



Criopreservação do tecido ovariano visando restaurar a fertilidade humana

Ana Paula Ribeiro Rodrigues¹, Nathalie Jiatsa Donfack, Jamily Bezerra Bruno,
Giovanna Quintino Rodrigues, Francisca Geovania Canafistula de Sousa

Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de manipulação de oócitos e folículos ovarianos pré-antrais (LAMOFOPA),
Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

¹Correspondência: anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com

Resumo

A criopreservação e transplante do tecido ovariano representa uma técnica em potencial para a preservação e restauração da fertilidade feminina, especialmente de mulheres jovens que se submetem a tratamentos gonadotóxicos como os quimioterápicos, usados contra o câncer. Embora, o transplante de tecido ovariano fresco ou criopreservado tenha resultado no nascimento de indivíduos em diferentes espécies, como camundongos, ovinos e humanos, os riscos de reintrodução de células cancerosas após o tratamento, tem limitado o uso clínico. Desta forma, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais após criopreservação do tecido ovariano pode ser uma alternativa promissora para a preservação da fertilidade em casos extremos. A combinação destas técnicas é capaz de salvaguardar a fertilidade de pacientes que sofrem de câncer, como também permite a preservação do germoplasma de animais de alto valor comercial ou sob risco de extinção. No entanto, muitos desafios ainda necessitam ser superados, especialmente no que se refere à utilização de tecido ovariano previamente criopreservado em animais de produção.

Introdução

É amplamente conhecido que a quimio e radioterapia utilizadas no tratamento do câncer, prejudicam a sobrevivência de células saudáveis e por isso possuem efeitos negativos sobre a qualidade de vida, bem como sobre as gônadas, consequentemente levando à infertilidade feminina (Levine et al., 2015). O ovário é um órgão do sistema reprodutivo muito sensível ao tratamento com agentes citotóxicos e nestas circunstâncias, a criopreservação do tecido ovariano tem se tornado uma alternativa promissora para preservar a fertilidade de pacientes com câncer (Donnez et al., 2010). Especificamente no ovário, as disfunções reprodutivas observadas em pacientes jovens são atribuídas à falha ovariana prematura devido a injúrias nas células do pool de reserva e a alterações na produção de hormônios (Donnez et al., 2000).

De acordo com um estudo realizado por Issaoui e colaboradores, (2016) o tratamento com quimioterápicos compromete menos de 10% da reserva de folículos ovarianos, em meninas com idade inferior a 10 anos, mas em adolescentes com idade entre 11 e 18 anos a redução da reserva ovariana é de aproximadamente 30%. Por isso, no sentido de resguardar a fertilidade feminina, a criopreservação do tecido ovariano seguida do transplante vem sendo apontada como uma alternativa para preservar a fertilidade dessas pacientes (Beckham et al., 2016). Por outro lado, o transplante de tecido ovariano não pode ser aplicado em pacientes com determinados tipos de cânceres, como aqueles do tecido sanguíneo, devido os riscos de reintrodução de células cancerosas após o tratamento (Dolmans et al., 2013). Neste caso, o cultivo *in vitro* de tecido ovariano torna-se uma excelente alternativa para obtenção de folículos com oócitos aptos para a fertilização e produção *in vitro* de embriões.

A seguir, uma breve revisão abordará a importância e os principais aspectos da criopreservação de ovário associada ao transplante ou ao cultivo *in vitro* de folículos inclusos no tecido ovariano visando a preservação ou restauração da fertilidade feminina.

Criopreservação de tecido ovariano

De uma maneira geral, a criopreservação tem sido uma excelente estratégia para a manutenção da funcionalidade do ovário e recuperação da fertilidade, pois permite a preservação de oócitos presentes nos folículos ovarianos que seriam perdidos pelo processo natural de atresia, pelos tratamentos gonadotóxicos (por exemplo: radio e ou quimioterapia) ou ainda pela morte do animal (Paris et al., 2009). De uma maneira didática, a criopreservação, consiste na preservação de material biológico a baixas temperaturas (-196°C) ou em fase de vapor do nitrogênio líquido ($\sim 150^{\circ}\text{C}$ negativos) (Jain; Paulson, 2006). Esta técnica pode ser realizada através de dois métodos distintos: a *congelamento lento* ou a *vitrificação*, os quais diferem entre si, no que diz respeito à velocidade de redução da temperatura, bem como à concentração de agentes crioprotetores (ACPs) utilizados durante ambos os processos.

A congelamento lento é caracterizada por uma redução gradual da temperatura, com o objetivo de reduzir o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido (Sanches, 2009) e uso de baixas concentrações de ACPs. Porém, a principal desvantagem desse método é a formação de cristais de gelo intracelular, o que pode ser evitado no método de vitrificação. Na vitrificação os fluidos passam do estado

líquido diretamente para um estado sólido amorfo denominado vítreo (Yamaki et al., 2002). Porém, para que esta transição ocorra é necessária uma alta viscosidade, a qual é obtida pela elevada concentração de ACPs, e uma rápida redução da temperatura (Wolk, 2010). Até o presente momento, o método de congelamento lento tem sido amplamente aplicado para preservar folículos pré-antrais de humanos (Herraiz et al., 2014), murinos (Wang et al., 2009) e ruminantes (Maffei et al., 2014, Campbell et al., 2014). Em humanos, há relatos de nascimentos após autotransplante de córtex ovariano previamente congelado (Donnez et al., 2013), incluindo o relato do nascimento de duas crianças saudáveis (Ernst et al., 2010) e do nascimento de outra criança cuja paciente era pré-pubere no momento da criopreservação do córtex ovariano (Imbert et al., 2014). Já com a vitrificação e posterior transplante do tecido ovariano, com auxílio da fertilização *in vitro*, até o momento há o relato de dois nascimentos em humanos (Kawamura et al., 2013; Suzuki et al., 2015).

Dentre o material biológico a ser criopreservado com o intuito de preservar a fertilidade feminina podemos citar folículos inclusos em tecido ovariano, folículos isolados, oócitos e embriões. Especificamente na espécie humana, a grande vantagem da criopreservação do tecido ovariano é que a sua obtenção independe da idade e fase do ciclo estral (Shaw et al., 2000), além de envolver menos questões éticas e sociais que a criopreservação de oócitos e embriões, sobretudo quando esse processo é realizado na espécie humana (Zhang et al., 2009). Essa vantagem é extremamente importante para a reprodução assistida em mulheres que necessitam iniciar de imediato o tratamento contra o câncer (Zhou et al., 2010). A criopreservação de tecido ovariano também é uma alternativa para meninas que ainda não tenham atingido a puberdade ou mulheres que não possuam parceiros para a doação de gametas masculinos.

Para a medicina veterinária, a criopreservação de tecido ovariano também tem uma grande importância, sobretudo para animais domésticos de alto valor genético que venham a óbito de forma inesperada (SHAW et al., 2000), ou até mesmo para os programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção. É importante relatar que os estudos realizados com espécies animais como caprinos, ovinos, bovinos e até mesmo equinos têm sido amplamente utilizados como modelos para aplicabilidade na espécie humana.

Após criopreservação e descongelamento ou aquecimento, o tecido ovariano tanto em humanos quanto em animais, pode ser utilizado em transplante (auto e/ou xenotransplante), possibilitando a retomada das funções endócrina e gametogênica (LIU et al., 2008). Esse tecido pode ainda ser destinado ao cultivo *in vitro* dos folículos no próprio tecido ovariano ou isolados (Gosden et al., 2002), pois evita a reintrodução de células malignas, o que é possível ocorrer após transplante (Amorim et al., 2009), sendo uma crescente preocupação na clínica reprodutiva após o tratamento de doenças oncológicas.

Transplante

De acordo com a localização, o tecido ovariano previamente criopreservado pode ser reimplantado em um sítio *ortotópico* (mesma região do ovário) ou *heterotópico* ou diferente da do ovário, como o antebraço ou a parede abdominal, o que é realizado após o tratamento e cura da doença. O transplante pode ser classificado ainda de acordo com o receptor do enxerto em: *alotransplante*, *autotransplante* e *xenotransplante*, sendo estes dois últimos os mais utilizados.

Autotransplante

O autotransplante de tecido ovariano fresco ou criopreservado é realizado no mesmo animal ou indivíduo, e tem o potencial benefício de restaurar a função endócrina temporária em pacientes que sobrevivem ao câncer e desenvolvem falha ovariana prematura (Oktay et al., 2001). Entretanto, este procedimento somente pode ser realizado após a constatação da ausência de células cancerosas no tecido a ser enxertado (Kenny and Rodriguez-Wallberg, 2012). Na literatura, o primeiro nascimento reportado após a criopreservação do ovário por congelamento lento seguida de transplante foi descrito por Parrot (1960) em camundongos. Em animais domésticos de produção, os primeiros resultados encorajadores foram obtidos por Gosden et al. (1994). Estes autores relataram a retomada da atividade cíclica ovariana, prenhez e nascimento após o congelamento e autotransplante de tecido ovariano em ovelhas. O primeiro nascimento em humanos após criopreservação de tecido ovariano seguida de transplante foi reportado por Donnez et al. (2004), tornando-se um marco na medicina humana reprodutiva. Desde então, 60 relatos de nascimentos vivos foram registrados na literatura (Donnez and Dolmans, 2015). É importante ressaltar que, a criopreservação do tecido ovariano seguido de autotransplante deve ser recomendada apenas para mulheres com idade entre 35 e 38 anos, uma vez que já foi documentado que a reserva de folículos no ovário depende da idade (Jadoul et al., 2011).

O tecido ovariano pode ser transplantado ortotopicamente na cavidade pélvica (Radford et al., 2001) ou heterotopicamente em áreas subcutâneas do antebraço ou abdômen (Oktay et al., 2001, 2004) e outros sítios como o músculo do reto (Kim et al., 2009) ou no tecido subperitoneal (Stern et al., 2011). Em teoria, no enxerto ortotópico de tecido ovariano, a paciente deve ser capaz de engravidar naturalmente e isto tem sido registrado até o momento na maioria dos casos. Somente em algumas mulheres, a gravidez necessita do auxílio da técnica da fertilização *in vitro* (FIV) (Schmidt et al., 2003). Diferente do transplante ortotópico, o transplante heterotópico



visa evitar procedimentos cirúrgicos invasivos quando um novo transplante é requerido, bem como uma fácil recuperação dos oócitos (Kim, 2012). Neste caso, não é possível a concepção natural e os sítios heterotópicos podem não proporcionar um ambiente adequado para o desenvolvimento folicular, devido a algumas diferenças fisiológicas como temperatura, pressão, fatores parácrinos e suprimento sanguíneo (Donnez et al., 2013).

Xenotransplante

O xenotransplante é realizado entre espécies diferentes. Alguns estudos têm mostrado que o xenotransplante do tecido ovariano humano em camundongos demonstrou ser um excelente modelo de estudo para as funções ovarianas e desenvolvimento de folículos ovarianos *in vivo* (Van Eyck et al., 2009). Esse tipo de transplante tem sido explorado como um método para eliminar o risco de transferência de células malignas residuais no tecido transplantado e, ainda como uma possível alternativa para mulheres em que o crescimento de tumores malignos é hormônio dependente. Desde 1960, linhagens de camundongos nude têm sido utilizadas como modelo *in vivo* para estudos relacionados a tumores malignos em humanos, pois nestes animais o timo está ausente e, portanto, não podem produzir linfócitos T maduros (células responsáveis pelas respostas imunológicas do organismo). Devido a isso, os enxertos realizados em camundongos não são rejeitados, não somente na condição de alotransplante, mas também durante o xenotransplante (Fransolet et al., 2015). Camundongos com a síndrome da deficiência combinada SCID foram os primeiros modelos e são os mais comumente utilizados no xenotransplante de tecido ovariano (Aubard, 2003). Estes animais são caracterizados pela presença da mutação *scid*, que produz um defeito na recombinação de genes do receptor de antígenos, levando os animais mutantes a não produzir linfócitos tipo T e B (Custer et al., 1985). Assim, camundongos SCID podem manter os tecidos de outras espécies sem produzir qualquer resposta imunológica que possa resultar na rejeição do tecido enxertado no hospedeiro (Bosma et al., 1983).

Nas situações em que o transplante não é viável para a restauração da fertilidade pode-se considerar alternativamente a realização do cultivo *in vitro* de tecido ovariano, também conhecido como cultivo *in situ*.

Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O principal objetivo do cultivo *in vitro* de FOPA é evitar a atresia folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, além de permitir o desenvolvimento folicular assegurando o crescimento e a maturação dos oócitos (Figueiredo et al., 2008). O cultivo de FOPA pode ser realizado de duas formas: *in situ* (folículos inclusos no tecido ovariano) ou cultivo de folículos isolados. O cultivo *in situ* tem sido considerado importante para o estudo da ativação de folículos primordiais e do crescimento de folículos primários em várias espécies (bovinos: McLaughlin; Telfer, 2010; ovinos: Lima et al., 2013; humanos: Ding et al., 2010; caprinos: Celestino et al., 2009). O cultivo de folículos isolados por sua vez, apresenta como vantagens, o fato de permitir o acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de favorecer uma maior perfusão do meio para o folículo (Abir et al., 1999).

Os principais resultados obtidos utilizando a técnica do cultivo *in vitro* de FOPA foi a obtenção de embriões em diversas espécies (camundongos: O'Brien et al., 2003; cabras: Saraiva et al., 2010; ovelhas: Arunakumari et al., 2010; humanos: Telfer et al., 2008, dentre outros). O resultado mais encorajador obtido até o momento foi o nascimento de vários camundongos saudáveis a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro* após cultivo de ovário (O'Brien; Pendola; Eppig, 2003).

A criopreservação associada ao cultivo *in vitro* é uma excelente alternativa para a preservação da fertilidade feminina além de evitar a reintrodução de células malignas, um risco iminente quando se realiza o transplante. Em murinos, embriões foram obtidos após criopreservação seguida do cultivo *in vitro* de tecido ovariano, resultando na gestação e nascimentos de filhotes vivos (Hasegawa et al., 2006, Wang et al., 2011). Em pequenos ruminantes, a criopreservação de folículos pré-antrais associada ao cultivo *in vitro* ainda é muito restrita e limita-se a poucos trabalhos na espécie caprina (Carvalho et al., 2014) e ovina (Lunardi et al., 2015). Nessa última espécie, o resultado mais significativo foi reportado recentemente por Lunardi et al. (2015), os quais demonstraram que folículos secundários previamente criopreservados podem se desenvolver até o estágio antral quando cultivados *in vitro* por até 6 dias.

Na espécie humana, Bian et al. (2013) observaram uma manutenção da viabilidade e ultraestrutura folicular após criopreservação seguida de cultivo *in vitro* de folículos isolados.

Apesar dos relatos de nascimento após criopreservação e transplante de tecido ovariano, os resultados obtidos com cultivo *in vitro* de material criopreservado ainda são bastante escassos, pois, muito embora isso evite a reintrodução de células malignas, a eficiência dessa técnica ainda é muito baixa. Com isso, pode-se dizer que, tanto a criopreservação como o cultivo de folículos pré-antrais, ainda são considerados técnicas de reprodução assistida experimentais ou em desenvolvimento.



Considerações finais

De acordo com o que tem sido observado na literatura, a criopreservação seguida de transplante ou cultivo *in vitro* de FOPA é uma excelente alternativa para a preservação da fertilidade e capacidade reprodutiva de mulheres submetidas a tratamentos gonadotóxicos. Tais técnicas podem garantir a gestação e evitar a reintrodução de células malignas após o tratamento e cura da doença. A associação destas técnicas também poderá ser utilizada para preservar espécies ou raças de animais ameaçados de extinção ou mesmo de animais geneticamente valiosos.

Referências

- Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, Ben Rafael Z.** Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum Reprod*, v.14, p.1299-1301, 1999.
- Amorim EA, Graham JK, Spizziri B, Meyers M, Torres CA.** Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v.58, p.210-214, 2009.
- Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH.** Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v.74, p.884-894, 2010.
- Aubard Y.** Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.108, p.14-18, 2003.
- Beckmann MW, Dittrich R, Findekle S, Lotz L.** Surgical Aspects of Ovarian Tissue Removal and Ovarian Tissue Transplantation for Fertility Preservation. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, v.76, p.1057-1064, 2016.
- Bian J, Li T, Ding C, Xin W, Zhu B, Zhou C.** Vitreous Cryopreservation of Human Preantral Follicles Encapsulated in Alginate Beads with Mini Mesh Cups. *J Reprod Dev*, v.59, p.288-295, 2013.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ.** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, v.301, p:527-530, p.1983.
- Campbell BK, Hernandez-Medrano J, Onions V, Pincott-Allen C, Aljaser F, Fisher J, Mcneilly AS, Webb R, Picton HM.** Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Hum Reprod*, v.29, p.1749-1763, 2014.
- Campbell BK, Hernandez-Medrano J, Onions V, Pincott-Allen C, Aljaser F, Fisher J, McNeilly AS, Webb R, Picton HM.** Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Hum Reprod*, v.29, p.1749-1763, 2014.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Lobo CH, Santos FW, Santos RR, Campello CC, Bordignon V, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. *Res Vet Sci*, v.97, p.140-147, 2014.
- Celestino JJH, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Chaves RN, Martins FS, Lima LF, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Bão SN, Figueiredo JR.** Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reprod Sci*, v.16, p. 239-246, 2009.
- Custer, RP, Bosma, GC, Bosma, MJ.** Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. *Pathology, reconstitution, neoplasms. Am J Pathol*, v.120, p.464-477, 1985.
- Ding CC, Thong KJ, Krishna A, Telfer EE.** Activin A inhibits activation of human primordial follicles *in vitro*. *J Assist Reprod Genet*, v.27, p.141-147, 2010.
- Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY Greve T.** Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.99, p.1514-1524, 2013.
- Donnez J, Dolmans M M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A.** Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v. 364, p. 1405-1410, 2004.
- Donnez J, Dolmans MM.** Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*, v.9, p.735-749, 2013.
- Donnez J, Dolmans MM.** Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet*, v.32, p.1167-1170, 2015.
- Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M.** Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v.12, p.1-9, 2000.
- Donnez J, Jadoul P, Langendonck A V, Donnez O, Van Eyck A S, Marinescu C, Dolmans M M.** Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v.24, p.87-100, 2010.
- El Issaoui M, Giorgione V, Mamsen IS, Rechnitzer C, Birkebæk N, Clausen N, Kelsey TW, Andersen CY.** Effect of first line cancer treatment on the ovarian reserve and follicular density in girls under the age of 18 years. *Fertil Steril*, v.106, p.1757-1762, 2016.
- Ernst E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen CY.** The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.25, p.1280-1281, 2010.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos



- ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, Roca: São Paulo, 2ª ed., p. 303-327, 2008.
- Fransolet M, Henry L, Labied S, Masereel MC, Blacher S, Noël A, Foidart JM, Nisolle M, Munaut C.** Influence of mouse strain on ovarian tissue recovery after engraftment with angiogenic factor. *Journal of Ovarian Research*. V.015, p.0142-0146, 2015.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R.** Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees-C. *Hum Reprod*, v.9, p.597-603, 1994.
- Gosden RG, Mullan J, Picton HM, Yin H, Tan SL.** Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Hum Reprod Update*, v.8, p.105-110, 2002.
- Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, Koyama K.** Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, v.86, p.1182-1192, 2006.
- Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodriguez B, Diaz C, Sanchezerrano M, Mirabet V, Pellicer A.** Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*, v.101, p.775-784, 2014.
- Imbert R, Moffa F, Tsepelidis S, Simon P, Delbaere A, Devreker F, Dechene J, Ferster A, Veys I, Fastrez M, Englert Y, Demeestere I.** Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. *Hum Reprod*, v.29, p.1931-1940, 2014.
- Jadoul P, Anckaert E, Dewandeleer A, Steffens M, Dolmans M M, Vermeylen C, Smitz J, Donnez J, Maiter D.** Clinical and biologic evaluation of ovarian function in women treated by bone marrow transplantation for various indications during childhood or adolescence. *Fertil Steril*, v.96, p.126-133, 2011.
- Jain JK, Paulson RJ.** Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*, v.86, p.1037-1046, 2006.
- Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C-h, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ.** Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.110, p.17474-17479, 2013.
- Kenny A, Rodriguez-Wallberg.** Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v.26, p.391-405, 2012.
- Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D.** Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertil Steril*, v.91, p.2349-2354, 2009
- Kim SS.** Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. *J Assist Reproduction and Genetic*, v.29, p.489-493, 2012.
- Levine JM, Kelvin JF, Quinn GP, Gracia CR.** Infertility in reproductive-age female cancer survivors. *Cancer*, v.121, p.1532-1539, 2015.
- Liu LJ, Xie XY, Zhang RZ, Xu P, Bujard H, Jun M.** Reproduction and fertility In wild-type and transgenic mice after orthotopic transplantation of cryopreserved ovaries from 10-d-old mice. *Lab Animal*, v.37, p.353-357, 2008.
- Lunardi FO, Chaves RN, Lima L F, Araújo V R, Brito I R, Souza CE, Azevedo Donato MAM, Peixoto CA, Dinnyes A, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to gro and form antrum after a short period of *in vitro* culture. *Cell and Tissue Research*, v.362, p.241-251, 2015.
- Luyckx V, Pharm B, Soares M, Scalercio S, Jadoul P, Amorim CA, Soares M, Donnez J, Dolmans MM.** Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. *Fertil Steril*, V.100, p.1350-1357, 2013.
- Maffei S, Pennarossa G, Brevini TA, Arav A, Gandolfi F.** Beneficial effect of directional freezing on *in vitro* viability of cryopreserved sheep whole ovaries and ovarian cortical slices. *Hum Reprod*, v.29, p.114-124, 2014.
- McLaughlin M, Telfer EE.** Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Reproduction*, v.139, p.971-978, 2010.
- 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.
- Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z.** Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v.363, p.837-840, 2004.
- Oktay K, Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z.** Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA*, v.286, p.1490-1493, 2001.
- Paris MCJ, Andersen CY, Shaw JM.** Ovarian cryopreservation and grafting: its potential for human reproductive biology and animal conservation. *Animal Reproduction*, v.6, p. 96-113, 2009.
- Parrot, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *Journal of Reprod*



Fertil, v.1, p.230-241, 1960.

Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith ARB, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden RG, Shalet SM. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for hodgkin's lymphoma. *Lancet*, v.357, p.1172-1175, 2001.

Sanches BV. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, cultivados ou não na presença de Forskolín. 49f. Dissertação (Mestrado) – Ciências veterinárias, pós-graduação em ciência animal, Escola de veterinária da Universidade Federal de Goiás Universidade federal de Goiás, 2009.

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, p.1135-1143, 2010.

Schmidt KLT, Ernst E, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Yding Andersen C. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod*, V.18, p.2654-2659, 2003.

Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 53, p.59-72, 2000.

Stern CJ, Toledo MG, Hale LG, Gook DA, Edgar DH. The first australian experience of heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue: evidence of establishment of normal ovarian function. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, v.51, p.268-275, 2011.

Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Kawamura K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*, v.30, p.608-615, 2015.

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 Eyck AS, Jordan B, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertil Steril*, v.92, p.374-381, 2009.

Wang X Q, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction*, v.141, p.183-191, 2011.

Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction*, v.138, p.527-535, 2009.

Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, v.60, p.11-22, 2010.

Yamaki SB, Pedroso AG, Atvars TDZ. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físico-química). *Química Nova*, v.25, p.330-334, 2002.

Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Transplantation of mouse ovarian tissue: Comparison of the transplantation sites. *Theriogenology*, v.83, p.854-861, 2015.

Zhang J-M, Li L-X, Liu X-L, Yang Y-X, Wan X-P. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *J Assist Reprod Genet*, v.26, p.137-142, 2009.

Zhou X H, Wu Y J, Shi J, Xia Y X, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*, v.60, p.101- 105, 2010.