



Adaptação da tecnologia do ovário artificial para os animais silvestres

Adaptation of the artificial ovary technology for wild animals

Gabriela Liberalino Lima^{1,‡}, Érica Camila Gurgel Praxedes², Alexandre Rodrigues Silva²

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Crato, Ceará, Brasil.

²Universidade Federal Rural do Semi, Árido, Mossoró, RN, Brasil.

Resumo

A biodiversidade mundial tem sido consideravelmente reduzida nos últimos anos, principalmente devido as modificações antrópicas nos habitats. Como consequência, tem-se observado um rápido e contínuo declínio das espécies mamíferas silvestres. Nesse contexto, a biotécnica “Ovário Artificial”, surge como uma ferramenta para a conservação da biodiversidade, pois tem como objetivo a manipulação *in vitro* de oócitos inclusos em folículos pré-antrais visando o seu crescimento e maturação, além da preservação de oócitos por meio do resfriamento e/ou criopreservação, permitindo o fornecimento de milhares de oócitos, que poderão ser utilizados posteriormente. Este artigo de revisão descreve os aspectos gerais, importância e avanços do ovário artificial em animais silvestres.

Palavras-chave: MOIFOPA, folículos pré-antrais, bancos de germoplasma.

Abstract

The world biodiversity has declined in recent years, mainly due to anthropogenic changes in habitats. As consequence, a rapid and steady decline in wild mammalian species is observed. In this context, the "Artificial Ovary" biotechnology emerges as a tool for the biodiversity conservation, since its objective is the in vitro manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles, aiming their growth and maturation, as well as their preservation by cooling and / or cryopreservation, allowing the supply of thousands of oocytes, which can be further used. This review describes the general aspects, importance and advances of the artificial ovary in wild animals.

Keywords: MOEPPF, preantral follicles, germplasm bank. MOEPPF.

Introdução

A biodiversidade mundial tem sido consideravelmente reduzida nos últimos anos, sendo um reflexo negativo da perda de habitats, mudanças climáticas e a introdução de espécies exóticas (Costa e Martins, 2008; Machado et al., 2017). Como consequência, tem-se observado um rápido e contínuo declínio das espécies mamíferas silvestres, estimando-se que das mais de 27000 espécies ameaçadas, 25% correspondem a mamíferos (IUCN, 2019). Dessa forma, estratégias de conservação *in situ*, como a preservação dos habitats, são as melhores formas de conservação da diversidade biológica, por permitirem a continuação dos processos evolucionários naturais (Andrabi e Maxwell, 2007). Contudo, elas podem ser ineficientes em casos de populações reduzidas ou quando a maioria dos indivíduos remanescentes está localizada em áreas desprotegidas (Costa e Martins, 2008).

Assim, uma grande atenção vem sendo dada a métodos e técnicas de manutenção de espécies e seu material genético *ex situ*, seja *in vivo* ou *in vitro* (Hiemstra et al., 2005), associadas a programas de reprodução assistida cujo objetivo é a manutenção da diversidade genética. A criação de bancos de germoplasma, portanto, merece destaque, uma vez que permite o armazenamento de material genético, incluindo gametas, para uso em futuras intervenções (Silva et al., 2012; Machado et al., 2017).

Nesse contexto, a biotécnica “Ovário Artificial”, ou Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), representa uma importante ferramenta na otimização do potencial reprodutivo das fêmeas, contribuindo para sua conservação (Figueiredo e Lima, 2017). Esta técnica tem por objetivo a manipulação *in vitro* de folículos pré-antrais visando o seu crescimento e maturação e, além das etapas de isolamento e cultivo folicular *in vitro* (CIV), esta abrange também a preservação de oócitos por meio do resfriamento e/ou criopreservação, permitindo o fornecimento de milhares de oócitos, que poderão ser utilizados para a multiplicação de animais (Figueiredo et al., 2008).

Em animais silvestres técnicas como criopreservação e CIV de gametas femininos ainda não estão bem estabelecidas, mas sua relevância é indiscutível, constituindo-se de um elo entre os programas de conservação animal *in situ* e *ex situ* (Andrabi e Maxwell, 2007). Diante do exposto, o objetivo da presente revisão de literatura é apresentar a importância da biotécnica de Ovário Artificial como estratégia para a preservação de espécies silvestres ameaçadas, abordando seu estado atual e perspectivas do seu uso para esta finalidade.

[‡]Correspondência: gabyliberalino@yahoo.com.br

Recebido: 11 de dezembro de 2018

Aceito: 10 de abril de 2019



Aspectos gerais e importância da Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais - MOIFOPA

De todos os gametas encontrados no ovário mamífero, a maioria apresenta-se inclusa em folículos ovarianos pré antrais, representando de 90 a 95% de toda população folicular. Entretanto, como a maioria destes folículos (99,9%) não chega até à ovulação, sendo eliminada por meio da atresia folicular (Figueiredo et al., 2007), uma das formas de se resgatar e utilizar este material é por meio da biotécnica de ovário artificial ou MOIFOPA. Esta tem por objetivo a o resgate e manipulação *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPA) visando o seu crescimento e maturação, permitindo seu emprego adequado em técnicas de reprodução assistida (Figueiredo e Lima, 2017).

A MOIFOPA é uma biotécnica de grande importância tanto para a pesquisa fundamental ou básica, quanto para a reprodução animal, uma vez que contribui com informações requeridas para a compreensão dos eventos relacionados à foliculogênese na fase pré antral. Além disso, por permitir o acesso e manipulação de um grande número de folículos pré-antrais a partir de um único ovário, poderá contribuir para a multiplicação de animais em vias de extinção (Figueiredo et al., 2008).

Ela apresenta ainda inúmeras outras vantagens, como uma ferramenta no aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas de alto valor zootécnico ou em perigo de extinção, possibilitando o uso de um número muito maior de oócitos a serem utilizados em diversas biotécnicas como a fertilização *in vitro*, tecnologia de embriões, clonagem e transgenia (Figueiredo et al., 2007).

Adicionalmente, é uma ferramenta importante para estudar a foliculogênese, testando e avaliando o efeito de diferentes substâncias (gonadotrofinas, fatores intra-ovarianos) no desenvolvimento oocitário inicial (Figueiredo et al., 2007). Esta é uma etapa de grande importância no contexto da adaptação de técnicas de reprodução assistida a animais silvestres, uma vez que uma das limitações para o seu sucesso é a falta de informações sobre a fisiologia reprodutiva das espécies (Micheletti et al., 2011).

Além das etapas de isolamento e cultivo folicular *in vitro*, abrange também a preservação de oócitos por meio do resfriamento e/ou criopreservação (Figueiredo et al., 2008), auxiliando, nesse sentido, a formação de bancos de germoplasma animal. Futuramente, esta técnica reprodutiva poderá contribuir para o restabelecimento de populações de animais ameaçados de extinção a partir de pequenos números de fêmeas (Figueiredo et al., 2007).

O papel da MOIFOPA na formação de bancos de germoplasma animal

A criopreservação de germoplasma é uma alternativa que diminui as limitações impostas pelo tempo e pela distância para a conservação de diversas espécies silvestres em risco de extinção (Costa e Martins, 2008). Mesmo diante dos esforços em se manter as populações em seu ambiente natural, nestes espaços as pequenas coleções de indivíduos podem ficar isoladas em áreas restritas de preservação, com pouco ou nenhum contato entre si, requerendo a intervenção humana para manter o intercâmbio genético entre elas, o que pode ser beneficiado pela manutenção de estoques de material genético (Saragusty et al., 2017).

Os bancos de germoplasma animal permitem o armazenamento de biomateriais, incluindo os gametas, os quais podem ser utilizados para intervenções futuras (Comizzoli, 2015). Embora a maioria dos trabalhos seja voltada para a criopreservação de espermatozoides e oócitos, estudos orientados na preservação de tecido ovariano (Jewgenow et al., 2011) e células somáticas (Ben-Nun et al., 2011) vem crescendo, no intuito de resgatar folículos ovarianos imaturos ou células pluripotentes, respectivamente (Comizzoli et al., 2012).

Nesse sentido, a MOIFOPA exerce papel fundamental na consolidação de protocolos eficientes de criopreservação de material genético. Isso é possível uma vez que compreende a etapa de conservação dos folículos pré-antrais, possibilitando ainda a avaliação da eficiência de protocolos de criopreservação de oócitos, por meio da análise da sua sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* posterior ao procedimento (Figueiredo et al., 2009).

A obtenção dos gametas femininos pode ser realizada por biópsias do tecido ovariano, ovariectomia uni ou bilateral ou colheita do ovário imediatamente após a morte do animal, independentemente da idade (Domingues et al., 2007). E, visando sua preservação, pode ser realizada a estocagem do tecido ovariano, dos folículos isolados ou dos oócitos maduros ou imaturos (Lermen et al., 2009).

A opção de criopreservar o tecido ovariano permite a conservação de uma grande quantidade de gametas femininos de uma só vez, além disso, os folículos pré antrais são mais resistentes a baixas temperaturas do que os folículos antrais, o que permite o armazenamento desta reserva de material de forma eficiente (Santos et al., 2010). Adicionalmente, dada a sua ampla aplicação na reprodução assistida associada ao transplante, a possibilidade de retomada da função ovariana e a facilidade de manuseio do tecido, a maioria dos trabalhos tem se concentrado na criopreservação de tecido ovariano (Brito et al., 2018; Faustino et al., 2011).

O tecido ovariano é formado de uma grande reserva de oócitos contidos em folículos primordiais, os quais abrangem cerca de 90% de todos os folículos presentes neste órgão, dessa forma, a preservação desse tecido permitiria o estoque de uma grande quantidade de material genético feminino (Santos et al., 2010). Estes folículos são mais resistentes a baixas temperaturas, uma vez que seu oócito possui menor taxa metabólica; ausência de fuso meiótico, zona pelúcida e grânulos da cortical; e menor quantidade de gotas lipídicas do que oócitos presentes em folículos em estágios mais avançados de desenvolvimento (Hovatta, 2005). Adicionalmente, ele pode ser obtido de animais de qualquer idade (incluindo fetos), bem como imediatamente após a sua morte (Cleary et al., 2001). Sua



maior limitação é a dificuldade na preservação do próprio ovário, considerando-se a diversidade de tipos celulares e componentes deste tecido (Hovatta, 2005).

Dessa forma, a MOIFOPA poderá contribuir para a utilização posterior desta reserva de gametas, com o desenvolvimento de um sistema que permita o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais e que resulte em oócitos aptos a serem maturados e fecundados *in vitro*, possibilitando, assim, a preservação a longo prazo de células germinativas femininas (Mao et al., 2002).

Avanços da adaptação da MOIFOPA na conservação de gametas de animais silvestres

Apesar dos resultados mais satisfatórios até hoje apresentados terem sido obtidos a partir de fêmeas de camundongos (O'Brien et al., 2003), muitos estudos têm mostrado a importância das diversas etapas da MOIFOPA na conservação de espécies silvestres. Especificamente na América do Sul, onde se concentra uma grande parte da fauna mundial (Silva et al., 2016), esta biotécnica tem contribuído na elucidação de mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial e na formação de bancos de germoplasma.

Sem dúvidas, o primeiro passo neste estudo é a obtenção e conhecimento das características da população folicular ovariana nas diversas espécies, isso porque parâmetros qualitativos e quantitativos da população folicular estão relacionados ao potencial reprodutivo das fêmeas. Em chinchilas (*Chinchilla lanigera*) foi observado que os ovários apresentam folículos em diferentes estágios, sendo o córtex composto por uma maior proporção de folículos primordiais e primários (Sánchez-Toranzo et al., 2014). Por outro lado, em bugio – preto (*Alouatta caraya*), uma população de 59.921 folículos foi encontrada. Destes, 71,1% correspondendo a folículos primordiais, 18,9% de primários, 8,1% de folículos secundários, 1,4% de folículos terciários e 0,5% de folículos pré ovulatórios (Lopes et al., 2006).

Em espécies constituintes do bioma caatinga do Nordeste brasileiro como catetos, cutias e preás, estudos com a aplicabilidade do ovário artificial vem mostrando resultados promissores. Em catetos, o total de 33273 ± 5789 folículos pré-antrais foi estimado para cada um dos ovários (*Pecari tajacu*), sendo esta população formada em sua maioria por folículos primordiais (91,56%), seguidos de primários (6,29%) e secundários (2,15%). Nesta espécie, foram observados vacúolos no citoplasma oocitário que correspondem a gotas de lipídios, os quais foram confirmados pela análise ultraestrutural (Lima et al., 2013). Em contraste, uma população de menor número de folículos foi encontrada em ovários de cutias da espécie *Dasyprocta leporina*. Nestas, 4419 ± 532 e 5397 ± 574 folículos no ovário direito e esquerdo, respectivamente, foram observados, com 7,51% constituída de folículos plurioculares (Santos et al., 2018).

Uma característica peculiar foi observada em preás (*Galea spixii*). Nesta espécie, foi estimada a população de 416 ± 342 folículos por par de ovários, sendo a maioria composta de folículos primários (63,4%), diferindo da maioria das espécies mamíferas (Praxedes et al., 2015), o que mostra a variabilidade entre as espécies. Em se tratando de conhecer características intrínsecas das diferentes espécies, estudos foram conduzidos avaliando a expressão de genes no ovário de viscacha (*Lagostomus maximus*). Esta espécie ovula entre 400 e 800 oócitos por ciclo estral e a expressão de uma proteína VASA específica de células tronco, proteínas apoptóticas BCL2 e BAX, assim como a fragmentação de DNA revelou uma proliferação irrestrita de células tronco nesta espécie, sem a eliminação apoptótica, sendo distinta dos demais mamíferos (Jensen et al., 2008; Leopardo et al., 2011).

Sobre a conservação do material genético feminino, em cutias (*Dasyprocta aguti*) a criopreservação por meio da congelamento lenta de fragmentos ovarianos permitiu a manutenção da integridade morfológica de pelos menos 60,6% dos FOPA (DMSO: $60,6 \pm 3,6\%$, EG: $64,0 \pm 11,9\%$; PROH: $62,0 \pm 6,9\%$), não havendo diferenças entre eles. Por outro lado, na análise ultraestrutural, foi verificado que apenas os folículos criopreservados com PROH mantiveram a ultraestrutura similar ao grupo controle (Wanderley et al., 2012).

Na mesma espécie, recentemente foi verificada que a vitrificação em superfície sólida de fragmentos ovarianos utilizando a associação de 3,0M de DMSO e 3,0M de etilenoglicol (EG) possibilitou o retorno da atividade de enxertos em camundongos SCID C57B1/6n (Praxedes et al., 2018). Neste estudo foi observado que 16,7% das fêmeas que receberam o enxerto vitrificado/aquecido tiveram retomada da atividade ovariana aproximadamente 20 dias após o procedimento, sendo confirmado pela presença de alterações na genitália externa e pelo aumento dos níveis de estrógeno sérico. Além disso, a vitrificação não causou fragmentação do DNA oocitário, não diferindo do grupo não vitrificado na análise do TUNEL.

A utilização da vitrificação em superfície sólida de tecido ovariano mostrou ser aplicável também em preás (*Galea spixii*), nos quais foi possível preservar a morfologia normal em 69,5% dos folículos pré-antrais utilizando uma solução de vitrificação contendo dimetilsulfóxido (3,0M), sacarose (0,25 M) e soro fetal bovino (10%) em meio essencial mínimo (MEM; Praxedes et al., 2015).

Em catetos, a refrigeração do tecido ovariano por até 36 h permitiu a manutenção da integridade morfológica e da viabilidade dos folículos pré-antrais. Ainda, foi demonstrado que o meio a base de água de coco em pó (60,7%) foi mais eficiente do que o meio mais simples a base de tampão salina fosfatada - PBS (49,4%) na preservação da integridade morfológica após as 36 h de armazenamento, embora sem diferenças em relação a viabilidade folicular (Lima et al., 2014). Nesta espécie foi também aplicada a vitrificação em superfície sólida de fragmentos ovarianos, utilizando EG, DMSO ou dimetilformamida (DMF) como crioprotetores na concentração de 3,0 ou 6,0 M, onde foi possível a conservação da integridade morfológica em mais de 70% dos FOPA,



demonstrando ser uma técnica promissora na formação de bancos de material genético feminino nesta e em espécies correlacionadas (Lima et al., 2012).

Adicionalmente, foi realizada a avaliação de diferentes agentes crioprotetores (3M de EG, 3M de DMSO ou 1,5M EG + 1,5M de DMSO) associados utilizando o Ovarian Tissue Cryosystem (OTC), na vitrificação de tecido ovariano de catetos. Não foram evidenciadas diferenças entre o grupo controle e os fragmentos vitrificados, assim como entre os crioprotetores utilizados em relação a manutenção da morfologia folicular (controle: 75,6 ± 8,6%; EG: 67,8 ± 6,8%; DMSO: 58,3 ± 8,7%; e DMSO + EG: 64,5 ± 7,7%), assim como foi possível a preservação de no mínimo 71,7% de folículos viáveis independentemente do crioprotetor utilizado (Campos et al., 2017).

Recentemente nesta espécie foi avaliada a influência de meios a base de TCM 199+ e MEM+ acrescidos ou não de FSHr sobre a sobrevivência e ativação de FOPAs cultivados *in vitro* por até 7 dias. Após este período de CIV foi verificado que apesar de não serem observadas diferenças significativas entre os meios sobre a morfologia folicular, apenas os fragmentos cultivados em TCM 199+ mantiveram este parâmetro similar ao dia 1 de cultivo (63,2%). Além disso, foi verificado um aumento significativo na proporção de folículos em desenvolvimento, com ativação folicular em todos os tratamentos, taxa de proliferação nuclear e matriz extracelular intactas ao utilizar este meio, sendo recomendado o seu uso, independente da utilização do FSHr (Lima et al., 2018).

Em primatas não humanos os estudos mostram resultados encorajadores acerca da utilização do ovário artificial como ferramenta para salvaguardar o material genético feminino (Scalercio et al., 2015a; Brito et al., 2017; para mais detalhes consultar revisão completa). Em *Sapajus apella*, por exemplo, foi demonstrado que o CIV de fragmentos de tecido ovariano em TCM 199 suplementado com β - mercaptoetanol, proteína morfogênica óssea 4 (BMP-4) ou gonadotrofina sérica de égua gestante (PMSG) promoveu a manutenção da viabilidade folicular similar ao controle (89,3%), aumentando ainda a formação de folículos secundários (44,9%; Brito et al., 2013).

Uma avaliação imunohistoquímica conduzida em ovários de *Saimiri collinsi* durante o CIV demonstrou que o fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e a proteína c-kit foram detectados no citoplasma de oócitos de folículos primordiais a secundários, enquanto a expressão de kit ligand foi observada em oócitos e células da granulosa destes folículos. Por outro lado, o hormônio antimulleriano foi expresso em folículos primários e secundários, mas não em folículos primordiais (Scalercio et al., 2015b).

Vale ressaltar que, apesar de ainda serem requeridos estudos mais aprofundados sobre a fisiologia reprodutiva de diversas espécies para que se tenha sucesso no uso de quaisquer técnicas de reprodução assistida, a adaptação da biotécnica de ovário artificial nas espécies silvestres representa um grande avanço diante do desafio da preservação dos recursos genéticos da fauna mundial.

Considerações Finais

Como foi visto, tanto as estratégias *in situ* como *ex situ* podem se beneficiar de biotécnicas reprodutivas tais como a MOIFOPA. Além de colaborar com a obtenção de mais informações sobre a fisiologia reprodutiva das fêmeas, esta técnica permite, através da criopreservação e cultivo *in vitro*, a conservação e o melhor aproveitamento do material genético feminino. Adicionalmente, o transplante de tecido ovariano aparece como grande aliado, sendo possível a sua associação à estas técnicas na busca da preservação das espécies. Sem dúvidas muitas informações sobre a morfofisiologia das espécies silvestres ainda são escassas e estes conhecimentos são necessários para o aperfeiçoamento e aplicabilidade de técnicas de reprodução assistida, contudo os resultados existentes são bastante promissores e incentivadores para o aprimoramento das técnicas já existentes e para a iniciativa de novos caminhos para a preservação da biodiversidade.

Referências

- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.
- Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, et al.** Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods*, v.8, p.829-831, 2011.
- Brito AB, Brito D, Silva WB, Rodrigues A, Figueiredo JR, Domingues S, Santos RR.** Morphology and morphometry of preantral follicles, and immunolocalization of angiogenic factors in ovarian tissue from the neotropical primate *Sapajus apella*. *Zygote*, v.26, p. 424-429, 2018.
- Brito AB, Lopes CTA, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Domingues SFS, Santos RR.** Vitrification of Ovarian Tissue from Non-Human Primates. *Acta Sci Vet*, v.45, p.1500, 2017.
- Brito AB, Santos RR, van den Hurk R, Lima JS, Miranda MS, Ohashi OM, Domingues SF.** Short-term culture of ovarian cortical strips from capuchin monkeys (*Sapajus apella*): a morphological, viability, and molecular study of preantral follicular development *in vitro*. *Reprod Sci*, v.20, p.990-997, 2013.
- Campos LB, Silva AM, Praxedes ECG, Moreira SSJ, Bezerra LGP, Apolinario CAC, Maia KM, Castelo TS, Silva AR.** Vitrificação de tecido ovariano de catetos (*Pecari tajacu*) utilizando o Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, p.601, 2017.
- Cleary M, Snow M, Paris M, Shaw J, Cox SL, Jenkin G.** Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an ischemic environment. *Cryobiology*, v.42, p.121-133, 2001.



- Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE.** Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology*, v.78, p.1666-1681, 2012.
- Comizzoli P.** Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J Androl*, v.17, p.640-645, 2015.
- Costa PM, Martins CF.** Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução *Univ Ci Saúde*, v.6, n.1, p.39-55, 2008.
- Domingues SFS, Caldas-Bussiere MC, Martins N, Carvalho RA.** Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (Capuchin monkeys). *Theriogenology*, v.68, p.1251-1259, 2007.
- Faustino LR, Silva CMG, Rossetto R, Rodrigues GQ, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.3-15, 2011.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV.** Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, n.2, p.143-152, 2007.
- Figueiredo JR, Gonçalves PBD, Freitas VJF.** Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2 ed. Roca, São Paulo, p.408, 2008
- Figueiredo JR, Lima, LF.** Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, n.1, p.248-253 2017
- Figueiredo JR, Martins FS, Rodrigues APR, Silva, JRV.** Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, n.6, p.55-58, 2009.
- Hiemstra SJ, Van der Lende T, Woelders H.** The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. Rome: FAO, p.25-35, 2000.
- Hovatta O.** Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, v.10, p.729-734, 2005.
- IUCN.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acessado em 2019.
- Jensen FC, Willis MA, Leopardo NP, Espinosa MB, Vitullo AD.** The ovary of the gestating South American plain vizcacha (*Lagostomus maximus*): suppressed apoptosis and corpora lutea persistence. *Biol Reprod*, v.79, p.240-246, 2008.
- Jewgenow K, Wiedemann C, Bertelsen MF, Ringleb J.** Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. *Intl Zoo Yrbk*, v.45, p.124-132, 2011.
- Leopardo NP, Jensen F, Willis MA, Espinosa MB, Vitullo AD.** The developing ovary of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia): massive proliferation with no sign of apoptosis-mediated germ cell attrition. *Reproduction*, v.141, p.633-641, 2011.
- Lermen D, Blömeke B, Browne R, et al.** Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular ecology*, v.18, p.1030-1033, 2009.
- Lima GL, Luz VB, Alves AMCV, Lunardi FO, Souza ALP, Peixoto GCX, Rodrigues APR, Oliveira MF, Silva AR.** Vitrification of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) ovarian tissue using various cryoprotectants preliminary results. In: IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction. 2012; Campinas. São Paulo:ISABR; 2012.
- Lima GL, Luz VB, Lima LR, Rocha RMP, Castro SV, Castelo TS, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Silva AR.** Interactions between different media and follicle-stimulating hormone supplementation on *in vitro* culture of preantral follicles enclosed in ovarian tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Reprod Dom Anim*, v.53, p.880-888, 2018.
- Lima GL, Santos EAA, Lima LF, Luz VB, Rodrigues APR, Silva AR.** Short-term preservation of Pecari tajacu ovarian preantral follicles using phosphate buffered saline (PBS) or powdered coconut water (ACP®) media. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.66, p.1623-1630, 2014.
- Lima GL, Santos EA, Luz VB, Rodrigues AP, Silva AR.** Morphological Characterization of the Ovarian Preantral Follicle Population of Collared Peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). *Anat Histol Embryol*, v.42, n.4, p.304-311, 2013.
- Lopes LH1, Lucci CM, Garcia MP, de Azevedo RB, Bão SN.** Light microscopical and ultrastructural characterization of black howler monkey (*Alouatta caraya*) ovarian follicles. *Anat Histol Embryol*, v.35, n.3, p.196-201, 2006.
- Machado LC, Roballo KCS, Cury FS, Ambrósio CE.** Female reproductive system morphology of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and cryopreservation of genetic material for animal germplasm bank enrichment. *Anat Histol Embryol*, p.1-8, 2017.
- Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN.** Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. *Biol Reprod*, v.67, p.1197-1203, 2002
- Micheletti T, Cubas ZS, Moraes W, Oliveira MJ, Kozicki LE, Weiss RR, Moreira N.** Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, n.4, p.408-417, 2011.



- 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.
- Praxedes ÉCG, Lima GL, Silva AM, Apolinário CAC, Bezerra JAB, Souza ALP, Oliveira MF, Rodrigues APR, Silva AR.** Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Reprod Fertil Dev*, v.29, n.3, p.594-602, 2015.
- Praxedes ÉCG, Lima GL, Bezerra LGP, Santos FA, Bezerra MB, Guerreiro DD, Rodrigues APR, Domingues SFS, Silva AR.** Development of fresh and vitrified agouti ovarian tissue after xenografting to ovariectomised severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Reprod Fertil Dev*, v.30, n.3, p.459-468, 2018.
- Sánchez-Toranzo G, Torres-Luque A, Gramajo-Bühler MC, Bühler MI.** Histology of the ovary of Chinchilla lanigera in captivity. *Anim Reprod Sci*, v.148, n.3-4, p.205-11, 2014.
- Santos EAA, Lima GL, Praxedes ECG, Silva AM, Maia KM, Oliveira MF, Rodrigues APR, Silva AR.** Estimation, morphology and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in agouti (*Dasyprocta leporina*). *Pesq Vet Bras*, v.38, n.1, p.175-182, 2018.
- Santos RR, Amorim C, Cecconi S, et al.** Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Ani Reprod Sci*, v.122, p.151-163, 2010.
- Saragusty J, Lemma A, Hildebrandt TB, Goëritz F.** Follicular size predicts success in artificial insemination with frozen-thawed sperm in donkeys. *PLoS One*, v.12, n.5, 2017.
- Scalercio SRRA, Brito AB, Domingues SFS, Santos RR, Amorim CA.** Immunolocalization of growth, inhibitory, and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reprod Sci*, v.22, p.68-74, 2015a.
- Scalercio SRRA, Santana LNS, Domingues SFS, Amorim CA, Santos RR.** Transplante ovariano: Destaques na reprodução de primatas não humanos. *Acta Sci Vet*, v.43, p.1315, 2015b.
- Silva AR, Pereira AF, Lima GL, Peixoto GCX, Souza ALP.** Assisted Reproductive Techniques on South American Wild Mammals. In: Rita Payan Carreira. (Org.). *Insights on Animal Reproduction*. 1ed. Rijeka: Intech, v.1, p.39-66, 2016.
- Silva AR, Souza ALP, Santos EAA, Lima GL, Peixoto GCX, Souza PC, Castelo TS.** Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. *Ciência Animal*, v.22, n.1, 2012.
- Wanderley LS, Luz HK, Faustino LR, Lima IM, Lopes CA, Silva AR, Bão SN, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR.** Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. *Theriogenology*, v.15, n.77, p. 260-267, 2012.
-