



## Potencial do cultivo *in vitro* e do xenotransplante na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura

*Potential of in vitro culture and xenotransplantation on surviving and development of ovarian preantral follicles in ruminant females at risk of death: a review*

M.B. Bezerra<sup>1,2,6</sup>, M.R. Pacheco<sup>3</sup>, G.Z. Mingoti<sup>4</sup>, M.F. Macedo<sup>1</sup>, W.R.R. Vicente<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Animais, Ufersa, Mossoró, RN, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento Produção e Saúde Animal, FOA/UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>6</sup>Correspondência: mbezerra@ufersa.edu.br

### Resumo

A presente revisão aborda os principais avanços do cultivo *in vitro* e do xenotransplante de folículos ovarianos pré-antrais e como estas técnicas poderão contribuir, de maneira isolada ou conjunta, para a produção *in vitro* de embriões a partir de matrizes de estimado valor genético ou zootécnico e que estejam em situações de morte iminente ou imediatamente *post-mortem*. As informações apresentadas nesta revisão permitem concluir que ambas as biotécnicas estão em constante desenvolvimento e que, num futuro próximo, poderão fornecer, isolada ou conjuntamente, folículos antrais aptos à rotina de produção *in vitro* de embriões de ruminantes.

**Palavras-chave:** MOIFOPA, ovário, ruminantes, xenotransplantes.

### Abstract

*This review approaches the main contributions on advances and how does in vitro culture and xenotransplantation of preantral follicles can contribute in each one or both of these techniques, for in vitro production of embryos from ruminants of high genetic or zootechnic merits that are in imminent death or in the immediately post-mortem period. The informations presented in this review allows the conclusion that both biotechniques are in progress and, in a near future, they could provide, separately or in conjunction, antral follicles suitable for routine in vitro production of embryos from ruminants.*

**Keywords:** MOEPF, ovary, ruminant, xenotransplantation.

### Introdução

A necessidade de aproveitamento dos oócitos existentes num ovário que esteja condenado ao descarte devido à sua retirada ou à morte da doadora estimulou o desenvolvimento de diferentes técnicas para minimizar a perda de folículos ovarianos existentes em seu interior, destacando-se a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) e o xenotransplante ovariano.

Estudos recentes evidenciam o potencial do aproveitamento de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) de ruminantes para a produção *in vitro*, seja por cultivo *in vitro* (Huanmin e Yong, 2000; Gupta et al., 2008; Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011) ou por xenotransplante (Senbon et al., 2003, 2004a, b, 2005; Aerts et al., 2010; Bezerra, 2010). Considerando-se que os folículos majoritários no ovário são os mais precoces (FOPA), e estes são, paradoxalmente, os menos aproveitados em casos de urgência pelo descarte do ovário após a punção folicular, a presente revisão discute os principais avanços sobre a manutenção e o crescimento de oócitos inclusos em FOPA e de que forma o cultivo *in vitro* e o xenotransplante destas estruturas podem contribuir para a continuidade do crescimento folicular e a produção de oócitos viáveis à fertilização a partir de ovários coletados de animais com morte iminente ou *post-mortem*.

### Formação dos folículos ovarianos em ruminantes e sua importância nas biotécnicas reprodutivas

A foliculogênese pode ser compreendida como o período entre a formação dos primeiros folículos primordiais até a atresia ou até o estágio de folículo pré-ovulatório seguido de ovulação (Driancourt et al., 2001). Deste modo, o folículo ovariano torna-se a estrutura responsável pelo crescimento, manutenção e preparo para posterior maturação do oócito nele contido, sendo classificado pela literatura em dois grupos principais: os



folículos pré-antrais (FOPA) e os antrais. Os primeiros diferenciam-se dos demais por serem destituídos de antro, uma cavidade repleta de fluido, que, por sua vez, nutre e regula o crescimento oocitário, e são classificados em folículos primordiais, primários e secundários. Esta distinção advém da morfologia (número e formato das células foliculares), bem como do seu tamanho. Eles constituem a principal reserva de gametas das fêmeas e correspondem a aproximadamente 90-95% da população dos folículos existentes no interior dos ovários, embora apenas 0,1% destes atinja a ovulação evitando a degeneração ao longo do crescimento (Hirshfield, 1988).

Informações sobre a população folicular existente no ovário são importantes na avaliação da eficiência de técnicas relacionadas aos folículos ovarianos, para o monitoramento da foliculogênese, fornecendo informações básicas sobre a fisiologia do animal em função da idade e da influência nutricional, por exemplo. Este número de folículos ovarianos pré-antrais e antrais de ruminantes foi estimado inicialmente a partir de procedimentos estereológicos em lâminas histológicas. Esses estudos sobre a população folicular foram realizados em bovinos (Erickson, 1966; Russe, 1983), ovinos (Russe, 1983) e caprinos (Bezerra et al., 1998), com os dados referentes ao surgimento dos diferentes tipos de folículos ainda na vida fetal apresentados na Tab. 1. É importante salientar que estas informações orientam a escolha da melhor idade gestacional para a coleta de ovários e melhor direcionamento na condução de experimentos em que são desejados tipos específicos de folículos ovarianos, seja para o cultivo *in vitro* de FOPA (Figueiredo et al., 1994) ou ainda para estudos de produção *in vitro* de embriões a partir de fetos (Chohan e Hunter, 2004).

Tabela 1. Formação dos diferentes folículos pré-antrais e antrais iniciais em ruminantes domésticos em função da idade gestacional em dias.

Tipo de folículo ovariano	Espécie (referência)		
	Bovinos (Russe, 1983)	Ovinos (Russe, 1983)	Caprinos (Bezerra et al., 1998)
Folículos primordiais	130	66	62
Folículos primários	>140	>75	>73
Folículos secundários	>210	>140	>73
Folículos terciários (com antro)	> 230	> 140	> 102

#### Estudos *in vitro* da foliculogênese inicial

Considerando-se que métodos histológicos são limitados, por avaliarem ovários que se tornam inutilizados para a finalidade reprodutiva em decorrência dos fixadores utilizados na histologia, a MOIFOPA surgiu como alternativa de estudo sobre a foliculogênese e a manutenção extracorpórea dos folículos ovarianos. Assim, foram desenvolvidas técnicas para estudo e cultivo de FOPA com estroma circunjacente, ou totalmente isolados. O desconhecimento das necessidades fisiológicas inerentes às etapas iniciais do desenvolvimento folicular, sobretudo para folículos isolados, estimulou o desenvolvimento de protocolos de cultivo folicular, fornecendo novas perspectivas a partir dos primeiros resultados com isolamento e cultivo *in vitro* de FOPA em bovinos (Hulshof et al., 1992; Figueiredo et al., 1993, 1994, 1995), além de trabalhos que resultaram em informações úteis relacionados aos melhores protocolos de conservação do ovário no momento da sua coleta até o desenvolvimento de um método para a obtenção de oócitos viáveis com vistas à geração de um novo descendente (Andrade et al., 2005; Costa et al., 2005).

O isolamento de FOPA do estroma ovariano é realizado quando se faz necessário o cultivo destas estruturas em função do estágio de crescimento específico, quando o estudo visa conhecer a necessidade dos FOPA sem influência de fatores ou demais moléculas produzidas pelo estroma circunvizinho ou com o intuito de verificar o papel de meios quimicamente definidos no crescimento de folículos primordiais, primários ou secundários. Outra aplicação do isolamento objetiva a conservação e o armazenamento dos FOPA com a finalidade de suprir bancos de germoplasma (Santos et al., 2007), os quais podem ser disponibilizados em momento apropriado para as diferentes situações de cultivo ou, biologia molecular, além de servirem como doadores de núcleo para clonagem ou de cromossomos para transgênese (Figueiredo et al., 2008).

O número de folículos primordiais obtidos por isolamento para o cultivo *in vitro* é considerável, entretanto o cultivo desse tipo folicular isolado apresenta limitações em muitas espécies, com resultados variáveis devido à necessidade de combinação de fatores de crescimento e hormônios que variam conforme o avanço dos estádios foliculares (Fortune, 2003). A busca por informações sobre o cultivo com meios quimicamente definidos aumenta, e as razões para este tipo de cultivo são práticas, haja vista que ele poderia ser repetido em diferentes tempos e laboratórios, além da isenção de atividades biológicas de enzimas e fatores de crescimento desconhecidos (Summers e Biggers, 2003). Apesar desta necessidade, os métodos de cultivo de FOPA com maior eficiência utilizam fontes de macromoléculas semidefinidas, como albumina sérica bovina (Gutierrez et al., 2000; McCaffery et al., 2000; Itoh et al., 2002; Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011), e indefinidas, como soro fetal bovino (Huanmin e Yong, 2000; Cecconi et al., 2004) ou soro de boi (Gupta et al., 2008).



Como alternativa à obtenção de FOPA crescidos em cultivo após isolamento, a utilização destes, ainda inclusos no estroma de origem (*in situ*), apresentou resultados satisfatórios quanto ao crescimento folicular e à formação de antro, podendo fornecer suporte por longos períodos com manutenção da organização celular e histoarquitetura geral dos folículos (Gutierrez et al., 2000). Acrescente-se ainda o fato de o cultivo *in vitro* de FOPA a partir de fetos poder apresentar um melhor rendimento, pois seus ovários possuem um grande número destas estruturas, com maior proporção de parênquima do que aquela observada nas fêmeas adultas (Fortune, 2003).

Independentemente de os FOPA serem cultivados isolados ou *in situ*, o seu crescimento pode ser dividido em três etapas: a primeira diz respeito à ativação dos folículos primordiais a primários; a segunda, do crescimento de folículos primários a secundários; e a última, de folículos secundários a estádios periantrais (Fortune, 2003). A ativação folicular de folículos pré-antrais *in vitro* foi inicialmente estudada em ruminantes com a espécie bovina, em meados da década de 90 (Hulshof et al., 1995). Já o crescimento folicular de folículos primários para secundários foi estudado em caprinos por Huanmin e Yong (2000), e as publicações mais divulgadas sobre crescimento folicular em ruminantes concernem principalmente à terceira etapa. Em bovinos, os estudos considerados de maior relevância para o cultivo *in vitro* de FOPA resultaram no crescimento destes a folículos antrais. Em caprinos (Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011) e bubalinos (Gupta et al., 2008), embriões foram obtidos a partir de FOPA com dimensões compatíveis às de folículos secundários mensurados em outros estudos (Bezerra et al., 1998; Mondadori et al., 2007).

Embora possam ocorrer divergências quanto aos critérios de classificação folicular em função da conveniência do estudo em questão, o critério de diâmetro é necessário para a mensuração do crescimento. Estudos com cultivo *in vitro* de FOPA bovinos utilizaram folículos com dimensões entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  (McCaffery et al., 2000) e acima de 163 $\mu\text{m}$  (Gutierrez et al., 2000) ou 145 $\mu\text{m}$  (Itoh et al., 2002). Em caprinos, o crescimento *in vitro* foi também observado a partir de folículos com mais de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro a antrais (Huanmin e Yong, 2000; Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011). Em ovinos, o crescimento de FOPA medindo originalmente 170 $\mu\text{m}$  resultou em folículos antrais (Cecconi et al., 2004); em bubalinos, embriões foram obtidos a partir do cultivo de FOPA com diâmetros entre 265 a 295  $\mu\text{m}$ , cocultivados com células do *cumulus* (Gupta et al., 2008). Em todas as espécies citadas, os diâmetros foliculares utilizados para o cultivo são compatíveis com os de folículos secundários (Hulshof et al., 1992; Bezerra et al., 1998; Mondadori et al., 2007).

### Estudo *in vivo* da foliculogênese por transplante ovariano

Os transplantes ovarianos são classificados, de acordo com a espécie receptora, como: auto (transplante no mesmo indivíduo), iso (transplante em indivíduos geneticamente idênticos), alo (transplante para outro indivíduo da mesma espécie) ou xenotransplante (transplante entre espécies diferentes); e, segundo suas localizações, são classificados em ortotópico ou heterotópico, sendo próximos ou distantes da localização anatômica original, respectivamente (Krohn, 1977).

Os transplantes ovarianos são utilizados desde a década de 60 em murinos (Krohn, 1977; Aubard et al., 1999) e a de 90 em ovinos (Gosden et al., 1994; Campbell et al., 2000). Nesta última espécie, foi primeiramente relatada com sucesso uma gestação tanto após o autotransplante a fresco quanto com tecido criopreservado. Ainda em ovinos, esta técnica produziu uma sincronização dos folículos primordiais, simultaneamente à retomada da ciclicidade ovariana após um período que variou de três a seis meses (Hunter et al., 2004).

A utilização de ovários criopreservados foi realizada com autotransplantes em caprinos (Santos, 2007) e ovinos (Gosden et al., 1994; Salle et al., 2002). Em cabras, foram observados remodelagem ovariana e comportamento de estro em torno de 71 dias após o autotransplante, com fragmentos submetidos ou não à congelamento. Em ovelhas, nascimentos foram relatados (Gosden et al., 1994; Salle et al., 2002) ao passo que, em bovinos, estudos com autotransplante não são conhecidos, provavelmente devido ao alto custo de manutenção de fêmeas experimentais nessa espécie e à possibilidade de transplantes em animais de laboratório com menor custo de manutenção.

Com a utilização de linhagens de camundongos e ratos *knockout* para genes responsáveis pela resposta imune-humoral, surgiu mais uma possibilidade de cultivo folicular, fazendo com que o xenotransplante viesse a se tornar um dos caminhos possíveis para a maturação oocitária e a obtenção de oócitos de tamanho apropriado para a PIV (Aubard, 2003). Com isso, o xenotransplante se tornou uma opção a mais para a manutenção da fertilidade de fêmeas com alto valor zootécnico após uma circunstância de infertilidade adquirida ou de morte, podendo ser aplicado também no aproveitamento de germoplasma em animais silvestres e em raças de animais domésticos em vias de extinção. Os principais resultados apresentados em animais silvestres com esta técnica foram em saguis (Candy et al., 1995), elefantas (Gunasena et al., 1998) e marsupiais (Wolvekamp et al., 2001), com crescimento de FOPA até o estágio antral. Nascimentos por xenotransplante foram obtidos a partir de ovários de camundongos transplantados em ratas (Snow et al., 2002).

Em estudos com bovinos, Senbon et al. (2003, 2004a, b) observaram o crescimento de folículos secundários oriundos de vacas até a fase antral quando transplantados em camundongas, tendo os oócitos apresentado dimensão suficiente para serem submetidos à maturação *in vitro* (MIV) e alcançando a metáfase da segunda divisão meiótica. Posteriormente, esta mesma equipe realizou a fertilização *in vitro* e obteve embriões

no estágio de cinco a oito células em 2% dos oócitos fertilizados, demonstrando a necessidade de outros estudos acerca da competência do oócito no desenvolvimento embrionário (Senbon et al., 2005). Recentemente, estudos realizados a partir do xenotransplante de ovários fetais demonstraram ativação massiva em torno de 14 dias após a introdução de folículos primordiais isolados sob a cápsula renal de camundongos imunodeficientes (Aerts et al., 2010). Paralelamente, estudo conduzido no Brasil também com ovários fetais bovinos demonstrou a ativação de folículos primordiais, com crescimento espontâneo de FOPA e surgimento de folículos antrais a partir de 30 dias de transplante com oócitos de tamanho apropriado à MIV (Bezerra, 2010).

Como limitações, o xenotransplante necessita de receptores imunossuprimidos, ambiente adequado para sua manutenção, acompanhamento permanente dos animais transplantados, instrumental cirúrgico para microcirurgia e equipe especializada para o procedimento cirúrgico. A Fig. 1 ilustra a técnica de xenotransplante de tecido ovariano de feto bovino para a região subcapsular do rim de camundongos da linhagem C57Bl/SCID.

Os principais obstáculos relatados para a restauração da fertilidade a partir de transplante de córtex ovariano criopreservado são as adesões e o risco de isquemia até que ocorra a neovascularização (Liu et al., 2002) e a retomada da função. No que concerne à responsividade dos tecidos transplantados aos hormônios endógenos, produzidos pelo animal receptor e sobre como os hormônios exógenos atuam em ruminantes, mais informações são necessárias. Sabe-se que folículos antrais foram obtidos sem estimulação hormonal quando ovários de saguis (Candy et al., 1995), elefantas (Gunaseena et al., 1988) e uma espécie de marsupial (Wolvekamp et al., 2001) foram transplantados em murinos. Já no caso de ovários humanos xenotransplantados, a utilização de hormônios exógenos como o FSH e o hCG estimulou o surgimento de folículos antrais (Oktay et al., 1998; Weissman et al., 1999). Partindo-se do princípio de que os andrógenos ou demais gonadotrofinas endógenas de machos poderiam auxiliar no crescimento folicular, camundongos machos foram utilizados como receptores, com crescimento de folículos secundários a antrais, mas sendo estes menos viáveis quando comparados aos já normalmente encontrados em fêmeas (Senbon et al., 2004a; Hernandez-Fonseca et al., 2005). O eCG foi utilizado em xenotransplantes de bovinos, resultando num aumento no crescimento folicular comparado aos animais não submetidos tratados hormonalmente, enquanto o crescimento oocitário não demonstrou diferenças (Senbon et al., 2005). Ao se comparar o efeito de dois tratamentos com hormônios exógenos, os transplantes oriundos de fetos promoveram crescimento folicular semelhante em tratamentos com os hormônios r-hFSH e eCG (Bezerra, 2010).

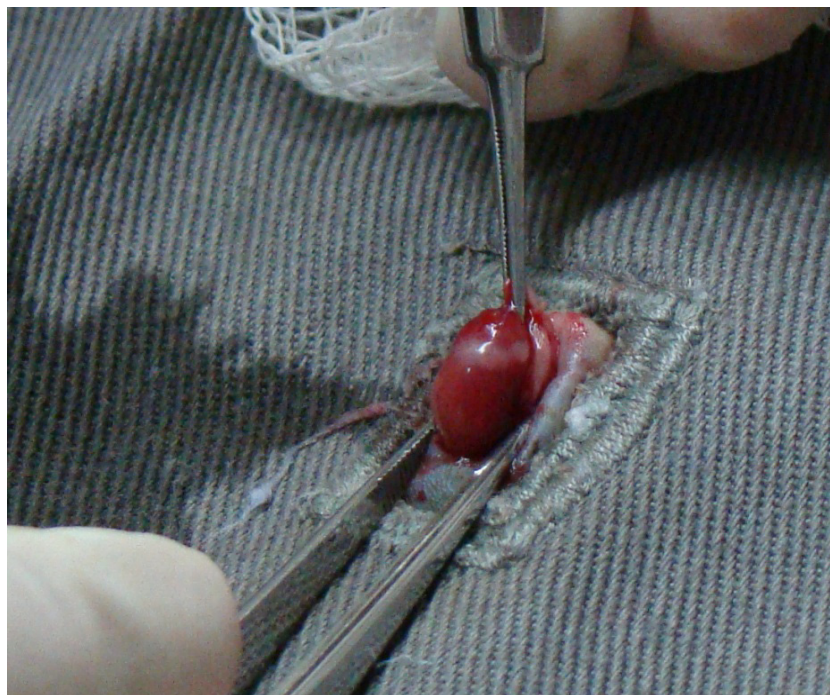


Figura 1. Tecido ovariano de feto bovino sob a cápsula renal de camundongos imunossuprimidos de linhagem C57Bl/SCID após 30 dias do xenotransplante (Foto dos autores).

Quanto à aplicabilidade dos transplantes em ruminantes domésticos, o autotransplante ovariano justificar-se-ia em casos de infertilidade adquirida em fêmeas de interesse comercial elevado ou zootécnico e como suporte aos estudos médicos (Gosden et al., 1994). Uma vez que os alotransplantes necessitam de compatibilidade entre doadoras e receptoras ou que estas sejam submetidas a tratamentos imunossupressivos, esta técnica não apresenta uma aplicação prática em bovinos. Porém, o transplante entre bovinos poderia ser

justificado em casos de morte inesperada ou para melhor aproveitamento dos ovários pela técnica de isotransplante entre clones de interesse comercial, farmacêutico ou científico, reduzindo, assim, o risco de rejeição. Desse modo, o xenotransplante apresenta-se como uma possibilidade mais concreta de aproveitamento e manutenção do ovário dos ruminantes desde que seja realizado em receptores imunossuprimidos. Neste caso, as linhagens de camundongos SCID (Senbon et al., 2003) ou ratos NUDE (Wolvekamp et al., 2001) podem se comportar como receptores para outros estudos a serem realizados não apenas em ruminantes mas também em humanos, como sugere a revisão de literatura publicada por Bols et al. (2010), visto que, em grandes mamíferos domésticos e em humanos, os melhores resultados com xenotransplante viabilizaram a FIV, porém sem a produção de embriões viáveis até o momento.

### Punção seguida de maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* (MIV) é a técnica que, associada com a fertilização *in vitro* (FIV), compõe as etapas de produção *in vitro* (PIV). Inicia-se normalmente com a punção dos foliculos antrais macroscópicos medindo de 2 a 6 mm de diâmetro (Ward et al., 2000). Uma vez que o cultivo *in vitro* de FOPA e o xenotransplante discutidos anteriormente venham a produzir um número maior de foliculos viáveis, uma conexão entre essas técnicas e a PIV pode ser estabelecida, conforme pode ser observado na Fig. 2.

Ademais, a espécie ruminante em que a PIV é mais bem estabelecida e difundida é a bovina, sendo a primeira cria obtida na década de 80 (Brackett et al., 1982). É em função dessa espécie que existe o maior número de laboratórios com pessoal treinado para a obtenção de oócitos e produção de embriões. Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, a China, o Brasil e a Coreia estão entre os países que mais transferem embriões provenientes da PIV, responsáveis por aproximadamente 96% do total de embriões produzidos e transferidos no mundo, sendo a maioria deles transferidos a fresco (Thibier, 2006).

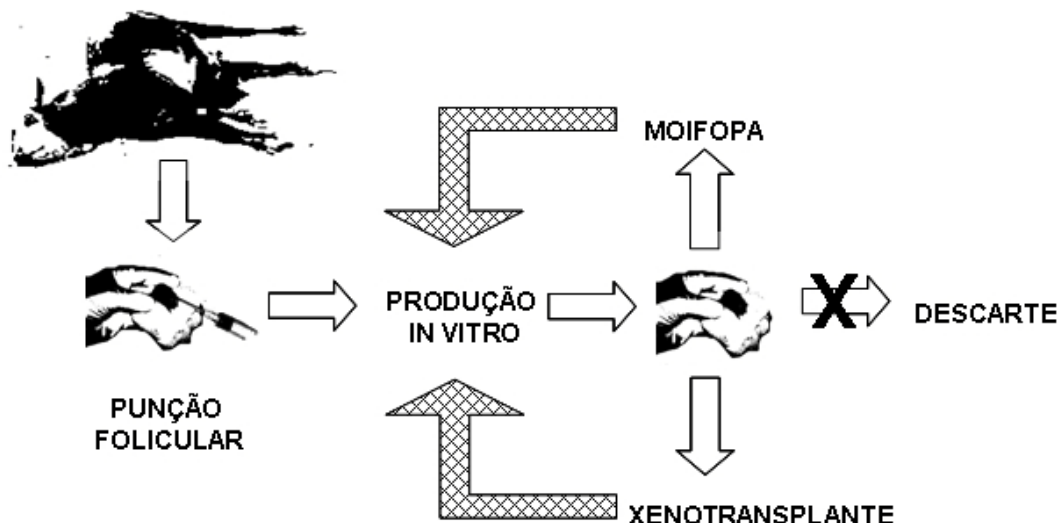


Figura 2. Destinos possíveis de ovários coletados emergencialmente antes ou logo após a morte de doadoras; As setas hachuradas representam alternativas em desenvolvimento.

### Considerações finais

A MOIFOPA tem sido normalmente associada ao cultivo *in vitro* de foliculos ovarianos pré-antrais. Entretanto, os resultados apresentados já sugerem que combinações entre o cultivo *in vitro* e o xenotransplante podem melhorar a eficiência da técnica, como, por exemplo, a utilização de foliculos primordiais ativados *in vivo* e a recuperação de secundários a partir destes transplantes para continuar seu desenvolvimento a antrais *in vitro* ou vice-versa. Os procedimentos de MOIFOPA e xenotransplante, mesmo necessitando de mais estudos, estão em constante avanço e despertando o interesse científico de vários grupos de pesquisadores em todo o mundo. Essas técnicas também servem como opção para a manutenção da atividade ovariana extracorpórea mesmo após a morte acidental ou iminente. Dessa forma, nas condições anteriormente descritas, os ovários coletados e cultivados por esses métodos serviriam adequadamente para a produção de embriões *in vitro* em laboratórios próximos e habilitados para este procedimento, evitando-se o descarte de centenas de oócitos.

### Agradecimentos

Apoio: CNPq - bolsa de doutorado (processo n. 141672/2006-4) e FAPESP – auxílio à pesquisa



(processo n. 07/04507-1).

### Referências bibliográficas

- Aerts JMJ, Martinez-Madrid B, Leroy JLMR, Aelst SV, Bols PEJ.** Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. *Fertil Steril*, v.94, p.708-714, 2010.
- Andrade ER, Seneda M, Alfieri A, Oliveira J, Bracarense A, Figueiredo JR, Tonioli R.** Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.64, p.1104-1113, 2005.
- Aubard Y.** Ovarian tissue xenografting *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.108, p.14-18, 2003.
- Aubard Y, Piver P, Cognié Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA.** Orthotopic and heterotopic autografts of frozen thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod*, v.14, p.2149-2154, 1999.
- Bezerra MB.** *Foliculos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo in vitro e xenotransplante.* 2010. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2010.
- Bezerra MB, Rondina D, Lima AKF, Oliveira LC, Cecchi R, Lucci CM, Giorgetti A, Figueiredo JR.** Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. *Ciênc Anim*, v.8, p.47-56, 1998.
- Bols PEJ, Aerts, JMJ, Langbeen, A, Goovaerts, IGF, Leroy, JLMR.** Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. *Theriogenology*, v.73, p.740-747, 2010.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA.** Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, v.27, p.147-158, 1982.
- Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT.** Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.131-139, 2000.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham, DG.** Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after xenografting. *Hum Reprod*, v.10, p.2334-2338, 1995.
- Cecconi S, Capacchietti G, Russo V, Berardinelli P, Mattioli M, Barboni B.** *In vitro* growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biol Reprod*, v.70, p.12-17, 2004.
- Chohan KR, Hunter AG.** *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.373-380, 2004.
- Costa, SHF, Andrade ER, Silva JRV, Rodrigues APR, Amorim CA, Lôbo RNB, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. *J Small Rum Res*, v.58, p.189-193, 2005.
- Driancourt MA, Gougeon A, Monniaux D, Royère D, Thibault C.** Folliculogênese et ovulation. In: Thibault C, Lévassieur MC. *La reproduction chez les mammifères et l'homme.* 2.ed. Paris: Ellipses, 2001. p.316-347.
- Erickson BH.** Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, v.25, p.800-805, 1966.
- Figueiredo JR, Hulshof SC, Thiry M, van den Hurk R, Bevers MM, Nussgens B, Beckers JF.** Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. *Theriogenology*, v.43, p.845-858, 1995.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, van den Hurk R, Ectors FJ.** Development of a new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, v.40, p.789-799, 1993.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, van den Hurk R, Nussgens B, Bevers MM, Ectors FJ, Beckers JF.** Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v.41, p.1333-1346, 1994.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de óocitos incluídos em foliculos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas, VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Roca; 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, 2003.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R.** Restoration of fertility to oophorectomised sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod*, v.9, p.597-603, 1994.
- Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES.** Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.265-75, 1998.
- 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, 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.
- Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Miller DP, Winingar JD, Massey JB, Brackett, BG.** Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined





- immunodeficient mice. *Fertil Steril*, v.83, p.1180-1187, 2005.
- Hirshfield AN.** Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod*, v.38, p.1181-1188, 1988.
- Huanmin Z, Yong Z.** In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, van den Donk HA, van den Hurk R.** Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.44, p.217-226, 1995.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, van den Hurk R.** Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. In: International Congress of Animal Reproduction, 12, 1992. The Hague: The Hague: ICAR, 1992. v.7, p.336-338.
- Hunter MG, Hudson N, Mitchell M, Walker RM, Webb R.** Resumption of follicle growth in gilts after ovarian autografting. *Anim Reprod Sci*, v.80, p.317-328, 2004.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H.** Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod*, v.67, p.1099-1105, 2002.
- Krohn PL.** Transplantation of the ovary. In: Zuckerman S, Weir BJ. (Ed.). *The ovary*. New York: Academic Press, 1977. v.2, p.101-128.
- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broecke R, Dhont M.** Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod* v.17, p.605-611, 2002.
- 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.
- McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE.** Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod*, v.63, p.267-273, 2000.
- Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, Bão SN.** Ultrastructural and morphologic characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.97, p.323-333, 2007.
- Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG.** Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, v.13, p.1133-1138, 1998.
- Russe I.** Oogenesis in cattle and sheep. *Biblioth Anat*, v.24, p.77-92, 1983.
- Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J.** Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril*, v.77, p.403-408, 2002.
- Santos RR.** *Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-preservation*. 2007. 143f. Thesis - University of Utrecht, Netherlands, 2007.
- Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JR, Van Den Hurk, R.** Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using convencional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*, v.327, p.167-176, 2007.
- Saraiva MVA, Rosseto 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, p.1135-1143, 2010.
- Senbon S, Atsushi O, Tachibana M, Myiano T.** Xenografting of bovine secondary follicles into male and female SCID mice. *J Mamm Ova Res*, v.21, p.157-161, 2004a.
- Senbon S, Atsushi O, Tachibana M, Myiano T.** Xenografting of bovine secondary follicles into ovariectomized female severe combined immunodeficient mice. *J Reprod Dev*, v.50, p.439-444, 2004b.
- Senbon S, Ishii K, Fukumi Y, Myiano T.** Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. *Zygote*, v.13, p.309-315, 2005.
- Senbon S, Ota A, Tachibana M, Myiano T.** Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote*, v.11, p.139-149, 2003.
- Snow M, Cox S, Jenkin G, Trounson A, Shaw J.** Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science*, v.297, p.2227, 2002.
- Summers MC, Biggers JD.** Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and corret issues. *Hum Reprod Update*, v.19, p.557-582, 2003.
- Thibier M.** Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species. *Embryo Transfer Newslett*, v.24, p.12-17, 2006.
- Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP.** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, v.54, p.433-446, 2000.
- Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF.** Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod*, v.60, p.1462-1467, 1999.
- Wolvekamp MC, Cleary ML, Cox SL, Shaw JM, Jenkin G, Trounson AO.** Follicular development in cryopreserved common Wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.135-147, 2001.