



Avanços, aplicações, limitações e perspectivas da tecnologia do ovário artificial de ruminantes

Advances, applications, limitations and prospects of the technology of artificial ovary in ruminant

José Ricardo de Figueiredo^{1,‡}, Laritza Ferreira de Lima¹, Deborah de Melo Magalhães-Padilha²

¹Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos pré-antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Potiguar/Laureate International Universities, Natal, RN, Brasil.

Resumo

A maioria dos oócitos imaturos nos ovários encontra-se armazenada nos folículos pré-antrais, sendo este a principal reserva ovariana. Entretanto, durante o desenvolvimento folicular uma pequena proporção (0,1%) destes folículos chega ao estágio pré-ovulatório sendo o restante eliminado por atresia. A tecnologia de cultivo folicular *in vitro*, denominada ovário artificial, representa uma excelente ferramenta para desvendar o controle da foliculogênese nos estágios iniciais de desenvolvimento, bem como poderá assegurar no futuro a utilização de um grande número de oócitos imaturos, previamente crescidos *in vitro*, em técnicas de reprodução assistida em humanos e em outras espécies, incluindo os ruminantes. Os melhores resultados da tecnologia do ovário artificial foram relatados em camundongos, com a produção de crias vivas a partir de folículos primordiais crescidos *in vitro*. Entretanto, em outras espécies, incluindo os ruminantes, os resultados têm sido restritos à produção de um pequeno e variável número de oócitos maduros e uma baixa taxa de produção de embriões após o cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados. A presente revisão discute as aplicações, critérios para avaliação de eficiência, estado atual, limitações e perspectivas da tecnologia do ovário artificial em ruminantes, com ênfase nas espécies bovina, caprina e ovina.

Palavras-chaves: folículos pré-antrais, cultivo *in vitro*, foliculogênese *in vitro*.

Abstract

Most immature oocytes in the ovaries are stored in the preantral follicles, which represent the main ovarian reserve. However, during follicular development, a small proportion (0.1%) of these follicles reaches the preovulatory stage, the rest being eliminated by atresia. The in vitro follicle culture technology, called artificial ovary, represents an excellent tool to understand the control of folliculogenesis in the early stages of development, as well as to ensure in the future the use of a large number of immature oocytes, previously grown in vitro, in assisted reproductive technologies in humans and other species, including ruminants. The best results from artificial ovary technology so far were reported in mice, with the production of live offspring from primordial follicles grown in vitro. However, in other species, including ruminants, the results have been limited to the production of a small and variable number of mature oocytes and a low rate of embryo production after in vitro culture of isolated secondary follicles. The present review discusses the applications, criteria for evaluating efficiency, current status, limitations and perspectives of artificial ovary technology in ruminants, with emphasis on bovine, caprine, and ovine species.

Keywords: *preantral follicle, in vitro culture, folliculogenesis in vitro.*

Introdução

Nas fêmeas ruminantes, o ovário possui, ao nascimento, milhares de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (FP), formando um pool de reserva folicular. Entretanto, a quase totalidade desses folículos se torna atresica durante o desenvolvimento, com apenas 0,1% atingindo a ovulação. Este processo de desenvolvimento folicular, denominado foliculogênese, é regulado por uma complexa interação entre fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. A foliculogênese pré-antral é ainda mais complexa, tendo em vista a dificuldade de se identificar substâncias envolvidas nesse processo, bem como suas interações (Figueiredo et al., 2018).

Assim, com o intuito de estudar e otimizar o desenvolvimento dos FP vem sendo desenvolvida a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA), conhecida também como ovário artificial. Um grande marco do ovário artificial foi a produção de crias nascidas vivas a partir do cultivo *in vitro* (CIV) de folículos primordiais em camundongos (O'Brien et al., 2003). Entretanto, em ruminantes domésticos, os resultados têm se limitado a formação de antro em bovinos (Gutierrez et al., 2000), bem como um baixo percentual de embriões produzidos após o cultivo *in vitro* de FP secundários em cabras, ovelhas e búfalas (Silva et al., 2016). Dessa forma, o presente artigo de revisão discute as aplicações, critérios para avaliação de eficiência, estado atual,

[‡]Correspondência: jrf.lamofopapapers@gmail.com

Recebido: 11 de dezembro de 2018

Aceito: 11 de março de 2019



limitações e perspectivas da tecnologia do ovário artificial em ruminantes domésticos, com ênfase nas espécies bovina, caprina e ovina.

Bases gerais da morfologia e população folicular e regulação da foliculogênese *in vivo*

A foliculogênese é o processo fisiológico de desenvolvimento folicular. Na fase pré-antral ela envolve as etapas de ativação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos (Figueiredo et al, 2018). Dos milhares de folículos presentes nos ovários, aproximadamente 90% são FPs. A foliculogênese pré-antral é caracterizada pela ativação dos folículos primordiais para primários e desenvolvimento destes para secundários e, em seguida, antrais. Apesar da grande população folicular, a grande maioria (99,9%) dos folículos é eliminada no processo de atresia (Aerts e Bols, 2010). O destino do folículo, atresia ou ovulação depende de um fino balanço entre fatores estimulatórios e inibitórios envolvidos na foliculogênese (Figueiredo et al, 2018).

Cultivo folicular *in vitro* (CFIV) ou ovário artificial: objetivos, aplicações e tipos de sistemas de cultivo

No CFIV, os folículos são resgatados antes que eles se tornem atresícos e cultivados até a sua completa maturação. O ovário artificial tem sido amplamente utilizado na pesquisa básica (elucidação da foliculogênese na fase pré-antral) bem como em testes toxicológicos reprodutivos. Além disso, futuramente, esta biotécnica poderá complementar outras biotécnicas reprodutivas (PIV e transferência nuclear), auxiliar no tratamento de infertilidade, na criação de bancos de gametas femininos (animais em vias de extinção ou geneticamente superiores) e preservação da fertilidade em indivíduos com câncer (Figueiredo et al, 2018).

A eficiência do cultivo *in vitro* pode ser avaliada por meio de diversos parâmetros, os quais são importantes para o entendimento da regulação da foliculogênese. Dentre eles destacamos a ativação de folículos primordiais, sobrevivência, crescimento folicular e oocitário, formação de antro, expressão de RNAm para fatores chaves da foliculogênese, produção hormonal, maturação oocitária nuclear e citoplasmática, produção embrionária e de crias saudáveis (Figueiredo et al, 2018).

Basicamente, os FPs podem ser cultivados de duas formas: inclusos no tecido ovariano (*in situ*) ou na forma isolada. O cultivo *in situ* pode ser realizado utilizando o ovário inteiro (murinos) ou inclusos em fragmentos de córtex ovariano. Já o cultivo de folículos isolados pode ser realizado diretamente na placa ou sobre uma matrix extracelular (MEC – sistema bidimensional - 2D) ou inclusos em MEC (sistema tridimensional - 3D). Em adição, pode ainda ser feito um cultivo em dois passos, no qual é realizado primeiramente o cultivo *in situ*, que permite a ativação e o desenvolvimento do folículo primordial até estágio secundário, para posteriormente ser isolado e cultivado até o estágio antral (Figueiredo et al., 2018).

Os melhores resultados utilizando a tecnologia do ovário artificial foram obtidos em camundongos, no qual foi possível desenvolver *in vitro* os folículos primordiais por meio do cultivo de dois passos, obter oócitos fertilizáveis, possibilitando o nascimento de crias vivas (O'Brien et al., 2003). Em ovinos (Arunakumari et al., 2010; Luz et al., 2012), bubalinos (Gupta et al., 2008) e caprinos (Saraiva et al., 2010; Magalhães, 2011) foi possível produzir oócitos maduros e posteriormente embriões após o cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados. No entanto, na espécie bovina, foi apenas relatado a produção de folículos antrais a partir de folículos primários (Sun e Li, 2013). Estes resultados, embora promissores, são muito baixos em relação a oócitos crescidos *in vivo*, sendo necessário mais estudos para aprimorar essa biotécnica.

Importância e principais resultados do Projeto Ovário Artificial

Visando desenvolver um sistema de cultivo eficiente, notadamente para FPs de caprinos, desde 2006 a equipe de pesquisa do LAMOFOPA-FAVET-UECE vem trabalhando no projeto denominado “Ovário Artificial”. Nas sessões seguintes serão apresentados e discutidos alguns resultados do referido projeto.

*Cultivo de folículos pré-antrais caprinos *in situ**

A CIV de FPs inclusos em tecido ovariano (*in situ*) é uma importante ferramenta para o estudo da foliculogênese inicial, principalmente a respeito da sobrevivência e ativação dos folículos primordiais. Na espécie caprina, fragmentos de tecido ovariano vêm sendo cultivados individualmente por 7 dias em α MEM (meio de base) suplementado com diferentes substâncias (Tabela 1). De fato, a adição das substâncias citadas na Tabela 1 individualmente ao meio de base melhorou de forma dependente a ativação, mantendo a sobrevivência de folículos primordiais caprinos bem como o crescimento folicular e oocitário (Figueiredo et al., 2011). Como pode ser observado vários fatores melhoram um mesmo parâmetro. A explicação para este achado deve-se ao fato de que independente do fator adicionado o que irá ocorrer ao final é a regulação da expressão gênica que por sua vez determinará a morte ou sobrevivência bem como quiescência ou crescimento folicular (Figueiredo et al, 2018).

Tabela 1. Fatores intra e extra-ovarianos com efeitos positivos na manutenção da sobrevivência, ativação e crescimento folicular de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* incluso em tecido ovariano.

| Parâmetros | Comparação com o Controle Cultivado (MEM+) |
|--------------------|---|
| Viabilidade | FSH, GDF-9, ANG II, VEGF, VIP, KL, BMP-15, EGF, P4, E2, GH, IGF-I, LH, LIF, S1P, NGF, FGF-10, INS, AA |
| Ativação | FSH, GDF-9, IAA, FGF-2, KL, BMP-15, EGF, E2, GH, IGF-I, LH, LIF, S1P, INS |
| Diâmetro Folicular | FSH, GDF-9, FGF-2, VEGF, VIP, KL, BMP-15, P4, E2, GH, IGF-I, LH, MEL, FGF-10, INS |
| Diâmetro oocitário | FSH, GDF-9, FGF-2, VEGF, VIP, BMP-15, P4, GH, IGF-I, MEL |

Hormônio foliculo estimulante (FSH), fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), angiotensina 2 (ANGII), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), Kit Ligand (KL), BMP15, fator de crescimento epidermal (EGF), progesterona (P4), estradiol (E2), hormônio do crescimento (GH), Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), hormônio luteinizante (LH), fator inibitório de leucemia (LIF), esfingosina-1-fosfato (S1P), fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10), insulina (INS), ácido ascórbico (AA), Ácido indolacético (IAA) e fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2).

Cultivo in vitro de folículos secundários isolados

O estudo da foliculogênese na fase pré-antral tardia em ruminantes vem sendo realizado utilizando folículos secundários isolados mecanicamente dos ovários por meio da técnica de microdissecção. Na qual os folículos são cultivados *in vitro* individualmente ou em grupo em microgotas contendo meio de cultivo por períodos que variam de 6 (Lima et al., 2017) a 42 dias (Pessoa et al., 2014).

CFIV: balanço da insulina com fatores intra e extraovarianos

A insulina na concentração de 10 µg/ml é a mais comumente utilizada no CIV de folículos pré-antrais em muitas espécies (Magalhães et al., 2011; Lima et al., 2017; Cunha et al., 2018). Entretanto, estudos têm mostrado que a concentração ideal de insulina no meio de cultivo depende da presença e concentração dos outros componentes adicionados ao meio. Em caprinos, o meio de cultivo para FP isolados que resultou em melhores taxas de retomada da meiose (RM) foi obtido após suplementação do meio de base (α MEM⁺) com concentrações crescentes de FSH recombinante bovino (FSHr sequencial), VEGF (100 ng/ml) e insulina (10 µg/ml – Araújo et al., 2011). Entretanto, Chaves et al. (2011) investigaram o efeito da adição de três concentrações de insulina (5 ou 10 ng/ml ou 10 µg/ml) na ausência ou presença de FSH sequencial. Nesse trabalho, a adição de insulina na concentração de 10 µg/ml (alta concentração) aumentou o diâmetro folicular, reduzindo significativamente a porcentagem de sobrevivência folicular e formação de antro. Entretanto, a redução da concentração de insulina em 1.000 vezes (10 ng/ml – baixa concentração) aumentou significativamente o percentual de RM em relação ao controle e a concentração de 10 µg/ml.

Diante de tal fato, surgiu a seguinte questão: seria possível substituir 10 µg/ml por 10 ng/ml de insulina no meio contendo VEGF sem afetar sua eficiência? Para responder tal pergunta, foi realizado um estudo utilizando um meio de base contendo VEGF. Comparou-se duas concentrações (alta ou baixa) de insulina isoladamente ou associadas ao FSH sequencial ou com concentração fixa FSH (Silva et al., 2017). Os melhores resultados para taxa RM foram obtidos usando o FSH fixo associada a 10 µg/ml insulina (Silva et al., 2017). Em outras palavras, quando o VEGF é parte do meio base, faz-se necessário reduzir a concentração de FSH e aumentar a concentração de insulina. Em suma, quando um novo fator é adicionado ao meio, é necessário balancear os demais.

Influência de componentes da MEC e interações foliculares na sobrevivência e desenvolvimento folicular

Em ruminantes, o uso de CFIV permitiu avaliar a importância da rigidez da MEC (sistema de cultivo 3D) no desenvolvimento de FPs caprinos *in vitro* (Brito et al., 2014). Neste estudo, foi demonstrado que a utilização do sistema de cultivo 3D com baixa concentração de alginato (0,25%) melhorou as taxas de crescimento e produção de esteroides de FPs caprinos, bem como estimulou a RM. O tipo de MEC, isto é, alginato, fibrina-alginato e hialuronato, também afeta o desenvolvimento folicular *in vitro*, sendo obtidas maiores taxas de produção de oócitos maduros e obtenção de partenotos após cultivo folicular na presença de fibrina-alginato por 30 dias (Brito et al., 2016). O cultivo 3D em grupo de FPs caprinos inclusos em alginato (0,25%) favoreceu o crescimento e a formação de antro, bem como assegurou RM quando comparado aos cultivados individualmente (Brito et al., 2016).



Requerimento folicular estágio-específico

Mudanças significativas no padrão de expressão gênica ocorrem na transição de folículo secundário tardio para os folículos terciários iniciais. Um estudo de microarranjo realizado por nossa equipe mostrou que 2.466 tiveram expressão diferenciada na transição de folículos secundários para terciários (Magalhães-Padilha et al., 2013). Essa diferença tem um grande impacto nas exigências foliculares durante o CIV. Cadenas et al. (2017) mostrou que a adição de GH melhorou o crescimento e a maturação oocitária no CIV de antrais iniciais caprinos, contudo não teve efeito sobre do desenvolvimento de FPs.

Algumas aplicações a curto prazo do ovário artificial de ruminantes

Avaliação do efeito do estresse térmico (ET)

Foi demonstrado, no cultivo *in situ* de FP bovino por 7 dias, que a ET (41°C por 12 h) induziu a ativação precoce de folículos primordiais com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Paes et al., 2016). Além disso, nesse estudo, os folículos secundários parecem ser menos sensíveis ao ET, mas existe alteração na secreção de esteroides e redução na maturação oocitária de CCOs crescidos *in vivo*.

Avaliação da provável influência da homeopatia

Outra aplicação prática do ovário artificial é o teste da provável eficácia de metodologias alternativas utilizadas em tratamentos de distúrbios reprodutivos, como a homeopatia. A homeopatia tem como base o tratamento com pequenas quantidades de drogas extremamente diluídas e dinamizadas (agitadas). Assim, o uso de modelos *in vitro*, como a tecnologia do ovário artificial por meio CIV apresenta-se como uma ótima ferramenta para dirimir a controvérsia a respeito da eficiência da homeopatia.

Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a investigar a influência de medicamentos diluídos/dinamizados na foliologênese *in vitro*. Lima et al. (2013) observou que o FSH diluídos/dinamizados (FSH 6 cH) adicionado diariamente mostrou resultado superior ao seu veículo (álcool) na sobrevivência e ativação folicular precoce, bem como mantém a viabilidade e ultraestrutura do FP incluso em tecido ovariano ovino em relação ao controle fresco. Durante a comparação entre o efeito do FSH 6 cH com o recombinante, Lima et al. (2016) verificaram que em todos os parâmetros (sobrevivência, ativação e crescimento folicular e oocitário), essas duas apresentações foram semelhantes. Nos cultivos de folículos secundários isolados de ovinos, verificou-se que o efeito do FSH 6 cH sobre o desenvolvimento folicular e a produção hormonal foi devido, em parte, ao veículo (Lima et al., 2017). No entanto, em suínos, FSH 6 cH aumentou a produção progesterona, mas reduziu o estradiol em relação ao meio de base (Lima et al., 2017). Esses resultados demonstraram que a homeopatia pode atuar de forma diferente do veículo sobre o desenvolvimento folicular, sendo esse efeito influenciado pela espécie, duração do cultivo e composição do meio de cultivo.

Considerações finais

O controle da sobrevivência, ativação e desenvolvimento de FPs de ruminantes *in vitro* é extremamente complexo e envolve múltiplas interações entre fatores extra e intra-ovarianos e pode ser influenciado pelo tipo de meio de base, tipo de sistema de cultivo (2D vs 3D), componentes da MEC, categorias foliculares (pré-antral vs folículos precoces) e etc. Além disso, esses fatores não agem de forma isolada, mas interagem entre si, tornando o desenvolvimento de protocolos de CFIV um grande desafio. Resultados encorajadores têm sido relatados na literatura, incluindo taxas satisfatórias de sobrevivência folicular, ativação, formação de antro e produção de oócitos meioticamente competentes, especialmente nas espécies de caprina e ovina. No entanto, a produção de embriões a partir de oócitos cultivados *in vitro* ainda é baixa. Portanto, adequações no sistema de cultivo folicular *in vitro* são necessárias para melhorar a qualidade do oócito para posterior produção de descendentes viáveis. Este fato permitirá o uso futuro de um grande número de oócitos imaturos incluso em FPs em tecnologias de reprodução assistida em humanos e outras espécies de mamíferos.

Referências

- Aerts JMJ, Bols PEJ. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and preantral follicle development. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.171-179, 2010.
- Araújo VR, Silva GM, Duarte ABG, Magalhães DM, Almeida AP, Gonçalves RFB, Bruno JB, Silva TFP, Campello CC, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Vascular endothelial growth factor-A165 (VEGF-A165) stimulates the *in vitro* development and oocyte competence of goat preantral follicles. *Cell Tissue Res*, v.346, p.273-281, 2011.



- 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, Rosseto 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 Dev*, v.81, p.636-645, 2014.
- Brito IR, Silva GM, Sales AD, Lobo CH, Rodrigues GQ, Sousa RF, Moura AAA, Calderón CEM, Bertolini M, Campello CC, Smitz J, Figueiredo JR.** Fibrin-alginate hydrogel supports steroidogenesis, in vitro maturation of oocytes and parthenotes production from caprine preantral follicles cultured in group. *Reprod Domest Anim*, v.51, p.997-1009, 2016.
- Cadenas J, Leiva-Revilla J, Vieira LA, Apolloni LB, Aguiar FLN, Alves BG, Lobo CH, Rodrigues APR, Apgar GA, Smitz J, Figueiredo JR, Maside C.** Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. *Theriogenology*, v.87, p.321-332, 2017.
- Chaves RN, Alves AMCV, Faustino LR, Oliveira KPL, Campello CC, Lopes CAP, Bão SN, Figueiredo JR.** How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell Tissue Res*, v.346, p.451-456, 2011.
- Cunha EV, Melo LRF, Souza GB, Araújo VR, Vasconcelos GL, Weiny A, Silva J RV.** Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and development of bovine secondary follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, v.110, p.44-51, 2018.
- Eppig JJ, Schroeder AC.** Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, v.41, p.268-276, 1989.
- Figueiredo JR, Lima LF, Silva JR, Santos RR.** Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Anim Reprod*, v.15, Supl.1, p.648-659, 2018.
- Figueiredo JR, Rodrigues AP, Silva JR, Santos RR.** Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. *Reprod Fertil Dev*, v.23, p.40-47, 2011.
- Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, n.1, 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.
- Lima LF, Rocha RMP, Alves AMCV, Carvalho AA, Chaves RN, Lopes CAP, Bão SN, Campello CC, Rodrigues APR, 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, 2016.
- Lima LF, Rocha RMP, Alves AMCV, Saraiva MVA, Araújo VR, Lima IMT, Lopes CAP, Bão SN, Campello CC, Rodrigues APR, 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, Rubessa M, Rocha RMP, Winters R, Milner DJ, Campello CC, Figueiredo JR, Wheeler MB.** High diluted and dynamised follicle stimulating hormone modulates the steroid production in isolated porcine preantral follicles cultured in vitro. *Homeopathy*, p.87-92, 2017.
- 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*, v.80, n.4, p.406-418, 2017.
- Luz VB, Araujo VR, Duarte ABG, Celestino JJH, Silva TFP, Magalhaes-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.
- Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IMT, Lopes CAP, Campello CC, Rodrigues APR, 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.
- Magalhães-Padilha DM, Geisler-Lee J, Wischral A, Gastal MO, Fonseca GR, Eloy YR, Geisler M, Figueiredo JR, Gastal EL.** Gene Expression During Early Folliculogenesis in Goats Using Microarray Analysis. *Biol Reprod*, v.89, p.1-12, 2013.
- O'brien MJA.** Revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod*, v.68, n.5, p.1682-1686, 2003.
- Paes VM, Vieira LA, Correia HHV, Sa NAR, Moura AAA, Sales AD, Rodrigues APR, Magalhães-Padilha DM, Santos FW, Apgar GA, Campello CC, Camargo LSA, Figueiredo JR.** Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus- oocyte complex. *Theriogenology*, v.86, p.994-1003, 2016.
- Pessoa A, Rocha R, Brito IR, Silva GM, Chaves RN, Magalhães-Padilha D, Campello CC, Rodrigues APR, Nunes-Pinheiro DC, Figueiredo, JR.** Effect of morphological integrity, period, and type of culture system on the in vitro development of isolated caprine preantral follicles. *Theriogenology*, v.82, n.2, p.312-317, 2014.



Saraiva MVA, Rossetto R, Brito IR, Celestino JJH, Silva CMG, Faustino LR, Almeida AP, Bruno JB, Magalhães DM, Matos MHT, Campello CC, Figueiredo JR. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reprod Sci*, v.17, n.12, p.1135-1143, 2010.

Silva GM, Brito IR, Sales AD, Aguiar FLN, Duarte ABG, Araújo VR, Vieira LA, Magalhães-Padilha DM, Lima LF, Alves BG, Silveira LBR, Lo Turco EG, Rodrigues APR, Campello CC, Wheeler MB, Figueiredo JR. In vitro growth and maturation of isolated caprine preantral follicles: Influence of insulin and FSH concentration, culture dish, coculture, and oocyte size on meiotic resumption. *Theriogenology*, v.90, p.32-41, 2017.

Silva JR, van den Hurk R, Figueiredo JR. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domest Anim Endocrinol*, v.55, p.123-135, 2016.

Sun J, Li X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. *Reprod Biol*, v.13, n.3, p.221-228, 2013.
