

## AVANÇOS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CABRAS E OVELHAS

[Advances in ovarian tissue cryopreservation in goats and sheep]

Ana Paula Ribeiro Rodrigues<sup>1,\*</sup>, Simone Viera Castro<sup>1</sup>, Franciele Osmarini Lunardi<sup>1</sup>, José Ricardo Figueiredo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA). \*Autor para correspondência. E-mail: anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com.

**RESUMO** - A criopreservação de tecido ovariano, sem dúvidas, tem se tornado, uma prática não apenas complementar as técnicas de reprodução assistida, mas também fundamental para a preservação da fertilidade da fêmea. Isso tem sido observado, especialmente na espécie humana, cuja espécie em uma década de trabalho, já se soma aproximadamente trinta nascimentos de bebês saudáveis oriundos de ovário criopreservado. No entanto, todo o avanço que hoje é estabelecido, muito se deve aos trabalhos pioneiros realizados em animais de animais de produção como os ovinos. Relatos de sucesso após criopreservação e transplante de tecido ovariano no início dos anos 90 impulsionaram importantes equipes a investir esforços e dedicação nessa área, voltados para a reprodução humana, e embora, o sucesso seja evidente, os avanços da criopreservação de tecido ovariano tanto na espécie ovina, como na espécie caprina são ainda bastante limitados. Portanto, o objetivo desse trabalho, é apresentar uma retrospectiva dos principais resultados obtidos com a criopreservação de tecido ovariano nessas duas espécies.

**Palavras-Chave:** congelamento lento; vitrificação; função ovariana; folículo pré-antral.

**ABSTRACT** - Cryopreservation of ovarian tissue, no doubt, has been considered not only as an additional practice to assisted reproductive techniques, but it is fundamental for female fertility preservation. This have been related particularly in humans, whose specie in a decade, it was reported approximately thirty healthy babies born after procedures of cryopreservation and tranplant of ovarian tissue. However, the currently successful is due to hard efforts done in animals farm such as sheep. Reports of success after cryopreservation and transplantation of ovarian tissue in the early 90 stimulated several researchers to invest efforts and dedication in that research field, regarding human reproduction, and although success is evident, advances in cryopreservation of ovarian tissue in sheep and goats are still quite limited. Therefore, the aim of this work is to present a retrospective of the main results obtained with the cryopreservation of ovarian tissue in these two species.

**Keywords:** slow freezing; vitrification; ovarian function; preantral follicle.

### INTRODUÇÃO

Conforme mencionado por Bao et al. (2010), a criopreservação de tecido ovariano preserva as células germinativas por períodos prolongados. Embora pouco conhecida ou difundida no Brasil, essa técnica tem sido realizada em alguns países da Europa não mais simplesmente como uma área de investigação, mas como uma opção viável para a preservação da fertilidade de mulheres jovens com risco de falha ovariana prematura (*premature ovarian failure* - POF) que necessitam submeter-se a tratamentos gonadotóxicos como a quimio e radioterapia. Na Bélgica, por exemplo, a criopreservação de tecido ovariano tem sido

indicada para pacientes jovens com POF desde 1997 (Dolmans et al., 2013). Na Dinamarca, grandes avanços também já foram relatados após a criopreservação de tecido ovariano humano, inclusive duas gestações oriundas de um mesmo transplante (Ernst et al., 2010).

O risco de POF em mulheres submetidas a tratamentos com drogas alquilantes é extremamente elevado variando de 92% (Meirow & Nugent, 2001) a 100% (Teinturier et al., 1998). Portanto, o principal objetivo da criopreservação de tecido ovariano é a restauração da fertilidade após procedimentos de transplante ou até mesmo da aplicação de técnicas de cultivo in vitro de folículos

ovarianos pré-antrais visando o crescimento e maturação completa *in viro* desses folículos, seguidas de fecundação *in vitro* e transferência embrionária.

Essa técnica também pode ser aplicada para animais domésticos de produção com genética superior ou para a conservação de espécies em risco de extinção. A primeira tentativa de criopreservação de tecido ovariano de animais foi realizada no início dos anos 1950 com o objetivo primário de restaurar a função endócrina de ratas ovariectomizadas (Parks & Smith, 1953). Na década seguinte, Parrot et al. (1960) relataram o primeiro nascimento de animais de laboratório a partir do transplante de tecido ovariano criopreservado. Somente três décadas mais tarde foi reportado por Gosden et al. (1994) o primeiro nascimento de animais de produção (ovinos) com aplicação desta técnica. Foram os resultados obtidos por Gosden em ovinos que impulsionaram, não somente outras equipes a obterem resultados satisfatórios nessa mesma espécie (Salle et al., 2002, 2003), bem como na espécie humana (Donnez et al., 2004), como também foram a base para os estudos realizados em nosso laboratório utilizando esta técnica em pequenos ruminantes. Desta forma, o presente trabalho, tem como objetivo apresentar o estado atual da criopreservação de tecido ovariano em caprinos e ovinos.

### **BASES GERAIS DA CRIOPRESERVAÇÃO**

Basicamente, a criopreservação consiste na preservação do material biológico, por tempo indefinido a temperaturas ultrabaixas, para que quando necessário este material seja descongelado e possa prosseguir seu desenvolvimento normal (Rubinsky, 2003; Pegg, 2007). Comumente, as amostras são congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, cuja temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  é conhecida como temperatura criogênica (Rubinsky, 2003). Nessa temperatura todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares estão suspensas, portanto, teoricamente, uma célula ou tecido podem ser mantidos criopreservados indefinidamente (Sheikhi et al., 2011). Porém, as células e tecidos são extremamente sensíveis a baixas temperaturas. Portanto, para que não haja danos letais às células, é necessária a utilização de compostos orgânicos na composição da solução de criopreservação a fim de proteger as células dos danos provocados pela redução da temperatura fisiológica para a criogênica e subsequente, aquecimento. Esses compostos são denominados agentes crioprotetores (ACP) e suas condições de utilização (tipo e concentração) variam de acordo com o tipo celular,

tecido e até mesmo com a espécie animal e método de criopreservação empregado.

A criopreservação pode ser realizada através de dois métodos distintos, isto é, a congelação lenta e a vitrificação. Estes métodos diferem entre si, principalmente, quanto à taxa de redução de temperatura empregada. A congelação lenta é caracterizada por uma redução gradual da temperatura, com o objetivo de reduzir o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido (Sanches, 2009) e uso de baixas concentrações de agente crioprotetor. Além disso, é caracterizada também por uma desidratação celular gradual que evita ou reduz a formação de cristais de gelo. Na vitrificação os fluidos passam do estado líquido diretamente para um estado sólido amorfo denominado vítreo (Yamaki et al., 2002). Para que esta transição ocorra é necessária uma alta viscosidade, alcançada pela elevada concentração de agente crioprotetor, e rápida redução da temperatura (Wowk, 2010).

### **CONGELAÇÃO LENTA**

A congelação lenta é considerada o método convencional de criopreservação e tem sido largamente utilizada para a conservação de tecido ovariano em diferentes espécies. Entretanto, atualmente tem-se verificado também a importância e aplicabilidade da vitrificação para a criopreservação desse tipo de tecido (Santos, 2005). A primeira fase indispensável para o sucesso de qualquer protocolo de criopreservação, independente do método, consiste na exposição da amostra biológica à solução contendo gentes crioprotetores. Nesta primeira etapa os agentes crioprotetores penetram nas células, substituindo parcialmente a água no interior da célula e reduzindo o ponto de fusão (Jain et al., 2006). Na congelação lenta, ocorre a redução gradual da temperatura, na presença de baixas concentrações de ACP, sob o controle de um freezer programável, com o intuito de proporcionar tempo suficiente para uma adequada desidratação da célula ou tecido (Paynter, 2000).

Durante o resfriamento gradual promovido pelo freezer programável, à medida que as células são resfriadas a temperaturas entre  $-5$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ocorre, primeiramente, a formação de gelo no meio extracelular. Com a progressão da redução da temperatura, a quantidade de gelo no meio extracelular aumenta e os solutos concentram-se criando um gradiente osmótico que proporcional uma desidratação adicional (Elmoazzen, 2000). A partir desse estágio, os eventos físicos subsequentes dependem da velocidade de congelação. Se a taxa de congelação for rápida, a formação de cristais de gelo na solução extracelular ocorre de forma mais

rápida do que o efluxo de água das células; a desidratação não ocorre de maneira satisfatória, o citoplasma se torna cada vez mais super-resfriado e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo intracelular, que podem provocar lesões irreversíveis em organelas e membranas (Karlsson; Cravalho; Toner, 1993). De modo contrário, sob baixas taxas de redução de temperatura ocorre uma progressiva desidratação celular, concentrando solutos intracelulares para eliminar o super-resfriamento do citoplasma e manter o potencial químico da água intra e extracelular em equilíbrio. Uma vez que os cristais de gelo são incapazes de atravessar a membrana celular, a nucleação do gelo intracelular é impedida, a água move-se para fora da célula e congela externamente, consequentemente, evitando a formação de cristais de gelo (Friedler; Giudice; Lamb, 1988). Ao final da curva de congelamento, o material biológico deve ser armazenado até o momento de sua descongelamento. Embora temperaturas abaixo de  $-80^{\circ}\text{C}$  sejam geralmente suficientes para a preservação celular por longos períodos, a manutenção da viabilidade celular aumenta com a redução da temperatura de armazenamento (Karlsson; Toner, 1996). Dessa forma, diversos trabalhos utilizam com frequentemente o nitrogênio líquido para estocagem, cuja temperatura é de  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Outra etapa crítica para o sucesso da criopreservação é a descongelamento. Durante essa etapa, o reaquecimento do material congelado pode ocasionar injúrias celulares através do processo de recristalização ou ainda pelo crescimento dos microcristais de gelo que se formaram durante a congelamento, tornando-se macrocristais, os quais levam à ruptura celular. Portanto, recomenda-se que o processo de descongelamento seja suficientemente rápido,  $35-40^{\circ}\text{C}$  (Santos, 2000). Logo após a descongelamento, é necessária a remoção do ACP, que pode ser realizada através de uma ou várias lavagens do material criopreservado (Santos et al., 2008); comumente realiza-se três lavagens, com duração entre 5 a 15 minutos cada uma. O procedimento de remoção do crioprotetor é um fator que pode afetar a sobrevivência celular pós descongelamento, uma vez que ao expor a célula com alta concentração de ACP a um meio com concentração deste agente baixa ou nula, a água tende a penetrar rapidamente na célula, causando aumento de volume ou até mesmo rompimento celular (Fabbri, 2006).

### VITRIFICAÇÃO

A vitrificação é um método de criopreservação alternativo à tradicional congelamento lenta, uma vez que as células são criopreservado sem que haja a

formação de cristais de gelo. Isto se deve à exposição celular, como por exemplo, folículos ovarianos, expostos a concentrações elevadas do agente crioprotetor por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), seguido por resfriamento ultrarrápido em nitrogênio líquido, no qual o material se solidifica durante o resfriamento sem formar cristais de gelo (Vajta et al., 1998; Kagawa et al., 2009).

A alta concentração de agente crioprotetor aumenta a viscosidade da solução que, mesmo submetida a uma redução súbita de temperatura, transforma-se do estado líquido para o estado vítreo. Esta particularidade permite certa mobilidade molecular e uma melhor acomodação das estruturas celulares (Vajta et al., 1998). Até a presente data, inúmeros estudos têm investigado o potencial do método de vitrificação como alternativa à congelamento lenta de tecido ovariano em diferentes espécies animais (Lunardi et al., 2013, Carvalho et al., 2013a). Comparado com o método de congelamento lenta, a vitrificação de fragmentos de tecido ovariano garante maior estabilidade da ultraestrutura tecidual do estroma ovariano (Keros et al., 2009), bem como maior percentual de folículos morfológicamente normais (Isachenko et al., 2003).

### PRINCIPAIS RESULTADOS RELATADOS COM A CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO CAPRINO

A conservação do tecido ovariano, e consequentemente dos folículos pré-antrais nele presente, tem atraído o interesse de clínicos e pesquisadores, considerando que uma eficiente criopreservação do tecido ovariano possibilita um grande avanço para a reprodução assistida animal e humana. O tecido ovariano previamente criopreservado pode ser utilizado em auto e xenotransplante, possibilitando a retomada das funções endócrina e gametogênica (Liu et al., 2008). Além disso, pode ainda ser destinado ao cultivo *in vitro* dos folículos pré-antrais isolados (Gosden et al., 2002), sendo uma alternativa de grande interesse para mulheres acometidas de câncer, evitando, portanto, a reintrodução de células malignas, o que é possível ocorrer após transplante (Amorim et al., 2009). No que concerne aos animais de produção, além do fato destes serem utilizados como modelo animal para determinar protocolos visando a aplicação para humanos, a criopreservação de tecido ovariano também tem uma grande importância, sobretudo para animais domésticos de alto valor genético que venham a óbito de forma inesperada (Shaw et al., 2000), ou até mesmo para os programas de preservação de espécies ou raças ameaçadas de extinção.

Especificamente na espécie caprina, mesmo ainda não tendo sido relatado nascimento de animais após criopreservação de tecido ovariano, já foi demonstrado que folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano podem ser congelados (Rodrigues et al., 2004a,b; Luz et al., 2009) ou vitrificados (Santos et al., 2006b; 2007b), demonstrando grande potencial para a constituição de bancos de germoplasma. Em estudos iniciais, Rodrigues et al. (2004 a, b) demonstraram que o tecido ovariano caprino pode ser congelado utilizando tanto o etilenoglicol (EG) quanto o propanodiol (PROH) ou dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, os protocolos de congelamento foram aperfeiçoados, avaliando a concentração e tempo de exposição mais eficiente para cada agente crioprotetor, sendo determinado a concentração de 1M para os três agentes crioprotetores e período de exposição de 5 minutos para o EG (Faustino et al., 2010) e PROH (Luz et al., 2012) e 10 minutos para o DMSO (Luz et al., 2009). Recentemente, Castro et al. (2011), avaliaram a eficiência destes agentes crioprotetores para o tecido ovariano caprino e demonstraram que o DMSO associado ao soro fetal bovino são mais indicados para congelamento, mantendo a sobrevivência e ultraestrutura após cultivo *in vitro*. Além disso, já foi relatado também a retomada da função ovariana a partir do transplante de tecido ovariano caprino congelado/descongelado (Santos et al., 2009).

Na última década, em função da praticidade, baixo custo e velocidade de execução, a vitrificação tem ganhado grande destaque e se tornou foco em pesquisas envolvendo a criopreservação de células germinativas. Utilizando este método de criopreservação, Santos et al. (2007) mostraram que tanto a vitrificação em palheta convencional, como por superfície sólida, utilizando EG e sacarose na solução de criopreservação, resultaram em um percentual de folículos morfológicamente normais semelhante ao controle não vitrificado. No entanto, a viabilidade folicular foi reduzida após 24 de cultivo *in vitro*. Por outro lado, Carvalho et al. (2011) obtiveram taxas de viabilidade similar ao controle fresco, após o aquecimento de tecido ovariano vitrificado por superfície sólida, porém houve uma redução significativa na viabilidade de folículos submetidos à vitrificação convencional em palhetas ou vitrificação em macrotubos. Estes resultados demonstram que a eficiência da vitrificação é influenciada não apenas pela solução de criopreservação, mas também pela técnica de vitrificação empregada.

No intuito de tornar o procedimento de vitrificação cada vez mais prático e eficiente diversas técnicas têm sido desenvolvidas, como a vitrificação por imersão em agulhas (Wang et al., 2008), criotubos (Hemadi et al., 2009; Isachenko et al., 2006), palhetas (Nagano et al., 2007; Rahimi et al., 2009

Amorim et al., 2011; Carvalho et al., 2011) e grades de microscopia eletrônica (Kim et al., 2010). Recentemente, foi desenvolvido um dispositivo de grande capacidade para o tecido ovariano caprino, denominado *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC – Carvalho et al., 2013a). Este dispositivo confere maior praticidade ao procedimento de vitrificação, tanto durante as etapas de exposição, quanto à remoção dos APCs, além de permitir a vitrificação de hemi-ovários ou mesmo ovários inteiros (Carvalho et al., 2013b).

A vitrificação de fragmentos do córtex ovariano de caprino pela técnica de OTC resultou em manutenção da morfologia (vitrificado: 61,4% versus fresco: 68,8%), viabilidade (vitrificado: 90% versus fresco: 93,3%) (Carvalho et al., 2013b), e ultraestrutura folicular semelhante ao encontrado no tecido ovariano fresco, (Carvalho et al., 2013a), além de não aumentar a fragmentação do DNA do folículo (vitrificado: 6% versus fresco: 8% - Faustino, 2014). Um quarto estudo (dados não publicados) também na espécie caprina utilizando o OTC foi realizado com a finalidade de aperfeiçoar a solução de vitrificação para aumentar as taxas de viabilidade folicular. Para isso, utilizamos a estratégia de adicionar 20 UI/mL de catalase para reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), responsável pela redução da viabilidade celular. Os resultados desse estudo mostraram que o tecido ovariano vitrificado na presença de catalase apresentaram taxas de viabilidade (fresco: 93% versus vitrificado com catalase: 80%) e níveis de ROS (fresco: 34,3 versus vitrificado com catalase: 30,8) similares ao tecido fresco ou não vitrificado. Portanto, essa técnica tem se mostrado bastante promissora para a criopreservação de tecido ovariano caprino, podendo ser extrapolada para outras espécies, inclusive sua aplicação futura para a preservação do tecido ovariano humano, visando o autotransplante ou o cultivo *in vitro* desse material.

#### **PRINCIPAIS RESULTADOS RELATADOS COM A CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO OVINO**

De uma forma geral, os folículos ovarianos ovinos podem ser congelados fora do ambiente ovariano, ou seja, isolados (Amorim et al., 2003) ou inclusos no próprio órgão, seja em fragmentos (Aubard et al., 1999), metades (Salle et al., 2002) ou mesmo no ovário inteiro (Imhof et al., 2006). No que concerne à unidade folicular, estudos preliminares, mostraram que folículos primordiais isolados a partir de ovários ovinos foram criopreservados com sucesso usando o EG. Nesse estudo, os autores obtiveram uma taxa de aproximadamente 22% de sobrevivência folicular, na concentração de 2 M desse agente crioprotetor (Amorim et al., 2003).

Posteriormente em outro estudo, Santos et al. (2007) cultivaram *in vitro* folículos pré-antrais isolados ou inclusos no tecido ovariano após procedimento de congelamento na presença de DMSO ou EG, ambos na concentração de 1,5 M. Embora inferior ao controle ou folículos não congelados, a viabilidade folicular também foi preservada. No ano seguinte, na tentativa de aperfeiçoar o protocolo de congelamento lenta para o tecido ovariano, foram testadas diferentes concentrações e tempo de exposição ao DMSO. Portanto, na concentração de 1 M, e 10 min de exposição, foi possível manter a morfologia (66%) e viabilidade folicular (75%) em taxas aceitáveis (Pinto et al., 2008).

Nessa espécie, resultados encorajadores utilizando transplante de fragmentos do córtex ovariano previamente congelado e descongelado foram obtidos por Gosden et al. (1994). Esses autores relataram a retomada da atividade cíclica e da gestação, obtendo um nascimento depois de autotransplante ortotópico contralateral.

Após este primeiro nascimento, Salle et al. (2002) documentaram um estudo em que metades de ovários oriundas de seis ovelhas foram autotransplantados, resultando em quatro gestações e nascimento de seis cordeiros. As ovelhas que receberam o enxerto de hemiovário, mesmo após o parto, continuaram sendo monitoradas e, após dois anos da realização do transplante, conceberam novamente (Salle et al., 2003). Esses resultados demonstraram que o enxerto de tecido ovariano criopreservado pode restaurar as funções ovarianas, bem como a fertilidade não apenas após curto período, mas também a longo prazo.

Outro estudo de grande destaque na espécie ovina, é o realizado por Almodim e colaboradores (Almodim et al., 2004), os quais preencheram com fragmentos de tecido ovariano congelados e descongelados, com auxílio de agulhas hipodérmicas, o ovário contralateral previamente irradiado. Seis meses após a enxertia as duas ovelhas emprenharam e conceberam cordeiros saudáveis, mostrando que a fertilidade de fêmeas com falência ovariana causada por radioterapia pode ser restaurada.

Com o intuito de avaliar a viabilidade do autotransplante de ovários na sua forma inteira, no momento do procedimento cirúrgico foi realizada a anastomose microvascular do órgão completo após congelamento e descongelamento. De nove ovelhas incluídas no estudo foi relatado o nascimento de um cordeiro saudável (Imhof et al., 2006). Esse resultado demonstrou que a anastomose microvascular de ovários inteiros e transplante

ortotópico após a criopreservação também é tecnicamente viável.

No que concerne ao uso da vitrificação na espécie ovina, pesquisas também já revelaram que folículos ovarianos também podem ser vitrificados isolados de forma individual (Lunardi et al. – dados não publicados), inclusos em fragmentos (Lornage et al., 2006), em metades ovarianas (Bordes et al., 2005) ou mesmo no ovário inteiro (Courbiere et al., 2005).

Em ovelhas o primeiro resultado alentador foi o relato de que o percentual de oócitos maturados *in vitro* após a vitrificação de tecido ovariano foi semelhante ao de oócitos não criopreservados (Al-aghbari; Menino, 2002), resultado bastante promissor para o avanço das pesquisas relacionadas à preservação da fertilidade.

Courbiere e colaboradores (2005) demonstraram pela primeira vez que é possível manter a viabilidade e a morfologia de folículos primordiais após vitrificação de ovários ovinos inteiros, fato que só havia sido demonstrado, até aquele momento, em murinos (Migishima et al., 2003).

Na última década, as pesquisas com criopreservação de tecido ovariano em ovinos progrediram consideravelmente com as publicações de dois casos de sucesso, nos quais nascimentos foram reportados, ambos após autotransplante ortotópico de tecido ovariano.

O primeiro desses dois estudos utilizou seis animais, cujas metades de ovário foram vitrificados, e subsequentemente transplantados. Quatro meses após o transplante foi detectada a retomada da função endócrina dos ovários em todos os animais e, ainda, três dessas ovelhas geraram descendentes após monta natural (Bordes et al., 2005).

O outro estudo foi realizado com o objetivo de investigar a vitrificação de fragmentos ovarianos e ovário inteiro, bem como as propriedades físicas envolvidas na formação de cristais de gelo. Após autotransplante ortotópico de fragmentos do córtex ovariano previamente vitrificados foram obtidas três gestações a partir das quais, quatro cordeiros nasceram a termo e saudáveis (Lornage et al., 2006).

Diversos outros estudos foram realizados com ovários ovinos inteiros vitrificados (Courbiere et al., 2006ab; 2009), dentre esses Baudot et al. (2007) obtiveram taxas de viabilidade e morfologia folicular satisfatórias. Courbiere e colaboradores demonstraram, novamente, que após a vitrificação e transplante de ovários inteiros observa-se o

restabelecimento da produção hormonal (Courbiere et al., 2007).

Todos os resultados descritos acima denotam o quão é promissora a criopreservação de tecido ovariano com a tentativa de salvaguardar o material genético de animais de alto valor comercial e produtivo, bem como de espécies e raças ameaçadas de extinção, visando a perpetuação dos mesmos.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos avanços já alcançados com a criopreservação de tecido ovariano, os estudos na espécie caprina e ovina estão apenas começando, embora tenha sido os resultados dessa última a inspirar e embasar os primeiros casos de sucesso obtidos na espécie humana, como por exemplo, o primeiro nascimento reportado em 2004 (Donnez et al., 2004). Da mesma forma que o nascimento de um cordeiro a partir de um enxerto de tecido ovariano congelado pode estimular vários equipes de pesquisadores a conquistar a capacidade de restauração da fertilidade humana após falha ovariana, investigações do ponto de vista molecular e funcional realizados nessas espécies poderão também ser de grande valia para novas descobertas relacionadas a células germinativas criopreservadas.

Além do grande impacto que a criopreservação de tecido ovariano em caprinos e ovinos pode trazer para a saúde reprodutiva da mulher, o material genético criopreservado poderá ser fundamental para a implantação de bancos de germoplasma, o qual possa garantir a conservação de animais e espécies de grande interesse, seja para o setor produtivo, seja a conservação da biodiversidade animal.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Aghbari, A. M.; Menino, A. R. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*, v. 71, n. 1-2, p. 101-110, 2002.

Almodin, C. G.; Minguetti-Camara, V. C.; Meister, H.; Ceschin, A. P.; Kriger, E.; Ferreira, J. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertility and Sterility*, v. 81, n. 1, p. 160-164, Jan 2004.

Amorim, C. A. David, A., Van Langendonck, A., Dolmans, M. M., And Donnez, J. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fertility and Sterility*, v. 95, p. 1094-1097, 2011.

Amorim, C. A.; Rondina, D.; Rodrigues, A. P. R.; Costa, S. H. F.; Goncalves, P. B. D.; De Figueiredo, J. R.; Giorgetti, A. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 60, n. 4, p. 735-742, 2003.

Bao, R-M., Yamasaka, E., Moniruzzaman, M., Hamawaki, A., Yoshikawa, M., Miyano, T. Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, v. 74, p. 817-827, 2010.

Baudot, A.; Courbiere, B.; Odagescu, V.; Salle, B.; Mazoyer, C.; Massardier, J.; Lornage, J. Towards whole sheep ovary cryopreservation. *Cryobiology*, v. 55, n. 3, p. 236-248, 2007.

Bordes, A.; Lornage, J.; Demirci, B.; Franck, M.; Courbiere, B.; Guerin, J. F.; Salle, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Human Reproduction*, v. 20, n. 10, p. 2745-2748, 2005.

Carvalho Aa, Faustino Lr, Carto Sv, Silva Cmg, Campello Cc, Figueiredo Jr, Rodrigues Apr. Tissue thickness may influence the outcome of vitrification of goat ovarian cortex. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 41, pub 1150, 2013b.

Carvalho Aa, Faustino Lr, Silva Cmg, Castro Sv, Lopes Apl, Santos Rr, Bão Sn, Figueiredo Jr, Rodrigues Apr. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science*, v 138, p. 220-227, 2013a.

Carvalho Aa, Faustino Lr, Silva Cmg, Castro Sv, Luz Hkm, Rossetto R, Lopes Cap, Campello Cc, Figueiredo Jr, Rodrigues Apr, Costa Apr. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology* v. 76, p. 933-941, 2011.

Castro Sv, Carvalho Aa, Silva Cmg, Faustino Lr, Campello Cc, Lucci Cm, Bão Sn, Figueiredo Jr, Rodrigues APR. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and in vitro culture of ovarian tissue. *Cell Tissue Res* v. 346, p. 283-292, 2011.

Courbiere, B.; Baudot, A.; Odagescu, V.; Salle, B.; Mazoyer, C.; Massardier, J.; Lornage, J.; 2006a. Physical experimental studies to improve a vitrification procedure in whole sheep ovaries permeated with cryoprotectant agents. *Human Reproduction*, v. 21, p. 1107-1107, 2006b.

Courbiere, B.; Caquant, L.; Mazoyer, C.; Franck, M.; Lornage, J.; Salle, B. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertility and Sterility*, v. 91, n. 6, p. 2697-2706, Jun 2009.

Courbiere, B.; Caquant, L.; Mazoyer, C.; Poirel, M. T.; Franck, M.; Lornage, J.; Guerin, J. F.; Salle, B. Ovarian endocrine function recovery after vitrification and transplantation of whole sheep ovary. *Human Reproduction*, v. 22, p. 1227-1227, 2007.

Courbiere, B.; Massardier, J.; Salle, B.; Mazoyer, C.; Guerin, J. F.; Lornage, J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertility and Sterility*, v. 84, p. 1065-1071, Oct 2005.

Courbiere, B.; Odagescu, V.; Baudot, A.; Massardier, J.; Mazoyer, C.; Salle, B.; Lornage, J. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertility and Sterility*, v. 86, p. 1243-1251, 2006a.

Dolmans M-M., Jadoul, P., Gilliaux, S., Amorim, C.A., Luyckx, V., Squifflet, J., Donnez, J., Langendonck, A.V.A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. *J Assist Reprod Genet*, v.30, p.305-314, 2013.

Donnez, J.; Dolmans, M. M.; Demylle, D.; Jadoul, P.; Pirard, C.; Squifflet, J.; Martinez-Madrid, B.; Van Langendonck, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*, v. 364, n. 9443, p. 1405-1410, 2004.

- Elmoazzen H.Y. Parameters affecting water permeability across biological cell membranes. *Dissertation* – University of Alberta: Faculty of Graduate Studies and Research, Alberta, 141f, 2000.
- Ernst, E.; Bergholdt, S.; Jorgensen, J.S.; Andersen, C.Y. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*, v.25, n.5, p.1280–1281, 2010
- Fabbri R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. *Cell Tissue Bank*, v.7, p.113-122, 2006.
- Faustino Lr, Carvalho Aa, Silva Cmg, Rossetto R, Lopes Cap, Tiburg Mf, Carneiro Pbm, Bão Sn, Moura Aa, Bordignon V, Figueiredo Jr, Rodrigues Apr. Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex. *Reproduction, fertility and development* doi 10.1071/RD13164
- Faustino, L.R.; Santos, R.R.; Silva, C.M.G.; Pinto, L.C.; Celestino, J.J.H.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R.; Rodrigues, A.P.R. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Animal Reproduction Science*, v. 122, p. 90–97, 2010.
- Friedler S, Giudice Sc, Lamb Ej. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril*, v.49, p.743-764, 1988.
- Gosden, R.G.; Mullan, J.; Picton, H.M.; Yin, H.; Tan, S.L. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine, *Human Reproduction*, v. 8, p. 105-110, 2002.
- Hemadi M, Abolhassani F, Akbari M, Sobhani A, Pasbakhsh P, Åhrlund-Richter L, Modaresi Mh, Salehnia M. Melatonin promotes the cumulus–oocyte complexes quality of vitrified–thawed murine ovaries; with increased mean number of follicles survival and ovary size following heterotopic transplantation. *European Journal of Pharmacology*, v.618, p.84–90, 2009.
- Imhof, M.; Bergmeister, H.; Lipovac, M.; Rudas, M.; Hofstetter, G.; Huber, J. Orthotopicmicrovascularreanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertility and Sterility*, v. 85, p. 1208-1215, Apr 2006.
- Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessole S, Nawroth F, Van Der Ven H. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril*, v.85, p.741-747, 2006.
- Isachenko, E.; Isachenko, V.; Rahimi, G.; Nawroth, F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, v. 108, n. 2, p. 186-193, 2003.
- Jain, J.K.; Paulson, R.J. Oocyte cryopreservation: review article, *Fertility and Sterility*, v. 86, p. 1037–1046, 2006.
- Kagawa, N.; Silber, S.; Kuwayama, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 18, n. 4, p. 568-577, 2009.
- Karlsson Jom, Cravalho Eg, Toner M. Intracellular ice formation: causes and consequences. *Cryo Lett*, v.14, p.323-336, 1993.
- Karlsson, J.O.; Toner, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, v. 17, p. 243–256, 1996.
- Keros, V.; Kella, S.; Hulthenby, K.; Pettersson, K.; Sheikhi, M.; Volpe, A.; Hreinsson, J.; Hovatta, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 24, n. 7, p. 1670-1683, Jul 2009.
- Kim, G. A.; Kim, H. Y.; Kim, J. W.; Lee, G.; Lee, E.; Lim, J.M. Ultrastructural deformity of ovarian follicles induced by different cryopreservation protocol. *Fertility and Sterility*, v. 94, n. 4, p. 1548-1551, 2010.
- Liu, L.; Wood, G.A.; Morikawa, L.; Ayearst, R.; Fleming, C.; Mckerlerlie, C. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Human Reproduction*, v. 23, p. 122-128, 2008.
- Lornage, J., Courbière, B., Mazoyer, C., Odagescu, V., Baudot, A., Bordes, A., Poirel, M. T., Franck, M.; Salle, B. Ovarian tissue vitrification: cortex and whole ovary in sheep. *GynecolObstetFertil*, v. 34, p. 746-753, 2006.
- Lunardi, F. O.; Araujo, V. R.; Bernuci, M. P.; Lunardi, L. O.; Goncalves, R. F. B.; Carvalho, A. D.; De Figueiredo, J. R.; Rodrigues, A. P. R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196-degrees-c. *Human Reproduction*, v. 9, p. 597-603, 1994.
- Luz Hkm, Santos Rr, Wanderley Ls, Faustino Lr, Silva Cmg, Carvalho Aa, Campello Cc, Santos Fw, Figueiredo Jr, Rodrigues Apr. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol-freezing médium. *Biopreservation and biobanking*, v. 10, n. 4, p. 338-342, 2012.
- Luz, V.B.; Santos, R.R.; Pinto, L.C.; Soares, A.A.X.; Celestino, J.J.H.; Mafezoli, J.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R.; Rodrigues, A.P.R. DMSO perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. *Fertility and Sterility*, v. 91, p. 1513-1515, 2009.
- Meirow, D. & Nugent, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*, v.7:535–43, 2001.
- Nagano M, Atabay Ep, Atabay Ec, Hishinuma M, Katagiri S, Takahashi Y. Effects of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on in vitro viability of mouse preantral follicles. *Biomedical research*, v. 28, n. 3, p. 153-160, 2007
- Parkes, A.S. And Smith, A.U. (1953) Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 140, 455±470
- Parrot, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil*, v 1, p. 230-241, 1960
- Paynter S, J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Updated*, v.6, p.449-456, 2000.
- Pegg, D. E. Principles Of Cryopreservation. In: Day, J. G.; Stacey, G. N. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 347p. New Jersey: Humana Press, 2007, p 39-57.
- Rahimi G, Isachenko V, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F, Isachenko E. Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *CryoLetters*, v. 30, n. 4, p. 300-309, 2009
- Rodrigues, A.P.R.; Amorim, C.A.; Costa, S.H.F.; Matos, M.H.T.; Santos, R.R.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Ohashi, O.M.; Figueiredo, J.R. Criopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 61, p.1009-1024, 2004a.
- Rodrigues, A.P.R.; Amorim, C.A.; Costa, S.H.F.; Matos, M.H.T.; Santos, R.R.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Ohashi, O.M.; Figueiredo, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 211-227, 2004b.

- Rubinsky, B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews*, v. 8, n. 3, p. 277-284, 2003.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Berthollet, C.; Lornage, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*, v. 80, n. 1, p. 172-177, Jul 2003.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R. C., Guerin, J. F. And Lornage, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility*, v. 77, n. 2, p. 403-408, 2002.
- Sanches, B.V. *Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões bovinos produzidos in vitro, cultivados ou não na presença de Forskolin*. Dissertação, Universidade federal de Goiás. 49f. Goiânia, GO. 2009. 129p. Dissertação (Mestrado em ciência veterinária). Programa de pós-graduação em ciência animal, Escola de veterinária da Universidade Federal de Goiás.
- Santos Iri (2000) Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12:70-84.
- Santos Rr, Celestino Jjh, Lopes Cap, Melo Map, Rodrigues Apr, Figueiredo Jr. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.9-15, 2008.
- Santos Rr. *Criopreservação de folículos pré-antrais ovinos*. 2005. 182f. Tese - Universidade Estadual do Ceará: Faculdade de Medicina Veterinária, Fortaleza, CE, 2005.
- Santos, R. R.; Van Den Hurk, R.; Rodrigues, A. P. R.; Costa, S. H. F.; Martins, F. S.; Matos, M. H. T.; Celestino, J. J. H.; Figueiredo, J. R. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 99, n. 1-2, p. 53-64, May 2007.
- Santos, R.R.; Knijn, H.M.; Vos, P.L.; Oei, C.H.; Van Loon, T.; Colenbrander, B.; Gadella, B.M.; Van Den Hurk, R.; Roelen, B.A. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility*, v. 91, p. 1455-1458, 2009
- Santos, R.R.; Tharasanit, T.; Figueiredo, J.R.; Van Haefen, T.; Van Den Hurk, R. Preservation of caprinepreantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell and Tissue Research*, v. 325, p. 523-531, 2006.
- Shaw, J. M.; Cox, S. L.; Trounson, A. O.; Jenkin, G. Evaluation of the long term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 161, p. 103-110, 2000
- Sheikhi, M.; Hultenby, K.; Niklasson, B.; Lundqvist, M.; Hovatta, O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reproduction*, v. 26, n. 3, p. 594-603, 2011.
- Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E, Bougneres PF. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplant*, v. 2, p. 989-94, 1998.
- Vajta, G.; Holm, P.; Kuwayama, M.; Booth, P. J.; Jacobsen, H.; Greve, T.; Callesen, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 51, n. 1, p. 53-58, Sep 1998.
- Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li Sw. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod*, v.23, p.2256-2265, 2008.
- Wowk, B. *Thermodynamic aspects of vitrification*. *Cryobiology*, 60, 11-22, 2010
- Yamaki, S.B.; Pedroso, A.G.; Atvars, T.D.Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físicoquímica)