



Criopreservação de tecido ovariano e/ou folículos pré-antrais: uma alternativa para salvar o material genético e a fertilidade de ovelhas e cabras valiosas

Cryopreservation of ovarian tissue and/or preantral follicles: an alternative to safeguard the genetic material and fertility of valuable sheep and goats

Ana Paula Ribeiro Rodrigues[‡], Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, Giovanna Quintino Rodrigues, Danielle Cristina Calado de Brito

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

Resumo

A redução da biodiversidade tem levado a uma preocupação emergencial frente a conservação do material biológico de animais geneticamente valiosos. Para tanto, a implantação de bancos de germoplasma, como embriões, gametas e tecido gonadal e somáticos, tem sido uma alternativa para auxiliar na manutenção da biodiversidade. No tocante ao material genético de fêmeas, a criopreservação de folículos pré-antrais isolados ou incluídos no tecido ovariano associada ao uso de tecnologias de reprodução assistida, como cultivo, fertilização *in vitro* e produção de embriões *in vitro*, poderá auxiliar na conservação da fertilidade de animais domésticos de interesse econômico com dificuldades reprodutivas ou animais ameaçados de extinção. Além disso, a criopreservação de tecido ovariano seguida de transplante pode ser uma alternativa promissora, uma vez que permite a restauração da função ovariana e reprodutiva. Estudos realizados em humanos relataram o nascimento de 130 indivíduos após o transplante de tecido ovariano previamente criopreservado. Apesar desse sucesso, a criopreservação de ovário ainda é considerada uma técnica experimental. Especialmente em caprinos e ovinos, a grande maioria dos estudos tem usado essas espécies como modelo experimental para a espécie humana. Nessas espécies, o sucesso da criopreservação de folículos ovarianos já foi evidenciado, o que nos dá esperança para o uso dessa tecnologia, vislumbrando, não somente a conservação do material genético, mas a obtenção de embriões e nascimento de crias mesmo após a morte de um animal geneticamente valioso. Assim, todos os esforços atuais estão voltados para a avaliação adequada da qualidade de protocolos de criopreservação que assegurem que esses recursos genéticos permaneçam como parte funcional dos sistemas de produção e conservação das espécies.

Palavras-chave: criopreservação, restauração da fertilidade, folículos ovarianos, oócitos, pequenos ruminantes.

Abstract

Reducing biodiversity has led to an emergency concern over the conservation of biological material from genetically valuable animals. Therefore, the establishment of gene banks, such as embryos, gametes and somatic and ovarian tissue has been an alternative to assist in maintaining biodiversity. Concerning the genetic material of females, the cryopreservation of preantral follicles isolated or included in the ovarian tissue associated with the use of assisted reproduction technologies, such as culture, in vitro fertilization and in vitro embryo production, may help to preserve the fertility of domestic animals of economic interest with reproductive difficulties or animals threatened with extinction. In addition, cryopreservation of ovarian tissue followed by transplantation may be a promising alternative, since it allows the restoration of ovarian and reproductive function. Studies in humans have reported the birth of 130 individuals after previously cryopreserved ovarian tissue transplantation. Despite this success, ovary cryopreservation is still considered an experimental technique. Especially in goats and sheep, the vast majority of studies have used these species as an experimental model for the human species. In these species, the success of cryopreservation of ovarian follicles has already been shown, which gives us hope for the use of this technology, noting not only the conservation of the genetic material, but the obtaining of embryos and the birth of youngsters even after the death of a genetically valuable animal. Thus, all current efforts are focused on the proper evaluation of the quality of cryopreservation protocols that ensure that these genetic resources remain as a functional part of the systems of production and conservation of the species.

Keywords: cryopreservation, restoration of fertility, ovarian follicles, oocytes, small ruminants.

Introdução

A conservação de material genético de animais valiosos por meio da criopreservação de gametas masculinos é uma prática relativamente simples, sob o ponto de vista da obtenção de amostras, haja vista que a produção de sêmen é um processo contínuo ao longo da vida reprodutiva do animal. O mesmo já não pode ser dito para as fêmeas, considerando que de um modo geral, em mamíferos, o estoque total de gametas femininos, ou seja, os oócitos, os quais são encontrados no interior dos folículos ovarianos é estabelecido ainda na vida intrauterina

[‡]Correspondência: anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com

Recebido: 11 de março de 2019

Aceito: 26 de março de 2019



(McGee; Hsueh, 2000). Após o nascimento, grande parte (99,9%) desses folículos se tornarão atresícos ou degenerados naturalmente, e morrem antes do processo de maturação oocitária e, conseqüentemente, ovulação, sem que haja reposição desse estoque. Além disso, diferente dos machos, a recuperação dos gametas femininos durante a vida reprodutiva sem afetar os ovários ou até mesmo sem removê-los é praticamente inviável. Para animais de produção, como caprinos e ovinos, a remoção dos ovários significa tornar o animal improdutivo no rebanho. Por outro lado, se uma fêmea valiosa, por alguma razão tem a sua função reprodutiva interrompida ou vem a óbito, o seu material genético pode ser conservado por meio da criopreservação de folículos, em especial os pré-antrais inclusos ou não no ambiente ovariano.

Os primeiros estudos envolvendo a conservação de material genético feminino foram realizados no final da década de 50 com ovários murinos (Deanesly et al., 1954). Desde então, essa estratégia vem sendo utilizada em diferentes espécies, com avanços significativos em uma grande variedade de animais, incluindo caprinos e ovinos. Nessas espécies, diversos protocolos foram testados tanto para a criopreservação de tecido ovariano (Carvalho et al., 2013; Silva et al., 2018), como para folículos pré-antrais isolados (Amorim et al., 2003b; Santos et al., 2007a), culminando com resultados extremamente satisfatórios, os quais podem ser utilizados para nortear estratégias em programas de conservação de recursos genéticos de indivíduos ou raças de interesse econômico ou ameaçadas de extinção.

Dentre as raças, genuinamente brasileiras, destacam-se a Moxotó e a Canindé na espécie caprina e as raças ovinas, Morada Nova, Santa Inês e Cariri, as quais têm uma grande importância na produção de carne e pele, sobretudo na região Nordeste do Brasil. Outras raças naturalizadas como a Bergamácia Brasileira, Rabo Largo, e Somalis Brasileira, devido às importantes características adaptativas, tornaram-se um valioso patrimônio genético para o país, no entanto, encontram-se sob ameaça de extinção. Para assegurar que esses recursos genéticos permaneçam como parte funcional dos sistemas de produção, possibilitando sua recuperação e sua utilização, é preciso adotar tecnologias adequadas e até mesmo sustentáveis, como a criopreservação de material em bancos de germoplasma. Dessa forma, acredita-se que a criopreservação de gametas femininos presentes nos folículos ovarianos pode ser uma excelente alternativa para evitar a perda de indivíduos ou mesmo de uma raça inteira. Portanto, esse trabalho tem como objetivo abordar a relevância dos bancos de recursos genômicos e apresentar os principais resultados obtidos com a criopreservação de folículos pré-antrais caprinos e ovinos.

Importância dos bancos de recursos genômicos

De acordo com Woelders et al. (2012), a diversidade genética em animais de produção está sob ameaça. Naturalmente, isso se caracteriza em um problema bastante preocupante, pois a biodiversidade genética permite que os animais se adaptem a diferentes ambientes, seja pelas mudanças impostas pelo homem sob a forma de práticas de manejo ou no sentido mais amplo, às mudanças causadas por doenças e mudanças climáticas. Atualmente, 20% das raças de animais de produção estão em risco de extinção (Morrell e Meyer, 2017).

Diante desse cenário, e somada às dificuldades reprodutivas de determinadas populações de animais domésticos de interesse econômico ou ameaçadas de extinção, nos deparamos com a necessidade de aplicação de medidas de conservação de recursos genéticos. Uma estratégia considerável é a conservação *in situ*, isto é, a manutenção dos animais, porém, não é uma opção sustentável por longo prazo, pois os custos são bastante elevados e geralmente nesses casos, considera-se pequenas populações, o que implicaria também em pouco tempo na perda da diversidade genética. Portanto, a conservação *in situ* precisa ser complementada pelo que denominamos de bancos de genes com o intuito de garantir a conservação do germoplasma de raças raras e/ou comercialmente valiosas (Woelders e Chaveiro, 2004; Mariante et al., 2011). Nesta concepção, em se tratando de fêmeas, o avanço da criobiologia, associada às tecnologias reprodutivas tem permitido a conservação e o uso de embriões, oócitos e tecido ovariano, dos quais já são conhecidos resultados bastante impactantes na reprodução animal, pelo menos com os dois primeiros, quando se trata de armazenamento a curto ou médio prazo.

No tocante ao armazenamento a longo prazo, o material genético pode ser usado nas seguintes situações: 1) para conservar a diversidade genética atual, para qualquer uso no futuro, como por exemplo, restabelecer uma raça perdida e restaurar a diversidade genética dentro de uma raça de modo saudável, ou para usar genótipos específicos, visando novas metas de reprodução; 2) para apoiar sistemas de reprodução de raças raras com o intuito de minimizar a endogamia (Woelders e Chaveiro, 2004), o que requer uma atualização regular do material no banco de genes e uma pronta disponibilidade de recursos para uso no campo; 3) disponibilizar material para pesquisa, como por exemplo, aperfeiçoar as técnicas de reprodução assistida ou utilizar o material como modelo experimental para espécies filogeneticamente próximas ou até mesmo para humanos, cujo material disponível para pesquisa, normalmente é indisponível.

No Brasil, existem bancos de germoplasma voltados, principalmente, para a conservação de material genético de animais domésticos com potencial produtivo. O Banco de Germoplasma de Caprinos e Ovinos Naturalizados (BGCON), por exemplo, é um núcleo de conservação institucional mantido pela Embrapa Caprinos, em Sobral, CE, desde 1988. Desde então, o BGCON vem conservando machos e fêmeas das espécies caprinas e ovinas, os quais têm sido utilizados como doadores de germoplasma (conservação *in situ*), complementando os programas de conservação *ex situ* (Andrabi e Maxwell, 2007; Santos et al., 2008).



Embora, a criopreservação de ovário ainda seja considerada uma técnica experimental, sobretudo na reprodução animal, podemos destacar algumas vantagens sobre a criopreservação de embriões ou oócitos, como mostrado a seguir.

Vantagens da criopreservação de ovário versus criopreservação de oócitos e embriões

A criopreservação de oócitos tem sido bastante utilizada, principalmente em mulheres com dificuldades reprodutivas. Estudos apontam taxas de sobrevivência oocitária pós-descongelamento de até 96%, com 73% de taxa de fertilização, 38% de taxa de implantação uterina por embrião e até 63% de gestação em humanos (Cobo et al., 2010). Porém, essa abordagem apresenta algumas limitações em espécies mamíferas, principalmente em relação ao número de oócitos obtidos, bem como a necessidade de estimulação ovariana (Mullen; Critser, 2007). Além disso, essa técnica pode causar a liberação prematura do conteúdo dos grânulos corticais e, conseqüentemente, levar ao endurecimento da zona pelúcida (Vicent et al., 1999), o que pode culminar com redução da taxa de fertilização.

A criopreservação de embriões é considerada uma das principais ferramentas para manutenção de animais domésticos (Dinnyes et al., 2006). Estudos têm demonstrado protocolos bem-sucedidos com avanços nas técnicas de criopreservação, com taxa de sobrevivência dos embriões ao descongelamento em torno de 97% (Rezazadeh et al., 2009). No entanto, a técnica apresenta as mesmas dificuldades da criopreservação de oócitos, como o custo de obtenção dos embriões, necessidade de banco de sêmen e de estimulação ovariana, além de não ser uma técnica viável para animais pré-púberes (Shaw et al., 2000).

Por outro lado, a criopreservação de tecido ovariano possibilita preservar um grande número de oócitos imaturos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais, e tem atraído interesse de clínicas de reprodução e laboratórios de pesquisa, considerando o seu impacto na reprodução assistida animal e humana. Diferentemente da criopreservação de oócitos, alterações cromossômicas e no fuso meiótico são menos prováveis, pois os oócitos imaturos são menos indiferenciados, possuem menos organelas, não apresentam zona pelúcida e grânulos corticais, e são menos ativos metabolicamente (Nugent et al., 1997; Yeoman et al., 2005). Adicionalmente, é uma alternativa que supera os procedimentos de superovulação demorados e caros da criopreservação de embriões. Além disso, o tecido ovariano criopreservado possibilita a formação de um grande reservatório de oócitos, permitindo a exploração do material. Desta forma, estudos têm demonstrado resultados promissores com retomada das funções endócrina e gametogênica, por meio do cultivo *in vitro* e *in vivo* após criopreservação de tecido ovariano de espécies domésticas (Santos et al., 2007a; Massardier et al., 2010; Donfack et al., 2018; Silva et al., 2018).

Impacto da criopreservação de ovário sobre a conservação da função reprodutiva

A criopreservação tem sido uma excelente estratégia para a manutenção da funcionalidade do ovário e recuperação da fertilidade, pois permite a conservação de oócitos presentes nos folículos ovarianos que seriam perdidos pelo processo natural de atresia, pelos tratamentos gonadotóxicos ou ainda pela morte do animal (Paris et al., 2009). Com a finalidade de restaurar as funções endócrina e gametogênica (Liu et al., 2008), o passo seguinte após a criopreservação do ovário, pode ser o transplante de fragmentos do órgão ou o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais presentes no próprio ambiente ovariano ou mesmo isolados (Gosden et al., 2002).

Dentre os métodos adotados para preservar tecido ovariano, a congelamento lento tem sido intensamente aplicada para conservar folículos pré-antrais humanos (Herraiz et al., 2014), murinos (Wang et al., 2009) e ruminantes (Campbell et al., 2014). O primeiro nascimento em humanos a partir de transplante de tecido ovariano criopreservado utilizou esse método (Donnez et al., 2004). Por outro lado, usando o método de vitrificação seguido de transplante, foram relatados apenas dois nascimentos na espécie humana (Kawamura et al., 2013; Suzuki et al., 2015), totalizando até o presente momento, 130 nascimentos obtidos a partir do transplante de tecido ovariano criopreservado (Fisch; Abir, 2018).

Em humanos, a demanda para a conservação da fertilidade vem aumentando devido ao tratamento gonadotóxico de mulheres precocemente diagnosticadas com câncer, o que pode induzir falha ovariana prematura (Donnez; Dolmans, 2013). Diante disso, a criopreservação do tecido ovariano ou dos folículos isolados antes da terapia contra o câncer e, posterior, transplante ou cultivo *in vitro* torna-se uma alternativa viável como método de escolha para a conservação da fertilidade feminina. Para a medicina veterinária, a criopreservação de tecido ovariano tem uma grande importância, sobretudo para animais domésticos pré-púberes de alto valor genético com dificuldades reprodutivas ou que venham a óbito (Shaw et al., 2000), bem como para os programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção. Além disso, os estudos realizados em caprinos e ovinos têm sido amplamente utilizados como modelos para aplicabilidade na espécie humana.

Principais resultados da criopreservação de tecido ovariano em ovelhas e cabras

Com base no que foi relatado anteriormente, protocolos estabelecidos para caprinos e ovinos podem ser adotados para humanos, um exemplo é o estudo realizado por Donnez et al. (2004), no qual foi relatado o primeiro nascimento na espécie humana a partir de tecido ovariano criopreservado e transplantado. Este estudo foi baseado



no trabalho de Gosden et al. (1994) na espécie ovina, no qual fragmentos ovarianos foram submetidos à congelação lenta e, posteriormente, autotransplantados, gerando o nascimento de um cordeiro. O nascimento de indivíduos vivos também foi obtido nessa espécie após o transplante de tecido ovariano vitrificado (Bordes et al., 2005; Lornage et al., 2006). Mesmo com esses relatos de nascimentos após transplante, muitas investigações recentes vêm direcionando a sua atenção para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais criopreservados, uma vez que reduzem o risco de reintrodução de células cancerosas, nos casos de transplante de tecido ovariano em mulheres após tratamento contra câncer. Estudos com cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos vitrificados culminaram com resultados importantes, como a maturação *in vitro* de oócitos provenientes desses folículos (Lunardi et al., 2017). No entanto, a taxa de sucesso, ou seja, de oócitos maduros ainda é muito baixa (20%), o que pode ser uma ineficiência do próprio sistema de cultivo *in vitro* para folículos pré-antrais, aliado aos danos causados aos folículos durante a criopreservação do tecido ovariano.

Visando otimizar os resultados pós-criopreservação, nossa equipe tem tentado diferentes abordagens, dentre elas, a redução de danos causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS) mediante a adição de antioxidantes à solução de vitrificação. Recentemente, Silva et al. (2018) mostraram que a adição de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ do ácido alfa-lipóico (ALA) na solução de vitrificação de tecido ovariano ovino foi capaz de reduzir os níveis de ROS e causou menores danos ao DNA dos folículos pré-antrais. Uma outra abordagem envolveu a adição de antioxidantes naturais (anetol e robinina) na solução de vitrificação, na qual observou-se que o anetol (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) conservou a morfologia folicular, enquanto a adição de robinina (0,125 mg/mL) resultou em uma capacidade antioxidante total maior do que aquela observada no ovário vitrificado na ausência dos antioxidantes testados (Morais, 2018).

Em caprinos, o progresso obtido a partir de estudos com criopreservação de tecido ovariano tem sido mais modesto. Testando pela primeira vez protocolos de vitrificação para tecido ovariano caprino, Santos et al. (2007b) constataram que a viabilidade de folículos pré-antrais caprinos é melhor conservada após vitrificação por superfície sólida, usando etilenoglicol e sacarose como agentes crioprotetores. Um estudo realizado por nossa equipe, em 2018, demonstrou o desenvolvimento folicular após autotransplante de tecido ovariano vitrificado (Donfack et al., 2018). Nesse estudo foi utilizado o dispositivo para a vitrificação denominado *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC), desenvolvido e testado pela primeira vez por Carvalho et al. (2013). Esse dispositivo mostrou ser efetivo para a conservação da sobrevivência folicular avaliada em termos de ultraestrutura, fragmentação de DNA e detecção de danos ao DNA (Faustino et al., 2015). Também com o objetivo de otimizar os resultados obtidos após a vitrificação de ovário caprino, outro estudo conduzido por nossa equipe relatou a adição de polímero sintético (SuperCool X1000), como agente crioprotetor extracelular. Nesse estudo, foram observadas taxas de folículos morfológicamente normais similares entre o controle (tecido fresco ou não vitrificado) e o tecido vitrificado (Vizcarra et al., dados não publicados). Similarmente ao que foi realizado com ovinos, nós associamos a estratégia da vitrificação do tecido ovariano e, em seguida, isolamento dos folículos secundários para cultivo *in vitro*. Após seis dias de cultivo *in vitro*, os folículos secundários obtidos a partir do tecido ovariano vitrificado apresentaram uma taxa de 74% de antro (Leal et al., 2018). Embora tenha sido um estudo preliminar, esse estudo mostrou que folículos pré-antrais foram capazes de sobreviver e crescer *in vitro* após criopreservação do tecido ovariano, revelando que essa estratégia é uma forma viável para o aproveitamento do material genético após a morte de um indivíduo.

Principais resultados da criopreservação de folículos pré-antrais em ovelhas e cabras

Estudos realizados com folículos isolados criopreservados têm obtido resultados que, embora discretos, são bastante encorajadores. Inicialmente, é preciso ressaltar que a criopreservação de folículos isolados apresenta algumas vantagens em relação à criopreservação do tecido ovariano, dentre as quais podemos citar a melhor perfusão de agentes crioprotetores; melhor adaptação de protocolos bem como dos tipos e concentrações de agentes crioprotetores (Amorim et al., 2003a; Amorim et al., 2004; Devireddy et al., 2006); redução do risco de reintrodução de células malignas, uma vez que sua membrana basal os impede de entrar em contato com essas células que podem estar presentes no tecido ovariano no sentido de restaurar a fertilidade de pacientes com câncer (Rodgers et al., 2003).

A primeira criopreservação bem-sucedida de folículos isolados foi realizada em camundongos, quando Carrol et al. (1990) obteve descendentes após o isolamento de folículos seguido de criopreservação, cultivo, maturação e fertilização *in vitro*. Desde então, a criopreservação de folículos isolados tem sido realizada em um número muito maior de espécies animais, incluindo caprinos e ovinos.

Em relação à espécie ovina, um dos primeiros estudos realizado foi o de Amorim et al. (2003b) para avaliar a toxicidade de diferentes concentrações de etilenoglicol (EG) sobre a viabilidade de folículos primordiais após congelação. Nesse estudo, foi observado que folículos primordiais podem se manter viáveis após criopreservação na presença desse crioprotetor, especialmente nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 M. Posteriormente, Santos et al. (2007a) compararam o efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) e do EG sobre esse mesmo parâmetro e observaram que após congelação não houve uma redução no número médio de folículos viáveis, no entanto, esse número reduziu significativamente após 5 dias de cultivo.

Avanços importantes foram obtidos por nossa equipe, relacionado ao desenvolvimento de folículos



secundários após vitrificação na forma isolada ou inclusos no córtex ovariano. Nesse estudo, foi observado que após 6 dias de cultivo, a formação de antro e viabilidade folicular foram semelhantes entre os grupos mencionados (Lunardi et al., 2015). Posteriormente, nós ampliamos o período de cultivo *in vitro* dos folículos para 18 dias. Nesse estudo, nós aumentamos a taxa de recuperação e viabilidade oocitária, além de verificarmos retomada de meiose, após o crescimento de folículos secundários vitrificados (Lunardi et al., 2016). Posteriormente, seguindo a mesma estratégia, nós obtivemos óocitos em metáfase II (Lunardi et al., 2017).

Em relação à espécie caprina, Rodrigues et al. (2005) avaliaram a viabilidade de folículos primordiais isolados, congelados e cultivados por 24 h, período após o qual foi obtida uma taxa de viabilidade folicular acima de 60%. Por outro lado, Santos et al. (2008) avaliaram a influência de vários fatores externos para melhorar a criopreservação de folículos caprinos em estágios iniciais. Nesse estudo, os folículos foram submetidos a um teste de tolerância osmótica na presença de sacarose e EG, seguido de criopreservação pelos métodos de congelamento lento e rápida. Assim, foi observado que na presença dos crioprotetores, associados ou não, os folículos mantiveram altos percentuais (~80%) de viabilidade. Além disso, após 24 h de cultivo, os folículos criopreservados pelo método de congelamento lento mantiveram percentuais de viabilidade (~65%) semelhantes ao observado no controle ou folículos não vitrificados.

Considerações finais

De acordo com o que tem sido observado na literatura, a criopreservação de folículos pré-antrais seguida ou não de cultivo *in vitro* ou transplante representa uma excelente alternativa para a conservação da fertilidade e capacidade reprodutiva de caprinos e ovinos. A associação destas técnicas poderá consolidar-se em uma ferramenta para auxiliar no desenvolvimento de protocolos que poderão ser adotados para a espécie humana, mas, sobretudo, para conservar espécies ou raças de animais ameaçados de extinção ou mesmo de animais geneticamente valiosos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio concedido na forma de bolsa de mestrando e doutorando, bem como, auxílio financeiro. Ana Paula Ribeiro Rodrigues é bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq - Nível 1B (308.071/2016-6).

Referências

- Amorim CA, Rodrigues APR, Rondina D, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertil and Ster*, v.79, p.682-686, 2003a.
- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Costa SHF, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology*, v.60, p.735-742, 2003b.
- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. *Fertil and Ster*, v.8, p.735-740, 2004.
- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v.99, p.223-243, 2007.
- Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin JF, Salle B.** Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod*, v.20, p.2745-2748, 2005.
- 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.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG.** Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Rep and Fertil*, v.90, p.321-327, 1990.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lopes CA, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues AP.** Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science*, v.138, n.3-4, p.220-227, 2013.
- Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A.** Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod*, v.25, p.2239-46, 2010.
- Deanesly R.** Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol*, v.11, p. 197-200, 1954.
- Devireddy R, Amorim C, Leibo S.** Permeability characteristics of ovine primordial follicles calculated with two parameter Kedem-Katchalsky formulation. *Cell Preserv Tech*, v.4, p.188-198, 2006.
- Dinnyes A, Meng, O, Polgar, Z, Boonkuzol, DE, Sonfai, T.** Criopreservação de embrião de mamífero. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.171-90, 2006.
- Donfack NJ, Alves KA, Alves BG, Rocha RMP, Bruno JB, Lima LF, Lobo CH, Santos RR, Domingues SFS,**



- Bertolini M, Smitz J, Rodrigues APR.** In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. *Reprod Fertil Dev.* v.30, p.1055-1065, 2018.
- Donnez J, Dolmans MM, 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.
- Faustino LR, Carvalho AA, Silva CM, Rossetto R, Lopes CA, van Tilburg MF, Carneiro PB, Bão SN, Moura AA, Bordignon V, Figueiredo JR, Rodrigues AP.** Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex. *Reprod Fertil Dev.* v.27, p.440-448, 2015.
- Fisch B, Abir R.** Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction.* v.56, p.11-27, 2018.
- 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.
- Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodriguez B, Diaz C, Sanchezserrano 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.
- 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.
- Leal ESS, Vieira LA, Sá NAR, Silva GM, Lunardi FO, Ferreira ACA, Campello CC, Alves BG, Cibin FWS, Smitz J, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** In vitro growth and development of isolated secondary follicles from vitrified caprine ovarian cortex. *Reprod Fertil Dev.* v.30, p.359-370, 2018.
- 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.
- Lornage J, Courbière B, Mazoyer C, Odagescu V, Baudot A, Bordes A, Poirel MT, Franck M, Salle B.** Ovarian tissue vitrification: cortex and whole ovary in sheep. *Gynecol Obstet Fertil.* v.34, p.746-753, 2006.
- Lunardi FO, Chaves RN, Lima LF, Araújo VR, Brito IR, Souza CEA, Donato MAM, Peixoto CA, Dinnyes A, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues AP.** Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. *Cell Tiss Res.* v.362, p.241-251, 2015.
- Lunardi FO, de Aguiar FLN, Duarte ABG, Araújo VR, de Lima LF, Ribeiro de Sá NA, Vieira Correia HH, Domingues SF, Campello CC, Smitz J, de Figueiredo JR, Ribeiro APR.** Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop in vitro better than those vitrified into the ovarian fragments. *Theriogenology.* v.85, p.1203-1210, 2016.
- Lunardi FO, de Aguiar FLN, Apolloni LB, Duarte ABG, de Sá NAR, Leal ÉSS, Sales AD, Lobo CH, Campello CC, Smitz J, Apgar GA, de Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Sheep Isolated Secondary Follicles Are Able to Produce Metaphase II Oocytes After Vitrification and Long-Term In Vitro Growth. *Biopreserv Biobank.* v.15, p.321-331, 2017.
- Mariante, AS, Albuquerque MSM, Ramos AF.** Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v. 35, p. 64-68, 2011.
- Massardier J, Courbiere, B., Lornage, J., Mazoyer, C., Poirel, M.T., Martinot, S., Franck, M., Salle, B.** Technical Aspects of Laparoscopic Ovarian Autograft in Ewes After Cryopreservation by Slow-Cooling Protocol. *Reprod Domest Anim.* v.45, p.8-12, 2010.
- McGee EA, Hsueh, A.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* v. 21, p.200-214, 2000.
- Morais, MLGS.** Efeitos da suplementação de anetol ou robinina na vitrificação e incubação in vitro do tecido ovariano ovino. 69f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Morfofuncionais, Mestrado Acadêmico em Ciências Morfofuncionais, Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, 2018.
- Morrell JM, Mayer I.** Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote.* v.25, p.545-557, 2017.
- Mullen SF, Critser JK.** The science of cryobiology. *Cancer Treat Res.* v.138, p.83-109, 2007.
- Nugent D, Meirrow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG.** Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update.* v.3, p.267-280, 1997.
- 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.
- Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B.** Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet.* v.26, p.347-354, 2009.
- Rodgers R, Irving-Rodgers H, Russell D.** Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction.* v.126(4), p.415-424, 2003.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Santos RR, Lucci CM, Nunes JF, Figueiredo JR.** Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Ruminant Research.* v.56, p.103-111, 2005.



- Santos DO, Rêgo, JPA, Villela, LCV, Silva, FLR, Facó, O.** BGCON - Banco de Germoplasma de Caprinos e Ovinos Naturalizados: uma alternativa para inventariar a infra-estrutura dos recursos genéticos existentes. Embrapa Caprinos e Ovinos, Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2008. Disponível: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/526505>.
- Santos RR, van Haefen T, Roelen BAJ, Knijn HM, Colenbrander B, Gadella BM, van den Hurk R.** Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles. *Cell Tissue Res*, v.333, p.323-331, 2008.
- Santos RR, van den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR.** Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Rep Sci*, v.99, p.53-64, 2007a.
- Santos RR, Tharasanit T, Van Haefen T, Figueiredo JR, Silva JR, Van den Hurk R.** Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*, v.327, p.167-176, 2007b.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- Silva LM, Mbemya GT, Guerreiro DD, Brito DCC, Donfack NJ, Morais MLGS, Rodrigues GQ, Bruno JB, Rocha RMP, Alves BG, Apgar GA, Cibin FWS, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution of Ovine Ovarian Tissue. *Biopreserv Biobank*. v.16, p.258-269, 2018.
- 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.
- Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH.** The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fertil*, v.89, p.253-259, 1990.
- 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.
- Woelders H, Chaveiro A.** Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, v.49, p.258-271, 2004.
- Woelders H, Windig J, Hiemstra SJ.** How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.264-273, 2012.
- Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM.** Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril*, v.83, p.1248-1254. 2005.
-