. 26, n. 5, p. 223-228, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7522648/>. Acesso em: 03 mar. 2026.

ROY, S. K.; KOLE, A. R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 207-214, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/4.3.207>. Acesso em: 03 mar. 2026.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v. 24, p. 77-92, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6847603/>. Acesso em: 22 fev. 2026.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, 63:27–39, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00162-7). Acesso em: 14 fev. 2026.

SANTOS, André Luiz da Conceição et al. Fator de crescimento e diferenciação - 9 (GDF-9) aumenta a taxa de crescimento in vitro de folículos antrais iniciais caprinos isolados. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 24, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-74980P>. Acesso em: 03 mar. 2026.

SARAIVA, M. V. A. et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1135–1143, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/19337191110379269>. Acesso em: 22 mar. 2026.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 528-537, fev. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3). Acesso em: 04 mar. 2026.

SARTORI, R. *et al.* Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 86, p. 32-40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>. Acesso em: 5 mar. 2026.

SATHANANTHAN, A. H.; SELVARAJ, K.; TROUNSON, A. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 161, p. 3-8, mar. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00216-6](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00216-6). Acesso em: 22 fev. 2026.

SAWYER, H. T. et al. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1134-1150, apr. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1134>. Acesso em: 22 fev. 2026.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 69, n. 1, p. 269-277, jul. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011577>. Acesso em: 03 mar. 2026.

SENEDA, M. M. *et al.* Oogênese e Foliculogênese em Bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 45, p. 323-328, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.042>. Acesso em: 5 mar. 2026.

SHENG, X. *et al.* Temporal and spatial dynamics mapping reveals follicle development regulated by different stromal cell populations. **Journal bioRxiv**, Cold Spring Harbor, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.03.04.480328>. Acesso em: 04 mar. 2026.

SILVA, B. R. *et al.* Melatonin acts through different mechanisms to control oxidative stress and primordial follicle activation and survival during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. **Domestic Animal Endocrinology**, Amsterdam, v. 86, 106824, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2023.106824>. Acesso em: 14 fev. 2026.

SILVA, J. R. *et al.* Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 70, n. 1, p. 11-19, jan. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20127>. Acesso em: 03 mar. 2026.

SILVA, J. R. V. *et al.* The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 113- 125, apr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.1.06487>. Acesso em: 22 fev. 2026.

SILVA, J. R. V. *et al.* Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691-1704, jun. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.014>. Acesso em: 22 fev. 2026.

SILVA, J. R. V.; FÉLIX, E. da S. Characteristics of collagen in ovarian extracellular matrix and its relationship with the development of primordial follicles up to ovulation. **Animal Reproduction**, v. 22, n. 1, e20250068, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.108029>. Acesso em: 14 fev. 2026.

SILVA, J. R. V.; VAN-DEN-HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. **Zygote**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 107–117, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199406003650>. Acesso em: 14 fev. 2026.

SIMON, L. E.; KUMAR, T. R.; DUNCAN, F. E. *In vitro* ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 103, p. 455–470, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa073>. Acesso em: 5 mar. 2026.

SIROTKIN, A. V. *et al.* Interrelationships between ovarian follicles grown in culture and possible mediators. **Reproductive Biology**, Warsaw, v. 17, n. 1, p. 97-104, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.01.005>. Acesso em: 03 mar. 2026.

SLOT, K. A. *et al.* Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 188, n. 2, p. 179-192, fev. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.1.06165>. Acesso em: 04 mar. 2026.

SMITZ, J. *et al.* Effects of recombinant activin A on *in vitro* culture of mouse preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, Nova York, v. 50, n. 3, p. 294-304,

1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199807\)50:3<294::AID-MRD5>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199807)50:3<294::AID-MRD5>3.0.CO;2-E). Acesso em: 03 mar. 2026.

SPICER, L. J. et al. 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**, v. 78, p. 243–253, feb. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063446>. Acesso em: 14 fev. 2026.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 329-39, may. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.1.06503>. Acesso em: 14 fev. 2026.

SUGIURA, K. et al. Paracrine regulation of granulosa cell development in the antral follicles in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, [Tóquio], v. 22, n. 1, e12538, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12538>. Acesso em: 03 mar. 2026.

TANAKA, K. *et al.* Abnormal early folliculogenesis due to impeded pyruvate metabolism in mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 105, p. 64-75, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab064>. Acesso em: 5 mar. 2026.

TANAKA, Y. et al. Deletion of tuberous sclerosis 1 in somatic cells of the murine reproductive tract causes female infertility. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 153, n. 1, p. 404-416, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2011-1191>. Acesso em: 03 mar. 2026.

TAYLOR, P. D.; HILLIER, S. G.; FRASER, H. M. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 183, n. 1, p. 1-17, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.1.05685>. Acesso em: 03 mar. 2026.

TERREN, C; MUNAUT, C. Primordial follicle activation during transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Reproductive Sciences*, 28, 1257-1266, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00318-z>. Acesso em: 22 fev. 2026.

THOMAS, F. H. et al. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 146, n. 2, p. 941-949, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2004-0826>. Acesso em: 03 mar. 2026.

THOMAS, F. H.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 1, n. 76, p. 1-7, nov. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-76>. Acesso em: 03 mar. 2026.

TOHUMCU, V. et al. Hormonal and metabolic effects on antral follicle count in dairy cows. **Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Şanlıurfa, v. 14, n. 1, p. 25-30, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.31196/huvfd.1603378>. Acesso em: 04 mar. 2026.

TURLEY, J.; LEONG, K. W.; CHAN, C. J. Novel imaging and biophysical approaches to study tissue hydraulics in mammalian folliculogenesis. **Biophysical Reviews**, [Berlim], v. 16,

n. 5, p. 625-637, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12551-024-01231-4>. Acesso em: 03 mar. 2026.

UJU, Chinelo N.; UNNIAPPAN, Suraj. Growth factors and female reproduction in vertebrates. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 579, p. 112091, jan. 2024. DOI: 10.1016/j.mce.2023.112091. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.112091>. Acesso em: 21 mar. 2026.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation, and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717– 1751, apr. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>. Acesso em: 22 fev. 2026.

VASCONCELOS, G. L. et al. Antral follicular count and its relationship with ovarian volume, preantral follicle population and survival, oocyte meiotic progression and ultrastructure of in vitro matured bovine cumulus-oocyte complexes. **Zygote**, Cambridge, v. 28, n. 6, p. 495-503, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199420000386>. Acesso em: 03 mar. 2026.

VERNON, R. K.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 2696-2702, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/1994.72102696x>. Acesso em: 03 mar. 2026.

VITALE, F.; DOLMANS, M. M. Comprehensive Review of *In Vitro* Human Follicle Development for Fertility Restoration: Recent Achievements, Current Challenges, and Future Optimization Strategies. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 13, 1791, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm13061791>. Acesso em: 5 mar. 2026.

VO, K. C. T.; KAWAMURA, K. In vitro activation early follicles: from the basic science to the clinical perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 7, 3785, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22073785>. Acesso em: 04 mar. 2026.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 4, p. 817-832, mar. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00011-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00011-8). Acesso em: 03 mar. 2026.

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 47, n. 5, p. 807-813, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.5.807>. Acesso em: 03 mar. 2026.

WANG, C.; PROSSNITZ, E. R.; ROY, S. K. G Protein-Coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary. **Endocrinology**, v. 149, p. 4452–4461, sep. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2008-0441>. Acesso em: 22 fev. 2026.

WANG, C.; ROY, S. K. Expression of E-Cadherin and N-Cadherin in perinatal hamster ovary:

Possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 151, p. 2319–2330, may. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2009-1489>. Acesso em: 22 fev. 2026.

WANG, Cheng; ROY, Shyamal K. Expression of growth differentiation factor 9 in the oocytes is essential for the development of primordial follicles in the hamster ovary. **Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 1725–1734, 2006. DOI: 10.1210/en.2005-1208. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2005-1208>. Acesso em: 29 abr. 2026.

WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 70, n. 3, p. 577–585, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023234>. Acesso em: 03 mar. 2026.

WANG, R. N. et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. **Genes & Diseases**, v. 1, n. 1, p. 87–105, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.07.005>. Acesso em: 14 fev. 2026.

WANG, S. et al. Unraveling the function of TSC1-TSC2 complex: implications for stem cell fate. **Stem Cell Research & Therapy**, Londres, v. 16, n. 1, p. 38, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04170-3>. Acesso em: 03 mar. 2026.

WANG, Y.; LI, J.; WANG, C.Y.; KWOK, A.H.Y.; LEUNG, F.C. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary. I. Evidence for heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) as a potential oocyte-derived signal to control granulosa cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. **Endocrinology**, 148:3426–3440, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2006-1383>. Acesso em: 14 fev. 2026.

WRIGHT, C. S. et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 1555–1562, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/14.6.1555>. Acesso em: 14 fev. 2026.

WU, J. et al. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, n. 1, p. 320–327, jul. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.320>. Acesso em: 03 mar. 2026.

WU, Z.; LIU, K.; ZHANG, C. Clinical applications of in vitro primordial follicle activation. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, [S. l.], v. 18, p. 194–200, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.020>. Acesso em: 14 fev. 2026.

XIE, Q., LIAO, Q., WANG, L. et al. The Dominant Mechanism of Cyclophosphamide-Induced Damage to Ovarian Reserve: Premature Activation or Apoptosis of Primordial Follicles? **Reproduction Science**, v. 31, p. 30–44, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-023-01294-w>. Acesso em: 22 fev. 2026.

XU, B. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 1, e16046, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0016046>. Acesso em: 14 fev.

2026.

YANG, H. et al. Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb. **Nature Communications**, Londres, v. 12, n. 1, p. 312, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20522-4>. Acesso em: 03 mar. 2026.

YOON, S. Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulation induces the activation of mouse primordial follicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3120, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21093120>. Acesso em: 22 fev. 2026.

ZANGIROLAMO, A. F. et al. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 15, n. 3, p. 310-315, jul./set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0072>. Acesso em: 04 mar. 2026.

ZHANG, J. et al. Mechanism of Culuan Heji in regulating AMPK/mTOR/HIF-1/VEGF pathway to improve oxidative stress and apoptosis in rats with follicular maldevelopment. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, v. 30, n. 16, p. 76-84, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20240436>. Acesso em: 22 fev. 2026.

ZHANG, P. et al. In vitro effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Bruxelas, v. 21, n. 8, p. 301-306, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/B:JARG.0000043704.10845.87>. Acesso em: 03 mar. 2026.

ZHANG, T. et al. Mechanisms of follicular atresia: focus on apoptosis, autophagy, and ferroptosis. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 16, 1603467, set. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1603467>. Acesso em: 04 mar. 2026.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; SHENG, X. A more natural follicle culture system: Detailed steps of *In Vitro* 3D follicle culture with alginate gel. **MethodsX**, Amsterdam, v. 12, 102756, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102756>. Acesso em: 5 mar. 2026.

ZHAO, J. et al. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 65, n. 3, p. 967-977, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.967>. Acesso em: 03 mar. 2026.

ZHAO, Y. et al. Current understandings of core pathways for the activation of mammalian primordial follicles. **Cells**, Basel, v. 10, n. 6, p. 1491, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10061491>. Acesso em: 03 mar. 2026.

ZIEGLER, Ursula; GROSCURTH, Peter. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 124–128, 2004. DOI: 10.1152/nips.01519.2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>. Acesso em: 29 abr. 2026.

ZOHEIR, K. M. A. et al. Effect of alpha lipoic acid on in vitro development of bovine secondary preantral follicles. **Theriogenology**, Nova York, v. 88, p. 124-130, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.013>. Acesso em: 03 mar. 2026.

ZUSSMAN, Jay W. et al. Evaluating Selective Quality Control in Mammalian Oogenesis: Evidence and Opportunities. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 59, n. 1, p. 237–270, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021925-093551>. Acesso em: 14 mar. 2026.