



Avanços na criopreservação e subsequente cultivo *in vitro* de tecido ovariano e testicular de pequenos ruminantes

Ana Paula Ribeiro Rodrigues*, Bianca Régia Silva, Everton Pimentel Ferreira, Gildas Mbemba, Lucy Vanessa Sulca Nãupas

Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Pre-Antral Follicles, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Foliculos Pré-Antrais (LAMOFOPA). Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Silas Munguba 1700, Campus do Itaperi. Fortaleza – CE – Brasil
CEP: 60740 903 Tel.: +55.85. 3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

Abstract

The in vitro culture of cryopreserved ovarian tissue (OT) and testicular tissue (TT) is one of the biggest challenges in reproductive medicine. This biotechnology aims to complete the in vitro development of primordial follicles and spermatogonia in the OT and TT, respectively, to obtain fertilizable oocytes and competent sperm for subsequent in vitro fertilization and the production of transferable embryos, with successful results only in mice. In goats and sheep, the cryopreservation of ovarian tissue (COT) and testicular tissue (CTT) with subsequent in vitro culture is still considered experimental. Although the success of COT in these species has already been demonstrated, it gives us hope for the use of this technology. Thus, in recent years, all our efforts have been focused on improving the culture system for vitrified OT with encouraging results regarding follicular development and survival, but there are no reports of successful production of competent oocytes, let alone healthy births. However, the cryopreservation and in vitro culture of TT from adult and pre-pubertal small ruminants are recent studies, and there are significant gaps in knowledge about the cellular and molecular consequences after thawing/warming and in vitro culture, although the results show a promising future.

Keywords: pre-antral follicles, spermatogonia, vitrification, freezing, goat, sheep

Resumo

O cultivo *in vitro* de tecido ovariano (TO) e tecido testicular (TT) criopreservado é um dos maiores desafios na medicina reprodutiva. Esta biotécnica visa o desenvolvimento *in vitro* completo de foliculos primordiais e espermatogônias inclusos no TO e TT respectivamente, com o objetivo de obter oócitos fertilizáveis e espermatozoides competentes para posterior fertilização *in vitro* e obtenção de embriões transferíveis, com resultados bem-sucedidos apenas em camundongos. Em caprinos e ovinos, a criopreservação de tecido ovariano (CTO) tecido e testicular (CTT) com posterior cultivo *in vitro* ainda são consideradas experimentais. Embora o sucesso da criopreservação de TO nessas espécies já foi evidenciado, o que nos dá esperança para o uso dessa tecnologia. Com isso, nos últimos anos todos nossos esforços foram voltados para melhorar o sistema de cultivo do TO vitrificado, com resultados encorajadores com relação a desenvolvimento e sobrevivência folicular, mas não há relatos de uma produção bem-sucedida de oócitos competentes, muito menos de nascimento saudável. No entanto, a criopreservação e cultivo *in vitro* de TT de pequenos ruminantes adultos e pré-puberes são estudos recentes, e apresenta grandes lacunas de conhecimento sobre as consequências celulares e moleculares após o descongelamento/aquecimento e cultivo *in vitro*, no entanto apresenta resultados que vislumbram um futuro promissor.

Palavras-chave: foliculos pré-antrais, espermatogônias, vitrificação, congelamento, caprino, ovino

Introdução

A conservação do material genético é de extrema importância para a manutenção da biodiversidade (Machado et al., 2016). O estabelecimento de bancos de germoplasma de tecido gonadal de fêmeas e machos é considerado uma excelente alternativa para a conservação de espécies que apresentam genótipos valiosos de interesse zootécnico, além de ser útil para a conservação do material genético de

espécies endêmicas que se encontram em situação de vulnerabilidade ou em risco extinção (Silva et al., 2022). A CTO, desde a primeira vez que foi proposta por Deansely et al. em 1954, vem sendo estudada a mais de sete décadas. Os resultados em humanos são promissores, com mais de 200 nascimentos partir de TO congelado (Dolmans et al., 2020) e seis nascimentos a partir de TO vitrificado (Kawamura et al., 2013; Suzuki et al., 2015; Silber et al., 2022) após transplante. Em pequenos ruminantes, os estudos pioneiros de congelamento e transplante de TO foram realizados por Gosden e colaboradores (1994) e Baird e colaboradores (1999). Desde então vários nascimentos já foram reportados em ovinos, após transplante de hemiovário ou ovário inteiro congelado (Imhof et al., 2006; Salle et al., 2002; Salle et al., 2003; Campbell et al., 2014; Torres et al., 2016). Também após transplante de TO vitrificado (Bordes et al., 2008; Lornage et al., 2006). Diferente da criopreservação de TO a criopreservação de TT conta com apenas duas décadas desde a realização do primeiro trabalho (Bahadur et al., 2000). Apesar disso, avanços altamente significativos foram obtidos após congelamento em coelhos (Shinohara et al., 2002) e primatas (Faiomy et al., 2019) e vitrificação em suínos (Kaneko et al., 2013), com nascimentos a partir de espermatozoides recuperados após enxerto dos mesmos.

Apesar desses resultados, a utilização de transplante como um método de restauração da fertilidade em espécies de produção, como os ovino e caprino, apresenta um sério inconveniente que é a dificuldade em manter os animais em um regime de imunossupressão para evitar problemas de rejeição, além de ser uma técnica extremamente invasiva que exige cuidados pós-operatórios especializados (Diehl et al., 2017). Adicionalmente, mesmo que seja um animal de grande valor, a relação custo/benefício não é vantajosa, uma vez que pequenos produtores geralmente não dispõem desses animais nem dos recursos e infraestrutura necessários para a execução desta técnica.

Diante disso, diversos grupos de pesquisa vêm direcionando suas linhas de atuação para o aperfeiçoamento do cultivo *in vitro* de fragmentos gonadais criopreservados, uma vez que permite a manipulação do material biológico em ambiente controlado e torná-lo propício ao seu desenvolvimento (Fathi et al., 2017; Higuchi et al., 2015; Kubilin & Malonina., 2021). O cultivo *in vitro* de TO criopreservado já teve nascimento de crias saudáveis em espécies murinas (Hasegawa et al., 2006; Wang et al., 2011). No caso do tecido testicular, embora não tenha nascimentos, Sato e colaboradores (2011) alcançaram resultados inéditos após criopreservação de fragmentos do parênquima testicular em murinos, possibilitando a manutenção das espermatogônias e a retomada da espermatogênese completa, obtendo espermatozoides viáveis. Entretanto, em animais de produção, o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* eficaz que possibilite o desenvolvimento oocitário e a espermatogênese completo ainda configura-se um desafio a ser alcançado (Ñaupas et al., 2024; Gomes et al., 2023).

Nas últimas duas décadas, a equipe LAMOFOPA tem se centrado no estudo de estratégias para melhorar a criopreservação de TO ovino e caprino utilizando o método da vitrificação, obtendo um protocolo estabelecido com uma taxa de ~97 % de folículos morfologicamente normais após aquecimento do TO ovino (Ñaupas et al., 2024). Recentemente o foco dos estudos são centrados no melhoramento dos sistemas cultivo *in vitro* de TO vitrificado, mediante a adição de antioxidantes ao meio de cultivo para controlar o estresse oxidativo. Além disso, tem apostado na utilização de células tronco mesenquimais, aproveitando os fatores liberados por elas para enriquecer a composição dos meios de cultivo com a finalidade de aprimorar as taxas de folículos primários e secundários normais. Também, desde 2020, foram iniciados alguns trabalhos com TT em caprinos e ovinos, adultos e pré-púberes, testando protocolos de transporte, criopreservação e cultivo *in vitro*. Assim o objetivo desta revisão será apresentar os avanços da criopreservação e cultivo *in vitro* de TO e TT em pequenos ruminantes.

Criopreservação e restauração das células germinativas imaturas de machos e fêmeas

A CTO e CTT são procedimentos que revolucionaram as técnicas de reprodução animal, que anteriormente estavam centradas apenas na criopreservação de oócitos e espermatozoides. Ambas as técnicas podem ser aplicadas em animais adultos e representam as únicas opções de preservação da fertilidade para animais pré-púberes, que ainda não produzem oócitos ou espermatozoides maduros (Shaw et al., 2000; Silva et al., 2010). Além disso, esses procedimentos podem ser realizados tanto em animais vivos quanto *post-mortem* (Silva et al., 2020).

Uma vantagem estrutural da CTO é a presença de numerosos folículos pré-antrais, que representam cerca de 90% da população folicular. Esses folículos constituem uma valiosa fonte de oócitos em potencial, com capacidade para maturação e fertilização futura (Figueiredo et al., 2008). Também a maior percentagem de folículos pré-antrais é composta por folículos primordiais, que são inativos e de tamanho pequeno, o que os torna menos sensíveis à criolesão e aos efeitos tóxicos dos crioprotetores (Telfer

e Andersen, 2021; Bozkurt, 2018). No caso dos machos, o tecido testicular é composto principalmente pelo parênquima testicular, que contém os túbulos seminíferos, onde se localizam as espermatogônias, células precursoras dos espermatozoides. Esta característica garante a produção contínua e ilimitada de espermatozoides (Gomes *et al.*, 2023).

O cultivo *in vitro* de TO e TT pode ser realizado utilizando sistemas de cultivo 2D, nos quais os tecidos são colocados diretamente em placas de cultivo ou sobre uma matriz extracelular (MEC), ou em sistemas 3D, onde os tecidos estão inclusos nessa MEC (Céliz *et al.*, 2023; Kong *et al.*, 2025). Além disso, no TO, existe o cultivo *in vitro* em múltiplas etapas, no qual os folículos primordiais, de transição e primários, inicialmente inclusos no córtex ovariano, se desenvolvem até o estágio secundário. Posteriormente, são isolados do tecido e cultivados individualmente até o estágio antral (McLaughlin *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021). O cultivo *in situ* de folículos pré-antrais permite o contato direto com o estroma ovariano, o que contribui para a manutenção da integridade e da estrutura tridimensional dos folículos (Scott *et al.*, 2004). O estroma e a matriz extracelular desempenham um papel crucial, especialmente na ativação dos folículos primordiais, um processo mediado por vias de sinalização que alcançam os folículos através da microvascularização presente no córtex ovariano (Monniaux *et al.*, 2016; Kinnear *et al.*, 2020). Esse tipo de cultivo facilita a comunicação contínua com as células vizinhas, por meio de sinalização bidirecional autócrina e parácrina, essencial para o desenvolvimento folicular (Monniaux *et al.*, 2019). Por outro lado, o cultivo *in situ* de túbulos seminíferos permite o contato direto com a região intertubular, que fornece proteção e é onde os hormônios masculinos são produzidos. Além disso, células com diferentes funções podem ser encontradas no parênquima testicular, como as células de Sertoli e de Leydig, que estão envolvidas no controle da maturação e migração das células germinativas e na produção de hormônios, respectivamente (Lima *et al.*, 2017). A finalidade do cultivo *in vitro* de TO criopreservado é a obtenção de oócitos viáveis para fertilização *in vitro* e subsequente geração de embriões. No caso do cultivo de TT, o objetivo é obter espermatozoides a partir do cultivo *in vitro* das células indiferenciadas, que podem ser utilizadas posteriormente em técnicas de reprodução assistida, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ou mesmo a injeção de espermátides redondas (ROSI) (Vloeberghs *et al.*, 2013).

Principais resultados da criopreservação e cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano em ovelhas e cabras

Embora o nascimento de camundongos após cultivo *in vitro* de TO tenha sido alcançado há mais de 20 anos (Hasegawa *et al.*, 2006), o entusiasmo inicial dos cientistas foi atenuado pelas enormes dificuldades em replicar esses procedimentos em grandes mamíferos e humanos. Diversas diferenças anatômicas e funcionais dificultam a tradução dos resultados obtidos em camundongos para outras espécies, incluindo a duração da foliculogênese, que é de aproximadamente 20 dias em camundongos, mas ultrapassa 180 dias em humanos e bovinos (Pedersen, 1970; Lussier *et al.*, 1987; Gougeon, 1996). Além disso, há discrepâncias na idade do material biológico inicial (ovários recém-nascidos em camundongos *versus* ovários adultos em humanos), no tamanho dos folículos em desenvolvimento e na consistência mecânica do TO. Apesar disso, em grandes espécies como bovinos (Shahsavari *et al.*, 2019), cervídeos (Gastal *et al.*, 2018) e humanos (Xiao *et al.*, 2013) já foram realizados trabalhos com resultados animadores. Em pequenos ruminantes, que é o foco da nossa revisão, os avanços mais significativos foram relatados por Lunardi *et al.* (2017), que obtiveram oócitos em metáfase II após o cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados de TO vitrificado. Em caprinos, Leal *et al.* (2018) demonstraram que, após o aquecimento do TO vitrificado, os folículos secundários isolados e cultivados por seis dias apresentaram uma taxa de 74% de formação de antro.

Os primeiros estudos conduzidos por nossa equipe em pequenos ruminantes utilizaram o cultivo *in vitro* como método para avaliar a eficiência dos protocolos de criopreservação de TO. Entre eles, destacam-se os trabalhos de Rodrigues *et al.* (2006), em TO caprino, e de Santos *et al.* (2007a), em ovinos, que analisaram o efeito de dois crioprotetores, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) — durante a congelamento lenta, seguida de cultivo *in vitro* por cinco dias. Ambos os estudos demonstraram resultados encorajadores, especialmente em relação à viabilidade folicular após 24 horas de cultivo. Anos depois, os esforços passaram a se concentrar especificamente na vitrificação, um método de criopreservação caracterizado por sua simplicidade e baixo custo. Essas características tornaram a técnica particularmente atraente para aplicação em animais de interesse pecuário e em espécies selvagens (Fujihara *et al.*, 2019).

Em 2011, Carvalho e colaboradores testaram, pela primeira vez, diversas técnicas de vitrificação para a criopreservação de TO caprino, incluindo vitrificação convencional (CV), palhetas, vitrificação em microtubos (MTV) e vitrificação de superfície sólida (SSV), além de diferentes soluções crioprotetoras. Os

resultados indicaram que o método SSV, utilizando 0,25 M de sacarose e 10% de SFB, preservou uma porcentagem de folículos morfolologicamente normais (76,0%) semelhante à observada em fragmentos cultivados sem vitrificação (83,2%) após 24 horas de cultivo *in vitro*. Em 2014, a mesma equipe desenvolveu um novo dispositivo para a vitrificação de ovários sem contato direto com o nitrogênio líquido: o *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC). Um sistema cilíndrico de aço inoxidável, composto por três partes (base, inserto e tampa), que pode ser hermeticamente fechado, impedindo o contato direto do tecido com o nitrogênio líquido. Além de permitir a criopreservação de um ovário inteiro, hemiovário ou um grande número de fragmentos ovarianos. Os testes com esse dispositivo mostraram taxas de sobrevivência folicular de 36,1%, 22,3% e 18,4% após 48 horas de cultivo *in vitro* para fragmentos ovarianos caprinos vitrificados como fragmento, hemiovário e ovário inteiro respectivamente (Carvalho *et al.*, 2014a). Após esses achados, Bandeira *et al.* (2015) compararam o desempenho do OTC com o método convencional de SSV após sete dias de cultivo *in vitro*. O TO vitrificado com o OTC apresentou maior porcentagem de folículos morfolologicamente normais (30,7%) e viáveis (60,0%) em comparação com a técnica SSV (21,3% e 23,0%, respectivamente). Além disso, o OTC manteve melhor a integridade dos componentes da matriz extracelular do ovário ovino. Com base nesses resultados, os autores concluíram que o OTC é o dispositivo mais recomendado para a vitrificação de TO.

Com o objetivo de otimizar as taxas de sobrevivência folicular após a vitrificação utilizando o OTC, nossa equipe tem explorado diferentes abordagens, incluindo a redução dos danos causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) por meio da adição de antioxidantes à solução de vitrificação ou à lavagem durante o aquecimento. Nesse contexto, Carvalho *et al.* (2014b) foram os primeiros a testar a adição de catalase (20 UI/mL) na solução de vitrificação ou lavagem de TO caprino. Embora não tenha sido observada diferença significativa na morfologia folicular ou na fragmentação do DNA entre os grupos vitrificados com ou sem catalase, os níveis de EROs foram mais elevados no grupo vitrificado sem catalase em comparação ao controle. Esses achados destacam a importância do uso de antioxidantes externos para minimizar os efeitos do estresse oxidativo. Dando continuidade a esses estudos, Silva *et al.* (2018) avaliaram diferentes concentrações de catalase (10, 20 ou 40 UI) e um novo antioxidante, o ácido alfa-lipóico (ALA; 25, 50 ou 100 μ M), após 24 horas de incubação. Os resultados demonstraram que a porcentagem de folículos em desenvolvimento foi maior no grupo tratado com ALA 100 μ M do que nos grupos tratados com catalase (40 UI) ou ALA em concentrações de 25 ou 50 μ M. Além disso, a concentração de 100 μ M de ALA reduziu os níveis de EROs no meio de cultivo, preservou a morfologia folicular e a atividade mitocondrial, além de proteger os folículos contra danos ao DNA.

Além disso, foram conduzidos estudos para avaliar o efeito de novos antioxidantes naturais, como o anetol (30, 300 e 2000 μ g/mL) e a robinina (0,125, 0,25 e 0,50 mg/mL), adicionados à solução de vitrificação, seguidos de uma incubação de 24 horas. Os resultados indicaram que o anetol (2000 μ g/mL) foi capaz de preservar a morfologia folicular, enquanto a adição de robinina (0,125 mg/mL) resultou em uma maior capacidade antioxidante total em comparação com os ovários vitrificados sem antioxidantes (Dos Santos Moraes *et al.*, 2019). Também foram exploradas estratégias para reduzir as altas concentrações de crioprotetores utilizadas durante a vitrificação, uma das principais causas do estresse oxidativo. Para isso, foram testados polímeros sintéticos, incluindo SuperCool X-1000 (0,2%), SuperCool Z-1000 (0,4%) e polivinilpirrolidona K-12 (PVP, 0,2%), adicionados à solução de vitrificação. Os resultados demonstraram que o SuperCool X-1000 apresentou os melhores efeitos na vitrificação do TO caprino (Vizcarra *et al.*, 2020).

Após os efeitos positivos demonstrados pelo ácido alfa-lipóico (ALA), Ñaupas e colaboradores investigaram concentrações mais elevadas desse antioxidante (100 μ M e 150 μ M) na solução de vitrificação de TO ovino, seguido de cultivo *in vitro* prolongado por sete dias, xenotransplante e autotransplante por 15 dias (Ñaupas *et al.*, 2021; Ñaupas *et al.*, 2022). Os resultados indicaram que a adição de ALA 150 μ M preservou melhor a densidade das células estromais, favorecendo a proliferação de células da granulosa e a neovascularização. Além disso, foi observado que, independentemente da concentração de ALA utilizada, o cultivo *in vitro* apresentou melhores taxas de normalidade folicular (~58 %) em comparação com os tecidos transplantados (~31%) ou xenotransplantados (~38 %). Resultados semelhantes foram relatados previamente por Donfack *et al.* (2018), que compararam TO caprino fresco e vitrificado após autotransplante por 90 dias e cultivo *in vitro* por sete dias. O estudo concluiu que o transplante induziu uma maior perda folicular em relação ao cultivo *in vitro* (Donfack *et al.*, 2018a), evidenciando que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no TO pode ser uma alternativa promissora para o transplante. Na busca por um entendimento mais aprofundado dos efeitos do cultivo *in vitro*, a mesma equipe avaliou a distribuição das conexinas 37 e 43 (Cx37 e Cx43) e do fator SDF-1 α após sete dias de cultivo *in vitro* de TO caprino vitrificado. Os resultados indicaram que a sobrevivência folicular, bem como a expressão de

SDF-1 α e Cx43, não foram alteradas pelo cultivo. No entanto, a expressão de Cx37 sofreu modificações após o cultivo *in vitro* do tecido vitrificado (Donfack *et al.*, 2018b).

Dado o complexo sistema regulatório do desenvolvimento folicular e sua dinamicidade, os estudos subsequentes concentraram-se no aprimoramento do cultivo *in vitro*. Sabe-se que esse processo pode ser influenciado por fatores extrínsecos, como o ambiente artificial, manipulação sob luz excessiva, níveis inadequados de oxigênio e temperatura (Agarwal *et al.*, 2014; Del Valle *et al.*, 2022). Esses fatores externos podem gerar um desequilíbrio na homeostase celular, resultando na produção excessiva de EROs que, por sua vez, causam danos ao DNA, RNA, mitocôndrias, proteínas e lipídios (Rizzo *et al.*, 2012; Barrozo *et al.*, 2021). Tais alterações podem comprometer a esteroidogênese, a qualidade e a maturação oocitária, além de acelerar o envelhecimento das células ovarianas (Dos Santos Silva *et al.*, 2023). Esses efeitos deletérios tendem a ser ainda mais acentuados quando o TO é previamente submetido à criopreservação, aumentando a produção de EROs (Eivazkhani *et al.*, 2022). Com isso em mente, em 2024, Ñaupas e colaboradores investigaram o efeito da adição de ácido alfa-lipóico (ALA) ao meio de cultivo *in vitro* de TO ovino, tanto fresco quanto vitrificado/aquecido, durante um período de 14 dias. Foram avaliadas duas abordagens: a adição constante de ALA (100 μ M ao longo dos 14 dias) e a adição dinâmica (50 μ M nos dias 0–7 e 100 μ M nos dias 8–14). Os resultados demonstraram que a presença de ALA no meio de cultivo do TO vitrificado foi essencial para reduzir os danos que levam à perda da função ovariana, resultando em melhores taxas de preservação da morfologia folicular (84–87%). Além disso, foi observado que, para garantir uma esteroidogênese eficiente durante o cultivo *in vitro*, a suplementação de ALA pode ser dinâmica, ajustando suas concentrações ao longo do período de cultivo.

Finalmente é sabido que a foliculogênese é regulada por uma complexa rede de fatores parácrinos, endócrinos e autócrinos, além de interações célula-célula e célula-estroma, que o cultivo *in vitro* não consegue mimetizar completamente (Hosseini *et al.*, 2020). Nesse contexto, a criação de um ambiente *in vitro* equilibrado, enriquecido com fatores de crescimento e substâncias mitogênicas, é essencial para promover a ativação, manter a viabilidade e garantir o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos no córtex ovariano (Ghezelayagh *et al.*, 2022). Com isso em mente, o estudo mais recente realizado por nossa equipe investigou o co-cultivo de fragmentos ovarianos, frescos ou vitrificados, com células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton (MSCsW) por um período de 14 dias. As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm se mostrado uma estratégia promissora devido aos seus efeitos parácrinos (Li *et al.*, 2017) e à capacidade de secretar fatores bioativos, citocinas, moléculas tróficas e agentes antiapoptóticos (Stanko *et al.*, 2014). Os resultados indicaram que o co-cultivo de TO criopreservados com MSCsW preservou a morfologia folicular em aproximadamente 80% dos casos, além de promover um desenvolvimento folicular significativo (~90%), com a presença de uma percentagem animadora de folículos primários e alguns folículos antrais iniciais. Além disso, a exposição ao microambiente enriquecido com MSCsW demonstrou uma alta capacidade de diferenciação dessas células em linhagens germinativas, consolidando-se como uma abordagem promissora para estudos futuros relacionados à ovogênese e foliculogênese *in vitro* (Ñaupas *et al.*, 2025- dados não publicados).

Principais resultados da criopreservação e cultivo *in vitro* de tecido testicular ovino e caprino

Ao contrário da criopreservação do TO, a criopreservação do tecido testicular (CTT) seguida do cultivo *in vitro* (CIV) ainda é pouco explorada, especialmente em ruminantes. Na década de 1990, a CTT emergiu como uma alternativa proposta para o tratamento de pacientes com azoospermia, uma vez que possibilita o armazenamento de espermatozoides em quantidade suficiente para múltiplos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Os primeiros protocolos de CTT tinham como objetivo preservar os estágios mais avançados da espermatogênese, como os espermátócitos e espermatozoides em maturação, utilizando um meio de congelamento que incluía glicerol, um composto amplamente empregado na preservação de espermatozoides na época (Crabbe *et al.*, 1999). Com o avanço das técnicas de criopreservação, a preservação de tecidos testiculares foi expandida para incluir estágios mais precoces, como as células germinativas primordiais. Isso permitiu maior flexibilidade na recuperação da fertilidade em diferentes cenários clínicos, incluindo casos de azoospermia (Pereira *et al.*, 2023). Um marco importante foi o estudo de Brinster e Zimmermann (1994), que demonstraram a viabilidade do transplante de células-tronco espermatogoniais (SSC) criopreservadas nos túbulos seminíferos de camundongos estéreis, sugerindo uma aplicação para indivíduos pré-púberes submetidos a tratamentos contra o câncer.

Nos últimos anos, contudo, houve um aumento significativo nas pesquisas sobre a CTT, com resultados promissores em diversas espécies, incluindo humanos (Baert *et al.*, 2018; Younis *et al.*, 2023),

primatas (Fayomi *et al.*, 2019), murinos (Dumont *et al.*, 2017; Dumont *et al.*, 2023), ratos (Radaelli *et al.*, 2017; Volkova *et al.*, 2018; Benvenuti *et al.*, 2018), suínos (Kaneko *et al.*, 2019), bovinos (Li *et al.*, 2018), ovinos (Bebbere *et al.*, 2019; Pukazhenthil *et al.*, 2015) e caprinos (Patra *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2023). Após a criopreservação, o tecido testicular pode ser transplantado para desenvolvimento *in vivo* ou submetido ao CIV, permitindo a retomada das funções endócrina e gametogênica (Yokonishi *et al.*, 2014; Pothana *et al.*, 2017). Até o momento, os avanços mais significativos foram obtidos em fragmentos testiculares de camundongos neonatais, nos quais a espermatogênese foi mantida por mais de 2 meses após cultivo *in vitro* utilizando o sistema 2D, na interfase gás-líquido. As espermátides e espermatozoides obtidos resultaram em descendentes saudáveis utilizando ICSI e ROSI (Sato *et al.*, 2011).

Apesar dos avanços na CTT e CIV, o sucesso dessas técnicas depende de vários fatores, como o tamanho do tecido (Joaquim *et al.*, 2024), a escolha dos crioprotetores (Silva *et al.*, 2019), o método de criopreservação, seja congelamento lento ou vitrificação (Pukazhenthil *et al.*, 2015), bem como o tipo de sistema de CIV (2D ou 3D) após a criopreservação (Céliz *et al.*, 2023). Em pequenos ruminantes, estudos têm sido realizados com o objetivo de aprimorar a técnica, buscando uma melhor recuperação após a criopreservação e subsequente CIV, para obtenção da espermatogênese *in vitro*.

Em ovinos, Pukazhenthil *et al.* (2015) compararam os métodos de criopreservação, congelamento lento e vitrificação na preservação do tecido testicular e início da espermatogênese pós-xenoinxerto. Os autores reportaram que o congelamento lento de fragmentos de tecido testicular de ovinos pré-púberes foi superior à vitrificação na preservação da integridade e função celular após o xenoinxerto. Outro estudo, também com ovinos pré-púberes, demonstrou que o método de vitrificação com criodispositivo (E.Vit), associado ao CIV, afetou a expressão de marcadores de células testiculares espermatogênicas e somáticas durante o CIV de 24 horas, após o aquecimento (Bebbere *et al.*, 2019). No mesmo ano, Singh e colaboradores (2019) mostraram que a adição da sphingosine-1-phosphate (forma fosforilada da esfingosina derivada da membrana, presente naturalmente na maioria dos tipos celulares) ao meio de cultivo de tecido testicular ovino previamente criopreservado, afetou a expressão de marcadores de proliferação (PCNA, Ki67) e diferenciação (PLZF) celular. Os resultados obtidos neste estudo contribuem de forma substancial para o que tem sido uma base de dados limitada sobre a capacidade de manter a funcionalidade do tecido testicular *in vitro*, após o congelamento e descongelamento. Recentemente, nossa equipe investigou diferentes tipos de sistemas de CIV após a criopreservação por congelamento lento de fragmentos de tecido testicular de ovinos pré-púberes. Foi verificado que o sistema 2D sobre a membrana de agarose foi melhor que o sistema 3D com encapsulamento em agarose, apresentando taxas de proliferação celular e fibras colágenas semelhantes às dos fragmentos frescos (Céliz *et al.*, 2023).

Em caprinos, os resultados estão mais avançados, com obtenção de espermátides alongadas após a vitrificação seguido de CIV por 14 dias de fragmentos de testículos (Patra *et al.*, 2021). Em estudos recentes realizados por nossa equipe, analisando diferentes métodos de criopreservação seguido de CIV de fragmentos de testículos de bodes pré-púberes, foi verificado que os fragmentos cultivados *in vitro*, previamente congelados/descongelados, apresentaram mais alterações morfológicas que os fragmentos frescos (Gomes *et al.*, 2023), demonstrando a necessidade de desenvolvimento de estratégias mais eficientes na retomada funcional do tecido após a criopreservação. Além da busca por métodos de CIV mais eficientes após a criopreservação, também foram conduzidos experimentos visando minimizar os danos celulares durante o processo de preservação, por meio da adição de suplementos antioxidantes. No estudo de Xi *et al.* (2019), a suplementação do meio de criopreservação com 15% de trealose mostrou um efeito protetor no tecido testicular caprino, melhorando a viabilidade celular e preservando a integridade do tecido.

Considerações finais

A criopreservação seguida de cultivo *in vitro* em pequenos ruminantes constitui uma abordagem viável para a restauração da fertilidade e a preservação do material genético, tanto de TO quanto TT. Avanços significativos têm sido registrados, com diferentes abordagens protocolares. No entanto, o sucesso da técnica é influenciado por múltiplos fatores, como o tamanho do fragmento, a escolha de crioprotetores, o método de criopreservação (congelamento lento/vitrificação) e as condições de descongelamento/aquecimento.

Além disso, a retomada da função endócrina e gametogênica do tecido após a criopreservação, por meio do cultivo *in vitro*, ainda requer aprimoramentos. No caso do TT, tanto na etapa de criopreservação quanto na de cultivo, os estudos ainda estão em fases iniciais, sendo necessário mais pesquisas. Já com relação ao TO, resultados significativos foram alcançados com relação à sobrevivência e desenvolvimento folicular após cultivo *in vitro* de TO fresco. No entanto, a retomada da função após a criopreservação ainda



precisa de atenção. A complexidade dos processos envolvidos na retomada da espermatogênese e foliculogênese *in vitro* destaca a necessidade de estudos adicionais para elucidar os fatores celulares e moleculares que regulam a viabilidade e o desenvolvimento dos tecidos gonadais após a criopreservação.

Dessa forma, pesquisas contínuas são essenciais para otimizar os protocolos de criopreservação e cultivo *in vitro*, visando não apenas aumentar as taxas de sobrevivência celular, mas também melhorar a funcionalidade dos tecidos criopreservados. O avanço do conhecimento nessa área pode viabilizar a aplicação dessa tecnologia em diferentes contextos, incluindo a conservação de espécies ameaçadas e o aprimoramento das biotécnicas reprodutivas em sistemas de produção animal.

Referências

- Agarwal A, Durairajanayagam D, Du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence-based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12: 1-19. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>
- Baert Y, Onofre J, Van Saen D, Goossens E. Cryopreservation of Human Testicular Tissue by Isopropyl-Controlled Slow Freezing. *Methods Mol Biol*. 2018; 1748:287-294. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7698-0_20.
- Bahadur G, Chatterjee R, Ralph D. Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues: case report. *Hum Reprod*. 2000;15(6):1416–1420. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.6.1416>
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term Ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts Stored at - 196 °C. *Endocrinology*. 1999;140(1):462-471. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.140.1.6453>
- Bandeira FT, Carvalho AA, Castro SV, Lima LF, Viana DA, Evangelista J, Pereira M, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues A. Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. *Reprod Domest Anim*. 2015; 50(2):177-185. <https://doi.org/10.1111/rda.12463>.
- Barrozo LG, Paulino LR, Silva BR, Barbalho EC, Nascimento DR, Neto MFL, Silva JR. N-acetylcysteine and the control of oxidative stress during *in vitro* ovarian follicle growth, oocyte maturation, embryo development and cryopreservation. *Animal reproduction Science*. 2021; 231:106801. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106801>
- Bebbere D, Pinna S, Nieddu S, Natan D, Arav A, Ledda S. Gene expression analysis of ovine prepubertal testicular tissue vitrified with a novel cryodevice (E.Vit). *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(10):2145-2154. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01559-x>.
- Benvenuti L, Salvador RA, Til D, Senn AP, Tames DR, Amaral NLL, Amaral VLL. Wistar rats immature testicular tissue vitrification and heterotopic grafting. *JBRA Assist Reprod*. 2018 1;22(3):167-173. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180023>.
- Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Guerin JF, Salle B. Normal gestations, and live births after orthotopic autograft of vitrified- warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod*. 2005;20(10):2745-2748. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei155>.
- Bottini AL, Reis VMSFD, Capp E, Silva ISBD, Kliemann LM, Corleta HVE. Ovarian Tissue Culture to Preserve Fertility in Transgender Male Patients after Hormonal Treatment. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2022;44(3):251-257. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742410>.
- Bozkurt Y. Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences Cryopreservation of Preantral Follicles. 10.5772/intechopen.73413(Chapter 5), 2018.
- Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(24):11298-302. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11298>
- 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*. 2014;29(8):1749-63, 2014. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deu144>.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lobo CH, Santos FW, Santos RR, Campello CC, Bordignon V, Figueiredo JR, Rodrigues AP. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. *Res Vet Sci*. 2014; 97(1):140-7. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.006>.
- 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). Anim Reprod Sci. 2013; 138(3-4):220-7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.015>.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Luz HK, Rossetto R, Lopes CA, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues AP, Costa AP.** Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*. 2011 15;76(5):933-41. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.024>.
- Celiz RH, Brito DCC, Novaes MAS, Sá NAR, Naupas LVS, Mbemba TG, Palomino GYQ, Gomes FDR, Fernandes CCL, Silva CVO, Assis Neto AC, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Two- and three-dimensional system in agarose matrix for in vitro culture of testicular fragments of adult sheep. *Small Rum Res*. 2023; 224:106987. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.106987>
- Comizzoli P.** Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J Androl*. 2015;17(4):640-5. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153849>.
- Crabbé E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A.** Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *Int. J. Androl*. 1999; 22(1):43-48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1999.00149.x>.
- Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol*. 1954; 11(2):197-200. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0110197>.
- Del Valle JS, Mancini V, Laverde Garay M, Asseler JD, Fan X, Metzemaekers J, Chuva De Sousa Lopes SM.** Dynamic in vitro culture of cryopreserved-thawed human ovarian cortical tissue using a microfluidics platform does not improve early folliculogenesis. *Frontiers in Endocrinology*. 2002;13: 936765. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.936765>.
- Diehl R, Ferrara F, Müller C, Dreyer AY, Mcleod DD, Fricke S, Boltze J.** Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(2):146-179. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.39>.
- Dolmans MM, Falcon ET, Patrizio P.** Importance of patient selection to analyze in vitro fertilization outcome with transplanted cryopreserved ovarian. Tissue. *Fertil Steril*. 2020;114(2):279-280. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.050>
- Donfack NJ, Alves KA, Alves BG, Rocha RMP, Bruno JB, Bertolini M, Dos Santos RR, Domingues SFS, De Figueiredo JR, Smitz J, Rodrigues APR.** Stroma cell-derived factor 1 and connexins (37 and 43) are preserved after vitrification and in vitro culture of goat ovarian cortex. *Theriogenology*. 2018; 116:83-88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.001>.
- 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*. 2018;30(8), 1055-1065. <https://doi.org/10.1071/RD17315>
- Dos Santos Morais MLG, de Brito DCC, Pinto Y, Mascena Silva L, Montano Vizcarra D, Silva RF, Weber Santos Cibin F, Cabral Campello C, Alves BG, Rocha Araújo V, da Chagas Pinto F, Pessoa ODL, Figueiredo JR, Ribeiro Rodrigues AP.** Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. *Reprod Biol*. 2019;19(3):270-278. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.07.008>.
- Dumont L, Chalmel F, Oblette A, Berby B, Rives A, Duchesne V, Rondanino C, Rives N.** Evaluation of apoptotic- and autophagic-related protein expressions before and after IVM of fresh, slow-frozen and vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Mol Hum Reprod*. 2017;23(11):738-754. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax054>.
- Dumont L, Lopez Maestre H, Chalmel F, Huber L, Rives-Feraille A, Moutard L, Bateux F, Rondanino C, Rives N.** Throughout in vitro first spermatogenic wave: Next-generation sequencing gene expression patterns of fresh and cryopreserved prepubertal mice testicular tissue explants. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1112834. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1112834>.
- Eivazkhani F, Ebrahimi B, Yousefi B, Fatehi R, Fathi R, Akbarinejad V.** Effects of N-acetyl-L-cystein antioxidant on ex vivo culture of vitrified premature mouse ovarian tissue. *Biopreservation and Biobanking*. 2022; 20(4): 331-339. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0147>
- Fathi R, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Eivazkhani F, Akbarpour M, Tahaei LS, Abtahi NS.** Fertility preservation in cancer patients: in vivo and in vitro options. *Cell J*. 2017;19(2):173-83. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4880>
- Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C, Hanna C, Hennebold JD, Dobrinski I, Orwig KE.** Autologous grafting of



- cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*. 2019;363(6433):1314-1319. <https://doi.org/10.1126/science.aav2914>.
- Figueiredo JR, Gonçalves PBD, Freita SVJF.** Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2 ed. Roca, São Paulo, p.408, 2008.
- Figueiredo JR, Rodrigues AP, Silva JR, Santos RR.** Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral follicles. *Reprod Fertil Dev*. 2011; 23(1):40-7. <https://doi.org/10.1071/RD10227>.
- Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M.** Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 3970. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40711-6>.
- Gastal GDA, Aguiar FLN, Alves BG, Alves KA, De Tarso SGS, Ishak GM, et al.** Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. *Theriogenology*. 2017; 15:139-147. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.029>
- Gomes FDR, Nãupas LVS, Palomino GJQ, Celiz RHY, Sá NAR, Novaes MAS, Ferreira ACA, Brito DCC, Freitas VJF, Costa BN, Lucci CM, Fernandes CCL, Rondina D, Figueiredo JR, Tetaping GM, Rodrigues APR.** Definition of protocols for cryopreservation and three- dimensional in vitro culture of prepubertal goat testicular tissue after histomorphological, ultrastructural, and functional analysis. *Theriogenology*. 2023; 211:151-160. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.08.015>.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R.** Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at 196 °C. *Hum Reprod*. 1994;9(4):597–603. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138556>
- Gougeon, A.** Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocr. Rev*. 1996; 17:121–155. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121>.
- 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*. 2006;86(4):1182-1192. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.12.082>
- Higuchi CM, Maeda Y, Horiuchi T, Yamazaki YA.** Simplified method for three-dimensional (3-D) ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. *PLoS One*. 2015; 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143114>.
- Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J.** Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril*. 2006;85(1):1208–1215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.11.030>
- Joaquim GSC, Ygnacio RHC, Tetaping GM, Rodrigues APR, Duarte ABG.** Cryopreservation of bovine testicular tissue. *Ciência Animal*, 2024;34(2):80-92, 2024. <https://orcid.org/0000-0002-2820-8802>
- Kanbar M, Delwiche G, Wyns C.** Fertility preservation for prepubertal boys: are we ready for autologous grafting of cryopreserved immature testicular tissue? *Ann Endocrinol (Paris)*. 2022;83(3):210-217. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2022.04.006>.
- Kaneko H, Kikuchi K, Men NT, Noguchi J.** Embryo production by intracytoplasmic injection of sperm retrieved from Meishan neonatal testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Anim Sci J*. 2019;90(2):158-166. <https://doi.org/10.1111/asj.13138>.
- Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Tanihara F, Ito J, Kashiwazaki N.** Generation of Live Piglets for the First Time Using Sperm Retrieved from Immature Testicular Tissue Cryopreserved and Grafted into Nude Mice. *PLoS ONE*. 2013; 8:1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070989>
- 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, A.J.,** Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 110(43), 17474– 17479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110>
- Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravek M B, Xu M, Padmanabhan V, Shikanov A.** The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction*. 2020; 160(3): 25-39. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0501>
- Kong Q, Todorov P, Pei C, Isachenko E, Rahimi G, Skala C, Groten T, Isachenko V.** Dynamic In Vitro 3D Culture of Cryopreserved Human Ovarian Cells: Transcriptomic Analysis by RNA Sequencing. *Preprints* 2025, 2025032058. <https://doi.org/10.20944/preprints202503.2058.v1>
- Kulibin A, Yu Malolina EA.** The rete testis: development and role in testis function. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021; 52: 370-378. <https://doi.org/10.1134/S1062360421060072>
- Li H, Bian YL, Schreurs N, Zhang XG, Raza SHA, Fang Q, Wang LQ, Hu JH.** Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen- thawed bovine calf testicular tissue. *Reprod Domest Anim*. 2018;53(5):1211-1218. <https://doi.org/10.1111/rda.13228>.



- Lima DBC, Silva LDML.** Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*. 2017; 47: 20170135. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170135>
- Lornage J, Courbière B, Mazoyer C, Odagescu V, Baudot A, Bordes A, Poirel MT, Franck M, Salle B.** Vitrification du tissu ovarien: cortex et ovaire entier chez la brebis [Ovarian tissue vitrification: Cortex and whole ovary in sheep]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006;34(9):746-53. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2006.07.024>
- Lunardi FO, De Aguiar F L, Duarte AB, Araújo VR, De Lima LF, Ribeiro De Sá NA, Vieira Correia HH, Domingues SF, Campello CC, Smitz J, De Figueiredo JR, Ribeiro Rodrigues AP.** Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop in vitro better than those vitrified into the ovarian fragments. *Theriogenology*. 2020; 85: 1203-1210. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.043>
- Lussier JG, Matton, P, Dufour JJ.** Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil*. 1987; 81: 301–307. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810301>
- Machado LC, Oliveira VC, Paraventi MD, Cardoso RN, Martins DS, Ambrosio CE.** Maintenance of Brazilian Biodiversity by germplasm bank. *Pesq Vet Bras*. 2016;36(1):62-66. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000100010>
- McLaughlin, M., Albertini, D. F., Wallace, W. H. B., Anderson, R. A. & Telfer, E. E.** Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol. Hum. Reprod*. 2018; 24:135–142. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay002>
- Monniaux D, Cadoret V, Clément F, Dalbès-Tran R, Elis S, Fabre S, Ma -Illard V, Monget P, Uzbekova S.** Folliculogenesis. In: Huhtaniemi I, Martini L, editors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, vol. 2. Oxford: Academic Press. 2019; 377–98.
- Monniaux, D.** Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*. 2016; 86(1):41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.017>
- Montano Vizcarra DA, Pinto Silva Y, Bezerra Bruno J, Calado Brito DC, Dipaz Berrocal D, Mascena Silva L, Gaudencio Dos Santos Moraes ML, Alves BG, Alves KA, Weber Santos Cibin F, Figueiredo JR, Zelinski MB, Ribeiro Rodrigues AP.** Use of synthetic polymers improves the quality of vitrified caprine preantral follicles in the ovarian tissue. *Acta Histochem*. 2020;122(2):151484. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151484>
- Naupas LVS, Brito DCC, Souza SS, Brandão FAS, Silva RF, Fernandes CCL, Tetaping GM, Alves BG, Silva JYG, Guedes MIF, Rondina D, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Alpha-lipoic acid in ovarian vitrification solution for in vitro culture or autotransplantation as future strategies for the restoration of ovarian function in sheep. *Liv Sci*. 2022; 266:105123. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105123>
- Naupas LVS, Brito DCC, Souza SS, Brandão FAS, Silva RF, Raposo RS, Moreira ACOM, Araújo AA, Alves BG, Guedes MIF, Silva JYG, Cordova A, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Alpha Lipoic Acid Supplementation Improves Ovarian Tissue Vitrification Outcome: An Alternative to Preserve the Ovarian Function of Morada Nova Ewe. *Reprod Sci*. 2021; 28(11):3109-3122. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00593-4>
- Naupas LVS, Gomes FDR, Ferreira ACA, Moraes SM, Alves DR, Teixeira DIA, Alves BG, Watanabe Y, Figueiredo JR, Tetaping GM, Rodrigues APR.** Alpha lipoic acid controls degeneration and ensures follicular development in ovine ovarian tissue cultured in vitro. *Theriogenology*. 2024; 225:55-66. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.05.024>
- Pais AS, Reis S, Laranjo M, Caramelo F, Silva F, Botelho MF, Almeida-Santos T.** The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. *J Ovarian Res*. 2021 Nov 1;14(1):147. <https://doi.org/doi:10.1186/s13048-021-00892-z>
- Patra T, Pathak D, Gupta MK.** Comparison of two culture methods during in vitro
- Pedersen, T.** Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 64, 304–323. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0640304> (1970).
- Pereira AG, Cavalcante YCS, Martins JCN, Silva AR.** Cryopreservation and culture of testicular tissue in mammals - state of the art, challenges and perspectives. *Rev. bras. reprod. anim*, 2023;47(3): 544-553. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2023.056>
- Pothana L, Devi L, Goel S.** Cryopreservation of adult cervid testes. *Cryobiology*. 2017;74:103-109. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.00>
- Pukazhenthil BS, Nagashima J, Travis AJ, Costa GM, Escobar EN, França LR, Wildt DE.** Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123957>



- Radaelli MRM, Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Cerialli PMA, Nassif AE, Gonçalves AJ.** A comparison between a new vitrification protocol and the slow freezing method in the cryopreservation of prepubertal testicular tissue. *JBRA Assist Reprod.* 2017;21(3):188-195. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.2017003>.
- Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci R.** Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47:344–352. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Rodrigues APR, Figueiredo JR, Costa SHF, Santos RRD, Amorim CA, Nunes JF, Rondina D.** In Vitro Culture of Cryopreserved Caprine Ovarian Tissue Pieces and Isolated Follicles. *Cell Preservation Technology.* 2006; 4: 290-298. <https://doi.org/10.1089/cpt.2006.999>
- Salle B, Demirci B, Franck M, Berthollet C, Lornage J.** Long-term followup of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: Pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertil Steril.* 2003; 80: 172–177. <https://doi.org/10.1089/cpt.2006.9998>
- Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J.** Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril.* 2002; 77: 403–408. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)02960-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)02960-0).
- 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 earlystage follicles. *Anim Rep Sci*, v.99, p.53-64, 2007a. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.05.013>
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y, Ogawa T.** In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011;471: 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature09850>.
- Scott J, Carlsson IB, Bavister BD, Hovatta O.** Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(3):287–293. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62143-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62143-8).
- Shahsavari MH, Alves KA, Alves BG, De Lima LF, Vizcarra DAM, Berrocal DJD, Silva LM, Da Silva YP, Zelinski MB, De Figueiredo JR, Moghaddam G, Rodrigues APR.** Impacts of different synthetic polymers on vitrification of ovarian tissue. *Cryobiology.* 2020; 94:66-72. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.04.007>
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 2000;53(1):59-72, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00240-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00240-x)
- Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, & Ogura, A.** Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Human reproduction.* 2002; 17 (12): 3039-3045. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.12.3039>.
- Silber S.** Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(12):1595-1603. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0814-1>
- Silva AM, Pereira AG, Bezerra LGP, Jerônimo MSS, Pereira AF, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Cryopreservation of Testicular Tissue from Adult Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Animals.* 2022;12(6):1-11, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12060738>
- Silva AMD, Pereira AF, Comizzoli P, Silva AR.** Cryopreservation and Culture of Testicular Tissues: An Essential Tool for Biodiversity Preservation. *Biopreserv Biobank.* 2020; 18(3):235-243. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0010>.
- Silva LM, Mbemba GT, Guerreiro DD, Brito DCC, Donfack NJ, Morais MLGS, Rodrigues GQ, Bruno JB, Rocha RMP, Alves BG, Apgar GA, Cibir FWS, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution of Ovine Ovarian Tissue. *Biopreserv Biobank.* 2018; 16(4):258-269. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0122>.
- Singh RP, Escobar E, Wildt D, Patel S, Costa GMJ, Pukazhenth B.** Effect of sphingosine-1- phosphate on cryopreserved sheep testicular explants cultured in vitro. *Theriogenology.* 2019;128:184-192. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.038>.
- Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya, T, Yajima A, Nagura H.** Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 953– 9. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.953>
- Telfer E.E, Andersen CY.** In vitro growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. *Fertil Steril*, v. 115, p. 1116–25, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.004>
- Torre A, Vertu-Ciolino D, Mazoyer C, Selva J, Lornage J, Salle B.** Safeguarding Fertility with Whole Ovary Cryopreservation and Microvascular Transplantation. *Transplantation.* 2016; 100(9):1889–1897. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001296>



- Vloeberghs V, Verheyen, G, Tournaye, H.** Intracytoplasmic spermatid injection and in vitro maturation: fact or fiction? *Clinics*. 2013; 68: 151-156. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(sup01\)17](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(sup01)17)
- Volkova N, Yukhta M, Goltsev A.** Biopolymer gels as a basis of cryoprotective medium for testicular tissue of rats. *Cell Tissue Bank*. 2018;19(4):819-826. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9740-z>.
- Wang X, 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*. 2011;141(2):183–91. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0383>
- Xi H, Ren F, Zhang X, Li Y, Zhang L, Wen F, Feng T, Zhang X, Niu T, Hu J, Wang P.** Trehalose protects testicular tissue of dairy goat upon cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2019; 54(12):1552-1559. <https://doi.org/10.1111/rda.13562>.
- Xiao Z, Wang Y, Li LL, Li SW.** In vitro culture thawed human ovarian tissue: NIV versus slow freezing method. *Cryo Letters*. 2013; 34:520-526. PMID: 24448772
- Xu, F. et al.** Matrix-free 3D culture supports human follicular development from the unilaminar to the antral stage in vitro yielding morphologically normal metaphase II oocytes. *Hum. Reprod*. 2021; 36:1326–1338. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab003>.
- Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T.** Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun*. 2014;5:4320. <https://doi.org/10.1038/ncomms5320>.
- Younis N, Caldeira-Brant AL, Chu T, Abdalla S, Orwig KE.** Human immature testicular tissue organ culture: a step towards fertility preservation and restoration. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 14:1242263. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1242263>.
-