



Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas

Artificial ovary technology: applications, state of art, limitations and prospects

José Ricardo de Figueiredo¹, Laritza Ferreira de Lima

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza CE, Brasil.

¹Correspondência: lamofopa@gmail.com

Resumo

O ovário dos mamíferos contém de milhares a milhões de oócitos imaturos, sendo a maioria (cerca de 90%) incluída nos folículos pré-antrais. Entretanto, *in vivo* a quase totalidade destes folículos será eliminada por um processo fisiológico denominado de atresia. Portanto, os principais objetivos da tecnologia do ovário artificial são: 1- Resgatar os folículos pré-antrais dos ovários antes que eles se tornem atresícos e 2- cultivar *in vitro* estes folículos até a maturação, com o propósito de produzir oócitos aptos a serem utilizados para a produção *in vitro* de embriões. Este artigo de revisão descreve as aplicações e estado da arte da tecnologia do ovário artificial, bem como discute os principais resultados, limitações e perspectivas do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, com ênfase nos pequenos ruminantes.

Palavras-chave: pequenos ruminantes, cultivo *in vitro*, folículos pré-antrais, embrião.

Abstract

The mammalian ovary contains from thousands to millions of immature oocytes being most of them (approximately 90%) enclosed in preantral follicles. However, in vivo the vast majority of follicles will be eliminated by a physiological process named atresia. Therefore, the main goals of the artificial ovary technology are: 1- to recover preantral follicles from the ovary before they become atretic and 2- in vitro culture those follicles up to maturation stages for the purpose of producing oocytes to be used for further in vitro embryo production. This review article describes the applications and state of art of the artificial ovary technology as well as discusses the main results, limitations and prospects of in vitro follicle culture focus on small ruminants.

Keywords: small ruminant, in vitro culture, preantral follicles, embryo.

Introdução

Várias biotécnicas de reprodução assistida em animais de produção têm sido aplicadas nos rebanhos e são responsáveis por um grande potencial de inovação na pecuária, principalmente em relação aos pequenos ruminantes, exercendo um significativo impacto na produção de alimentos e geração de riquezas para o setor do agronegócio no Brasil. Desta forma, o aprimoramento das técnicas para maximizar a utilização do potencial reprodutivo desses animais, poderá garantir a produção de mais alimentos, de alta qualidade e módico custo para as populações. Além disso, esses recursos genéticos melhorados de animais valiosos poderão ser preservados em criobancos para utilização futura (Figueiredo et al., 2008). Dentre as biotécnicas que visam a otimização da utilização do potencial reprodutivo das fêmeas pode-se destacar a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).

A MOIFOPA, conhecida como “Ovário Artificial”, compreende as etapas de isolamento, conservação (resfriamento e/ou criopreservação) e cultivo *in vitro* de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) (Figueiredo et al., 2008). Até o presente momento, o resultado mais promissor oriundo dessa biotécnica foi o nascimento de crias vivas na espécie murina (O’Brien et al., 2003). Ao contrário, em espécies domésticas como caprina (Saraiva et al., 2010) e ovina (Arunakumari et al., 2010) apenas um número restrito e extremamente variável de embriões tem sido relatado.

A presente revisão tem como objetivo abordar as aplicações, estado atual, principais resultados, limitações e perspectivas da tecnologia do ovário artificial com ênfase no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes.

Bases gerais da foliculogênese

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa - CG e tecais - CT). A população de folículos no ovário varia de milhares a milhões (1.500 em camundongas – Shaw et al., 2000; 2.500.000 em humanas - Wallace e Kelsey, 2010) e pode ser influenciada por fatores como espécie, etnia, genética (Silva-Santos et al., 2011), idade (Roy e Treacy, 1993)

e estado reprodutivo (Erickson, 1986). A formação dos folículos ovarianos e, conseqüentemente, dos oócitos neles contidos, inicia-se no período pré-natal. Na época do nascimento, a depender da espécie de mamífero, o ovário contém sua quota máxima de folículos primordiais, os quais estão quiescentes e contêm todos os oócitos potencialmente disponíveis para fertilização durante toda a vida fértil. Embora muitos cientistas acreditem que o estoque de folículos ovarianos seja finito e não renovável, estudos apresentam evidências de que pode ocorrer uma pequena renovação na população folicular através da diferenciação das células tronco presentes no ovário, a neofoliculogênese (Silva-Santos et al., 2013).

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo pré-ovulatório. Durante o processo de foliculogênese, a morfologia folicular é alterada devido ao crescimento oocitário, à proliferação e à diferenciação das CG, ao aparecimento das CT, da zona pelúcida e de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antra (Van Den Hurk e Zhao, 2005). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários, representados pelos folículos primordiais, intermediários, primários e secundários e b) folículos antrais ou cavitários, constituído pelos folículos terciários e folículos pré-ovulatórios ou de De Graaf. Vale ressaltar que os FOPA representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos (Figueiredo et al., 2008).

Regulação da foliculogênese

Durante a vida reprodutiva das fêmeas, o desenvolvimento folicular depende da perfeita interação entre fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos (Fortune, 2003). Esses fatores são os principais responsáveis pelo controle da ativação e do crescimento desses folículos (Picton et al., 2008). Nos processos parácrinos e autócrinos, o próprio oócito desempenha um papel importante na determinação do seu próprio destino através da produção de fatores de crescimento (como, por exemplo, a proteína morfogenética óssea 15 [BMP15] e o fator de crescimento e diferenciação 9 [GDF9]), que vão interagir com as células somáticas (CG e CT) e proporcionar o desenvolvimento folicular. Tanto as CG como as CT também produzem seus próprios fatores parácrinos (kit ligante [KL], ativinas, inibinas, hormônio antimülleriano [AMH]) e os hormônios esteroides (estradiol, progesterona e testosterona), os quais, além de coordenar o crescimento do oócito, regulam a proliferação das CG e diferenciação das CT (Lima et al., 2016a; Figueiredo et al., 2008). Na regulação endócrina, diversos hormônios promovem o desenvolvimento folicular, dentre eles pode-se destacar as gonadotrofinas, como o hormônio foliculo estimulante (FSH) (Fortune, 2003).

Embora os fatores citados acima sejam em sua maioria estimulatórios, existe uma grande quantidade de fatores inibitórios (PTEN, PDK1, Rps6 ou Foxo3) responsáveis pela manutenção do estoque ovariano, ou seja, que inibem a ativação dos milhares de folículos primordiais (Jonh et al., 2008; Reddy et al., 2008). Grande parte dos folículos ovarianos é ativada e passa a se desenvolver para estádios mais avançados, podendo culminar em alguns casos com a formação do folículo pré-ovulatório. No entanto, apenas uma pequena parte (0,01%) é capaz de se desenvolver até a ovulação, a grande maioria (99,9%) é perdida por um processo natural conhecido como atresia (morte folicular). A atresia folicular é um processo de duração ainda pouco conhecida, que não é igualmente prevalente em todos os estágios do desenvolvimento folicular (Figueiredo et al., 2008). Independente da fase na qual ocorre e, apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, conseqüentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal.

Foliculogênese *in vitro*: importância da tecnologia do ovário artificial

Como mencionado anteriormente, o ovário é composto por uma grande população de FOPA, sendo que a maioria dos folículos morre e apenas uma pequena proporção destes alcança a ovulação, tornando o rendimento ovariano (número de ovulações durante a vida em relação ao total de folículos presentes) muito baixo. Assim, com o intuito de evitar a grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* devido a atresia, a biotécnica de MOIFOPA, também conhecida como Ovário Artificial, vem sendo desenvolvida.

A biotécnica de MOIFOPA consiste 1) no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, 2) na conservação visando a estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (criopreservação) período e 3) no cultivo folicular, que tem como finalidade promover o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente incluídos em FOPA. Dessa forma, considerando-se o fato de que a quase totalidade dos oócitos será eliminada pelo processo de atresia, caso eles permaneçam no interior dos ovários, a biotécnica de MOIFOPA se fundamenta em dois objetivos principais, a saber: 1) resgatar ou isolar os FOPA a partir dos ovários antes que eles se tornem atresicos e 2) cultivar os FOPA e, conseqüentemente, os oócitos imaturos neles incluídos, até o estágio de maturação. Assim, essa biotécnica tem diversas aplicações, algumas imediatas, outras no futuro próximo, tais como: a) aumento da produção de descendentes de animais de alto valor zootécnico ou em perigo de extinção; b) formação de bancos de germoplasma animal (oócitos); c) realização de testes *in vitro* da



ação de fármacos (benéfica ou tóxica), radioatividade, vacinas imunoesterilizantes e nanopartículas sobre os oócitos, que se apresentam como uma opção ao uso de animais vivos em experimentos; d) reprodução assistida de humanos (preservação da fertilidade em pacientes portadores de enfermidades como o câncer bem como tratamento de infertilidade); e) redução do intervalo entre gerações em animais por meio da utilização de ovários de animais jovens (fetos, recém-nascidos e animais pré-púberes); f) recuperação da genética de rebanhos eliminados por problemas sanitários, desde que não haja comprometimento do ovário; g) utilização de ovários de animais que não respondem a tratamentos de superovulação ou mesmo após a sua morte, desde que a colheita dos ovários seja realizada antes que a sua degeneração ocorra; h) melhora e padronização dos resultados de técnicas como a fertilização *in vitro*, clonagem, transgênese e transferência de embriões; i) pesquisa fundamental: fonte abundante de informações a respeito da foliculogênese na fase pré-antral (Figueiredo et al., 2008).

Estado atual da tecnologia do ovário artificial

Grandes progressos já foram obtidos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em espécies animais. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos a partir de estudos *in vitro* com o cultivo de folículos pré-antrais de fêmeas de camundongos, os quais demonstraram que é possível a obtenção de crias vivas a partir de oócitos oriundos de folículos cultivados *in vitro* (O'Brien et al., 2003). Já em caprinos (Saraiva et al., 2010), ovinos (Arunakumari et al., 2010), bubalinos (Gupta et al., 2008), suínos (Wu et al., 2001) e primatas não-humanos (Xu et al., 2011), o cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros, os quais foram fecundados *in vitro*, gerando embriões. Por outro lado, em humanos (Roy e Treacy, 1993), bem como nas espécies bovina (Gutierrez et al., 2000) e canina (Serafim et al., 2010), FOPA isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram somente até o estágio antral. Consequentemente, a quantidade de embriões produzidos a partir de oócitos provenientes de FOPA crescidos *in vitro* ainda é limitada nestas espécies domésticas.

Principais fatores que afetam a eficiência do cultivo *in vitro* de FOPA (foliculogênese *in vitro*)

A eficiência do cultivo *in vitro* de FOPA pode ser afetada por fatores como o tipo de sistema de cultivo usado; a composição do meio de base; a concentração e associação de fatores adicionados ao meio de cultivo. No tocante aos sistemas de cultivo, os folículos ovarianos podem ser cultivados inclusos no próprio tecido ovariano ou no ovário inteiro (cultivo *in situ*); ou ainda na forma isolada (cultivo de folículos isolados) em um sistema bi ou tri-dimensional (Figueiredo et al., 2008). Em adição, pode ainda ser feito um cultivo em dois passos, no qual é realizado primeiramente o cultivo *in situ*, o que permite a ativação e o desenvolvimento do folículo primordial até estágio secundário, para posteriormente ser isolado e cultivado até o estágio antral (Telfer et al., 2008).

A composição do meio é outro fator importante para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de FOPA. Uma variedade de meios de base tem sido usada para o desenvolvimento *in vitro* de FOPA em muitas espécies, dentre eles o meio essencial mínimo (MEM – Matos et al., 2007); meio McCoy's (Telfer et al., 2008) e α -MEM (Saraiva et al., 2010). Esses meios são ainda comumente suplementados com diferentes substâncias, bem como diferentes fatores de crescimento (Telfer et al., 2008) e hormônios, tais como o FSH (Matos et al., 2007).

Diversos parâmetros vêm sendo utilizados para avaliar a eficiência do cultivo *in vitro* de FOPA, a saber: 1- sobrevivência folicular (Matos et al., 2007; Saraiva et al., 2010); 2- ativação de folículos primordiais (Matos et al., 2007); 3- crescimento folicular e oocitário; 4- capacidade para formar antro (transição de folículos pré-antrais para antrais); 5- expressão de RNAm para fatores chaves da foliculogênese; 6 Produção hormonal; 7- produção de oócitos completamente crescidos; 8- maturação oocitária nuclear e citoplasmática (Brito et al., 2014); 9- produção embrionária (Saraiva et al., 2010); 10- gestação e produção de crias saudáveis (O'Brien et al., 2003).

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

Os melhores resultados no cultivo de FOPA de ovinos foi obtido por Arunakumari et al. (2010) utilizando um meio de base suplementado com tiroxina (T4 1 μ g/mL), FSH (2 μ g/mL), IGF-I (10 ng/mL) e GH (1 mIU/mL). O referido meio melhorou o desenvolvimento *in vitro* de FOPA (250 a 400 μ m) em um cultivo de somente 6 dias, a maturação oocitária e o desenvolvimento de embriões até o estágio de mórula. Luz et al. (2012 e 2013) também conseguiram a obtenção de embriões por fertilização *in vitro* (FIV) ou partenogênese a partir do cultivo de FOPA por 18 dias em meio contendo LIF, FSH ou KL.

Especificamente em caprinos, os avanços mais significativos estão relacionados ao cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados, oriundos de estudos realizados pela equipe de LAMOFOPA-FAVET-UECE. Esse cultivo vem sendo desenvolvido em sistemas bi e tridimensionais. No sistema bidimensional, os resultados mais satisfatórios implicaram na produção de embriões caprinos a partir de folículos secundários (>150 μ m)

cultivados *in vitro* em meio contendo insulina (10 µg/mL), FSH recombinante bovino em concentrações crescentes (100 ng/mL até o dia 6, 500 ng/mL até o dia 12 e 1000 ng/mL até o dia 18 de cultivo) associados ao LH e EGF (ambos na concentração de 100 ng/mL; Saraiva et al., 2010), ao GH (50 ng/mL; Magalhães et al., 2011) ou ao VEGF (100 ng/mL; Silva et al., 2015). No entanto, os melhores resultados de maturação oocitária, cerca de 59,52% após cultivo folicular, foram obtidos utilizando folículos isolados inclusos em uma matriz de alginato a 0,25% e cultivados por 18 dias em um meio de base contendo concentrações crescentes de FSH (Brito et al., 2014).

A extrema dependência brasileira por insumos importados de alto custo e importantes para o desenvolvimento da biotecnologia em nosso país tem estimulado a equipe do LAMOFOPA-FAVET-UECE a utilizar a tecnologia do ovário artificial para investigar os possíveis efeitos benéficos/tóxicos de compostos extraídos de plantas da flora brasileira bem como medicamentos de baixíssimo custo oriundos de preparação homeopáticas cujo utilização vem sendo limitada pela carência de estudos consistentes. Dentre as plantas medicinais estudadas no LAMOFOPA, podemos destacar a *Auxemma oncocalyx* (Pau-Branco-do-Sertão). O extrato hidroalcoólico dessa planta mostrou ação antitumoral, analgésica e antiinflamatória, antiagregante plaquetária, antioxidante, antifúngica, antimalárica e leishmanicida (para uma revisão ver Leiva-Revilla, 2016). Um trabalho realizado pelo nosso grupo investigou o efeito da *Auxemma oncocalyx* e seu composto ativo a oncocalyxona A sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos tendo como controle positivo tóxico a Doxorubicina, um fármaco amplamente utilizado em pacientes com câncer. Resumidamente os resultados mostraram que: 1- A. *oncocalyx* e onco A afetaram a foliculogênese caprina *in vitro* de uma forma concentração-dependente apresentando-se menos tóxica do que a doxorubicina (Leiva-Revilla et al, 2016); 2- A. *oncocalyx* e onco A não apresentaram efeito tóxico sobre o desenvolvimento de folículos secundários isolados nem sobre as taxas de maturação *in vitro* de COCs (Leiva-Revilla, dados não publicados). No entanto, estas drogas influenciaram negativamente a viabilidade dos oócitos após a MIV. A doxorubicina, ao contrário da A. *oncocalyx* e onco A, reduziu a sobrevivência, formação de antro e crescimento folicular de folículos pré-antrais caprinos isolados cultivados *in vitro* (Leiva-Revilla dados não publicados).

Um outro componente estudado no cultivo de FOPA pela equipe do LAMOFOPA também extraído de plantas medicinais é o anetol. O anetol é um composto antioxidante presente em uma planta conhecida localmente como "canela de cunhã" ou "canelinha" (*Croton zehntneri*), e encontrado no Nordeste do Brasil. O ineditismo deste estudo deveu-se a ausência de informações referentes e efeito do anetol sobre a foliculogênese. Um dos estudos realizados pela nossa equipe foi investigar o efeito de diferentes concentrações do anetol no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados, tendo como controle positivo o ácido ascórbico, um potente agente antioxidante comumente utilizado em cultivo de folículos. Os resultados mostraram que o anetol, de forma concentração dependente foi capaz de melhorar o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos, reduziu a concentração das espécies reativas de oxigênio e promoveu um aumento no percentual de oócitos capazes de retomar a meiose, sendo significativamente superior ao ácido ascórbico na taxa de retomada da meiose (Sá et al., 2017).

Por fim, a equipe de LAMOFOPA-FAVET-UECE foi a primeira a investigar a influência de medicamentos diluídos/dinamizados (homeopáticos) na foliculogênese *in vitro*. Em um primeiro estudo (Lima et al., 2013) foi realizado um cultivo *in situ* de FOPA ovinos por sete dias na presença de diferentes dinamizações de FSH (FSH 6, 12 e 30 cH), adicionado diariamente ou a cada dois dias ao meio de cultivo. Observou-se que o cultivo no qual foi utilizada uma baixa dinamização (FSH 6 cH) estimulou o crescimento folicular, enquanto a alta (FSH 30 cH) reduziu esse crescimento. Além disso, FSH 6 cH adicionado diariamente mostrou resultado superior ao seu veículo (álcool cereal) na sobrevivência e ativação folicular precoce (após um dia –Lima et al., 2013). Recentemente, nossa equipe comparou o efeito de duas apresentações de FSH (FSH 6 cH e FSHr) no cultivo *in vitro* de FOPA ovinos inclusos em tecido ovariano (Lima et al., 2016b). Novamente, verificou-se que o FSH 6 cH melhora a sobrevivência e promove a ativação precoce (após um dia) quando comparado com o meio de cultivo controle, enquanto o FSHr melhora somente a ativação tardia (sete dias) em relação ao controle cultivado. Além disso, em todos os parâmetros (sobrevivência, ativação e crescimento folicular e oocitário), exceto na ativação precoce, essas duas apresentações foram semelhantes (Lima et al., 2016b), provando que o FSH homeopático (FSH 6 cH) pode substituir o FSH alopatóico no meio de cultivo de FOPA ovino.

Diante do efeito positivo do FSH homeopático na foliculogênese *in vitro* na fase pré-antral inicial (ativação de folículos primordiais), decidiu-se iniciar um estudo para investigar possíveis efeitos da homeopatia (FSH 6 cH) na foliculogênese pré-antral tardia. Usou-se para tanto o cultivo de FOPA secundários isolados na espécie ovina (Lima et al., 2017) e suína (Lima et al., dados não publicados). Em ovinos, verificou-se que o efeito do FSH homeopático (FSH 6 cH) sobre o desenvolvimento folicular e sobre a produção hormonal foi devido em parte ao veículo do FSH dinamizado, isto é, o álcool cereal (Lima et al., 2017). Já em suínos, o tratamento homeopático (FSH 6 cH) promoveu um aumento na formação da cavidade antral e na produção de progesterona em relação ao tratamento que continha somente meio de cultivo. Além disso, FSH 6 cH aumentou a produção de progesterona significativamente em relação ao seu veículo (Lima et al., dados não publicados). Esses resultados demonstraram que a homeopatia pode atuar de forma diferente do veículo sobre o desenvolvimento folicular sendo esse efeito provavelmente influenciado pela espécie animal, duração de cultivo



e composição do meio de cultivo.

Considerações finais

Conforme mostrado, a tecnologia do ovário artificial tem contribuído para a compreensão da foliculogênese, abrindo assim novas perspectivas para a produção em larga escala de embriões de animais geneticamente superiores. Folículos pré-antrais isolados de ovários de seres humanos, animais domésticos, silvestres e de laboratório podem ser cultivados *in vitro* em meios especiais permitindo um aumento da taxa de desenvolvimento folicular *in vitro*.

Atualmente, a tecnologia do ovário artificial resultou na produção de crias viáveis somente em animais de laboratório. Entretanto, o rápido avanço da ciência, associado as facilidades crescentes de trocas de informações entre laboratórios do mundo inteiro, poderão resultar, em um futuro breve, no desenvolvimento de um sistema de cultivo que permita um excelente crescimento e maturação foliculaseguido da produção de embriões e crias viáveis. Além disso, essa biotécnica pode ser utilizada para testes de novos fármacos que podem reduzir os custos da técnica, valorizar produtos nacionais, bem como validar algumas terapias alternativas como a homeopatia.

Referências bibliográfica

- Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH.** Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v.74, p.884-894, 2010.
- Brito IR, Silva CMG, Duarte ABG, Lima IMT, Rodrigues GQ, Rossetto R, Sales AD, Lobo CH, Bernuci MP, Rosa-E-Silva ACJS, Campello CC, Xu M, Figueiredo JR.** Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Mol Reprod Develop*, v.81, p.636-645, 2014.
- Erickson GF.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Sem Reprod Endocrinol*, v.4, p.233-254, 1986.
- Figueiredo JR, Gonçalves PBD, Freitas VJF.** Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2 ed. Roca, São Paulo, p.408, 2008.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163.
- Gupta PS, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH.** Foxo3 is a PI3K dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Develop Biol*, v.321, p.197-204, 2008.
- Leiva-Revilla J, Lima LF, Castro SV, Campello CC, Araújo VR, Celestino JJ, Pessoa OD, Silveira ER, Rodrigues AP, Figueiredo JR.** Fraction of auxemma oncocalyx and oncocalyxone A affects the *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles enclosed in ovarian cortical tissue. *Forsch Komplementmed*, v.23, p.307-313, 2016.
- Leiva-Revilla J.** Teste de toxicidade da fração da Auxemma oncocalyx e oncocalyxona A sobre o desenvolvimento folicular e embrionário *in vitro*. Tese (Doutorado). 149f. 2016. Fortaleza, Brazil, Universidade Federal do Ceará. 2016.
- Lima LF, Rocha RM, Alves AM, Saraiva MV, Araújo VR, Lima IM, Lopes CA, Bão SN, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR.** Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Homeopathy*, v.102, p.41-48, 2013.
- Lima LF, Rocha RMP, Duarte ABG, Brito IR, Silva GM, Rodrigues GQ, Nunes-Pinheiro DCS, Sales AD, Moura AA, Wheeler MB, Rodrigues APR, Campello CC, Figueiredo, JR.** Unexpected effect of the vehicle (grain ethanol) of homeopathic FSH on the *in vitro* survival and development of isolated ovine preantral follicles. *Microsc Res Tech*, 2916. Doi:10.1002/jemt.22810.
- Lima LF, Bruno JB, Silva AMS, Duarte ABG, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reprod Clim*, v.1, p.93-104, 2016a.
- Lima LF, Rocha RPM, Alves AMCV, Carvalho AA, Chaves RN, Lopes CAP, Bão SN, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR.** Comparison between the additive effects of diluted (rFSH) and diluted/dynamized (FSH 6 cH) recombinant follicle-stimulating hormone on the *in vitro* culture of ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Complement Ther Med*, v.25, p.39-44, 2016b.
- Luz VB, Araújo VR, Duarte ABG, Celestino JJH, Silva TFP, Magalhães-Padilha DM, Chaves RN, Brito IR, Almeida AP, Campello CC, Feltrin C, Bertolini M, Santos RR, Figueiredo JR.** Eight-Cell Parthenotes Originated From *In vitro* Grown Sheep Preantral Follicles. *Reprod Sci*, v.19, p.1219-1225, 2012.
- Luz VB, Araújo VR, Duarte ABG, Silva GM, Chaves RN, Brito IR, Serafim MKB, Campello CC, Feltrin CC, Bertolini M, Almeida AP, Santos RR, Figueiredo JR.** Kit ligand and insulin-like growth factor I affect



- the *in vitro* development of ovine preantral follicles. *Small Rumin Res*, v.115, p.99-102, 2013.
- Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IMT, Lopes CA, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR.** *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v.75, p.182-188, 2011.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JE Jr, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Bão SN, Lucci CM, Figueiredo JR.** Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v.15, p.173-182, 2007.
- O' Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v.68, p.1682-1686, 2003.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL.** The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, p.136, v.703-15, 2008.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan Z-J, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K.** Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, v.319, p.611-613, 2008.
- Roy SK, Treacy BJ.** Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-791, 1993.
- Sá NA, Araújo VR, Correia HH, Ferreira AC, Guerreiro DD, Sampaio AM, Escobar E, Santos FW, Moura AA, Lôbo CH, Ceccatto VM, Campello CC, Rodrigues AP, Leal-Cardoso JH, Figueiredo JR.** Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*, v.89, p.226-234, 2017.
- Saraiva MV, Rossetto R, Brito IR, Celestino JJ, Silva CM, Faustino LR, Almeida AP, Bruno JB, Magalhães DM, Matos MH, Campello CC, Figueiredo JR.** Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reprod Sci*, v.17, p.1135-43, 2010.
- Serafim MK, Araujo VR, Silva GM, Duarte ABG, Almeida AP, Chaves RN, Campello CC, Lopes CA, Figueiredo JR, Silva LD.** Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, v.74, p.749-755, 2010.
- Shaw JM, Cox SL, Trounson AO, Jenkin G.** Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol*, v.161, p.103-110, 2000.
- Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, Sturion L, Melo-Sterza FA, Seneda MM.** Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, v.76, p.1051-1057, 2011.
- Silva-Santos KC, Marinho LSR, Santos GMG, Machado FZ, Gonzalez SM, Lisboa LA, Seneda MM.** Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim Reprod*, v.10, p.180-186, 2013.
- Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*, v.23, p.1151-1158, 2008.
- Van Den Hurk R, Zhao H.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- Wallace WHB, Kelsey TW.** Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*, v.5, p.8772, 2010.
- Wu J, Emery BR, Carrel DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, p.375-381, 2001.
- Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau KY, Barrett SL, Zelinski MB, Stouffer RL.** Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Human Reprod*, v.26, p.1061-1072, 2011.
-