



Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos *Current status and challenges of cryopreservation of ovarian tissue in mammals*

L.R. Faustino¹, C.M.G. Silva, R. Rossetto, G.Q. Rodrigues, J.R. Figueiredo, A.P.R. Rodrigues

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

¹correspondência: lrf Faustino@gmail.com

Resumo

O uso da criobiologia tem sido de extrema importância para a preservação de gametas femininos e, atualmente, tem se mostrado como parte inerente de tecnologias da reprodução. Inúmeros trabalhos têm mostrado o sucesso da criobiologia reprodutiva em diferentes espécies, incluindo o nascimento de crias após transplantes de tecido ovariano previamente criopreservado. Entretanto, apesar dos resultados promissores, a criopreservação de tecido ovariano ainda representa um grande desafio para a criotecnologia, a qual é caracterizada pela baixa repetibilidade de seus resultados. Nesse contexto, a presente revisão apresenta os principais avanços e discute as limitações e perspectivas de aplicação dessa importante técnica reprodutiva.

Palavras-chave: tecido ovariano, criopreservação, transplante ovariano, cultivo *in vitro*.

Abstract

The use of cryobiology has been extremely important for female gametes' preservation and has been currently involved as part of reproduction technologies. Numerous studies have shown the success of reproductive cryobiology in different species, including birth of offspring after transplantation of ovarian tissue previously cryopreserved. However, despite promising results, cryopreservation of ovarian tissue is still a challenge for cryotechnology, which is characterized by a low repeatability of results. In this regard, this review presents the main advances and discusses limitations and prospects of this important reproductive technique.

Keywords: ovarian tissue, cryopreservation, ovarian transplant, *in vitro* culture.

Introdução

A criopreservação de tecido ovariano tem sido estudada notadamente em humanos, com a finalidade de preservar a fertilidade de mulheres jovens em idade reprodutiva antes do tratamento contra doenças malignas. Isso tem revelado que a criopreservação de tecido ovariano é uma importante tecnologia, com aplicações médicas e científicas (Segino et al., 2005). Para a medicina veterinária, essa técnica pode ser aplicada também para a preservação de oócitos inclusos em folículos ovarianos oriundos de fêmeas de espécies animais em perigo de extinção, animais de estimação, ou ainda animais transgênicos, visando à formação de bancos de germoplasma animal. A criopreservação de folículos ovarianos oriundos de fêmeas que estejam em uma dessas situações pode aumentar as chances de perpetuação das espécies, ou mesmo de animais de grande valor genético/científico ou sentimental.

Os folículos ovarianos podem ser criopreservados de duas maneiras: *in situ*, ou isolados, isto é, inclusos ou livres do tecido ovariano, respectivamente. A criopreservação de folículos isolados apresenta como principais vantagens a ausência de danos devido à isquemia ou revascularização, a possibilidade de acompanhamento dos folículos individualmente durante os procedimentos, além de ter a perfusão do agente crioprotetor facilitada pela ausência de barreiras teciduais. No entanto, a perda de folículos durante sua manipulação, a incapacidade de restauração da função ovariana e a falta de um sistema de cultivo eficiente que garanta a completa maturação folicular, sobretudo de folículos primordiais, destacam-se como fatores limitantes ao uso desta prática.

Com relação à criopreservação de folículos *in situ*, a maior limitação é caracterizada pela dificuldade na preservação do próprio ovário, considerando-se as diferenças existentes entre os vários tipos celulares constituintes do tecido ovariano (Hovatta, 2005). Contudo, tendo em vista sua ampla aplicação na reprodução assistida associada ao transplante, a possibilidade de retomada da função ovariana (restauração da ciclicidade) e a facilidade de manuseio do tecido, a grande maioria dos trabalhos tem se concentrado na área de criopreservação de tecido ovariano. Por esta razão, o foco da presente revisão será exclusivamente a criopreservação de folículos *in situ*.

Nesse sentido, nas seções seguintes desta revisão, serão apresentados os aspectos relacionados à estrutura e função do ovário, os princípios básicos da criopreservação de tecido ovariano, bem como os principais desafios e sucessos dessa técnica em diferentes mamíferos.

Ovário: estrutura e função

O ovário mamífero é o principal órgão do sistema reprodutivo feminino, o qual é composto de vários tipos de células diferenciadas que trabalham em conjunto para promover suas funções endócrina e exócrina (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Com relação à *função endócrina*, o ovário é responsável pela produção e liberação de hormônios esteroides e diversos peptídeos, enquanto a *função exócrina* ou *gametogênica* visa à produção e liberação de oócitos (Saumande, 1991).

Em todas as espécies de mamíferos, o ovário é composto de uma região medular e uma cortical, circundada pelo epitélio germinativo (Silva, 2005). A região medular, que na maioria das espécies consiste na porção interna do ovário, é constituída por tecido conjuntivo, células musculares lisas, nervos, artérias e veias (Cormack, 1991), que se estendem para o interior do córtex ovariano e são responsáveis por nutrir e fornecer sustentação ao ovário. Já o córtex, localizado mais externamente, com exceção dos equinos, contém folículos ovarianos e corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento e regressão (Hafez e Hafez, 2004).

O folículo ovariano, constituído basicamente por um oócito circundado por células foliculares demarcadas por uma membrana basal, é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário e tem como principais funções proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e a maturação oocitária (Cortvrindt e Smitz, 2001), bem como produzir hormônios e peptídeos (Adashi, 1994). De acordo com a presença ou não de uma cavidade repleta de líquido, denominada antro, os folículos podem ser classificados em (a) *folículos pré-antrais* (FOPA) e (b) *folículos antrais* (FA). Os folículos pré-antrais, de acordo com o estágio de desenvolvimento, podem ser ainda classificados em primordiais, de transição, primários ou secundários. Já os folículos antrais são assim denominados por possuírem uma cavidade antral bem desenvolvida em seu interior e são classificados em terciários ou pré-ovulatórios (Figueiredo et al., 2008).

Quantitativamente, a população folicular total é bastante variável entre as espécies, podendo se encontrar de 35.000 na cabra (Lucci et al., 1999) a 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986). Por outro lado, independente da espécie, o percentual de folículos pré-antrais representa a reserva folicular ovariana e corresponde a cerca de 90 a 95% de todo o capital folicular, enquanto os folículos antrais compreendem somente cerca de 5 a 10% (Figueiredo et al., 2007). Outro dado surpreendente, comum a todos os mamíferos, é que a maioria (99,9%) dos folículos não chega à ovulação, pois morre por um processo fisiológico conhecido como atresia, que pode ocorrer por via degenerativa necrótica (Bras et al., 2005) e/ou apoptótica (Hussein, 2005). No entanto, os folículos pré-antrais são menos susceptíveis à atresia do que os folículos antrais e, à medida que ascendem para essa categoria, tornam-se também vulneráveis à morte folicular.

Visando maximizar a utilização do potencial reprodutivo de fêmeas, vários estudos relacionados à biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) têm contribuído bastante no sentido de desenvolver um meio de cultivo que bloqueie a atresia e assegure o crescimento e a maturação *in vitro* de oócitos oriundos desses folículos. Entretanto, a utilização de milhares de folículos pré-antrais oriundos de um mesmo animal ou animais diferentes em uma única manipulação, além de pouco prática, pode incorrer em riscos de perda folicular, a exemplo do que acontece no ambiente ovariano. Neste sentido, a criopreservação do tecido ovariano poderá manter a viabilidade folicular até que seja realizado o cultivo *in vitro* ou transplante do ovário, pois permite a manutenção da integridade estrutural tanto das células somáticas como das células germinativas. Os principais aspectos relacionados ao processo de criopreservação estão descritos nos tópicos a seguir.

Aspectos gerais sobre a criopreservação

A criopreservação consiste no armazenamento e na preservação de materiais biológicos sob baixas temperaturas. Normalmente, a temperatura adotada é a do nitrogênio líquido (-196°C), embora não se tenha conhecimento de um valor preciso para este fim (Jain e Paulson, 2006). Sob temperaturas tão baixas, a criopreservação permite que as células vivas sejam submetidas a um estado de redução do metabolismo, no qual podem permanecer por um período indefinido e, futuramente, serem resgatadas ainda viáveis (Mazur, 1980), a fim de continuarem o seu desenvolvimento normal após descongelação. Para que isso seja possível, mesmo após longos períodos de conservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser cuidadosamente considerados, tais como o tipo e a concentração do(s) agente(s) crioprotetor(es) empregado(s); a escolha do método de criopreservação (congelação lenta ou vitrificação); a taxa de redução da temperatura de congelação e técnicas utilizadas para assegurar a remoção do agente crioprotetor após a descongelação (Gordon, 1994), o qual tem sido extensivamente utilizado em diferentes protocolos de criopreservação.

Agentes crioprotetores (ACP)

Os agentes crioprotetores são classificados como substâncias orgânicas e têm a função de proteger a célula ou o tecido contra desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema da temperatura (Santos et al., 2008). Esses agentes podem ser divididos em dois principais grupos: *intracelulares* ou *penetrantes* e *extracelulares* ou *não penetrantes*.

Os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular que reduzem as lesões celulares causadas pela congelação (Karow, 2001). Dentre os mais empregados para a criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano, estão o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol (PROH), o etilenoglicol

(EG) e o glicerol (GLI), cujas propriedades químicas são mostradas no Quadro 1. Essas substâncias agem por meio de diferentes mecanismos, como: (1) interação na dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (Dobrinsky, 1996); (2) redução do ponto de congelamento da solução; (3) aumento da viscosidade do meio; (4) redução da concentração de eletrólitos intra e extracelulares durante a criopreservação (Santos et al., 2008); (5) substituição parcial das moléculas de água das células (Rall et al., 1984) e (6) ligação ao hidrogênio da água presente no meio intracelular (Jain e Paulson, 2006).

Quadro 1. Propriedades químicas dos principais crioprotetores intracelulares empregados na criopreservação de tecido ovariano.

Propriedades químicas	DMSO	EG	PROH	GLI
Fórmula química	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	$\text{C}_2\text{H}_2(\text{OH})_2$	$\text{C}_3\text{H}_6(\text{OH})_2$	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$
Classe química	Sulfóxido	Álcool (diol)	Álcool (diol)	Álcool (triol)
Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	~78,13	62,068	~76,09	92,094
Densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	1,1004	1,1132	1,036	1,2613

Especificamente em tecido ovariano, as primeiras tentativas para criopreservação foram realizadas a partir da congelamento de fragmentos do tecido ovariano de animais de laboratório (camundongos e ratas), utilizando o glicerol como crioprotetor (Deanesly 1954; Green et al., 1956). Entretanto, este agente crioprotetor é pouco recomendado para a criopreservação de tecido ovariano devido à sua baixa capacidade de penetração (Newton et al., 1998). Para o tecido ovariano, utiliza-se mais comumente o dimetilsulfóxido, o propanodiol ou o etilenoglicol, uma vez que estes crioprotetores possuem alta solubilidade, rápida penetrabilidade e levam a menores danos osmóticos (Oktay et al., 1998).

No que se refere aos crioprotetores extracelulares, como, por exemplo, os carboidratos: sacarose, rafinose, trealose, ficoll, e as proteínas, como as presentes no soro fetal bovino, estes são moléculas com grandes dimensões que não penetram na membrana celular (Hovatta, 2005), porém, protegem-na por intermédio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos membranários (Santos et al., 2008). Além disso, agem reduzindo o choque osmótico, controlando a entrada de água na célula (Shaw et al., 2000a) e causando desidratação celular antes da congelamento.

No entanto, apesar da ação benéfica dos agentes crioprotetores, deve-se considerar sua toxicidade, que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação. A escolha do tipo e da concentração de um agente crioprotetor que resulte em uma baixa toxicidade depende do tipo de célula e tecido a ser criopreservado (Fuller e Paynter, 2004), bem como da espécie utilizada e do método de criopreservação empregado.

Métodos de criopreservação

Os métodos de criopreservação são classificados em congelamento lento e vitrificação. A congelamento lento 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).

Na congelamento lento, é fundamental promover a desidratação da célula ou do tecido com a redução gradual da temperatura, na presença de baixas concentrações de agente crioprotetor, sob o controle de um *freezer* programável (Paynter, 2000). Ao contrário da congelamento lento, a vitrificação envolve um processo muito rápido, que emprega altas concentrações de agente crioprotetor (Yeoman et al., 2005), e é considerada um método relativamente barato, uma vez que não requer equipamento especial como o *freezer* programável.

Etapas da criopreservação

De forma geral, um protocolo de criopreservação compreende basicamente cinco diferentes etapas: (1) exposição ao agente crioprotetor ou período de equilíbrio; (2) resfriamento; (3) armazenamento; (4) descongelamento ou aquecimento e (5) remoção do agente crioprotetor.

Exposição ao agente crioprotetor (Período de equilíbrio)

A exposição ao crioprotetor ou período de equilíbrio consiste no tempo necessário para penetração ou perfusão do agente crioprotetor nas células e/ou tecidos e pode ser considerado o primeiro passo para um eficiente protocolo de criopreservação (Elmoazzen et al., 2005). Principalmente na congelamento lento, o período de equilíbrio é uma etapa extremamente importante para que a célula ou o tecido atinja um estado no qual as concentrações de crioprotetor e água, extra e intracelulares, tornem-se iguais (Gunasena et al., 1997), sendo fortemente influenciada pela própria concentração do crioprotetor, do tempo e da temperatura em que é realizada a exposição (Elmoazzen, 2000). Dessa forma, dados sobre a cinética e o influxo de crioprotetores no tecido são essenciais para assegurar adequadamente o equilíbrio entre as concentrações intra e extracelulares do crioprotetor, bem como otimizar os procedimentos de criopreservação (Taylor e Busza, 1992).

Neste sentido, a determinação dos níveis de crioprotetores presentes nas células e/ou tecidos, após o

período de equilíbrio, é de suma importância para o desenvolvimento de um protocolo ideal de criopreservação. Dentre as técnicas utilizadas para mensurar os níveis teciduais de um agente crioprotetor, pode-se destacar a ressonância magnética e a cromatografia líquida de alta eficiência (Elmoazzen et al., 2005). A ressonância magnética já foi utilizada para determinar a concentração de agentes crioprotetores em diversos tecidos, inclusive no tecido ovariano suíno e humano (Thomas et al., 1997; Newton et al., 1998). Já a cromatografia líquida de alta eficiência, cujo método é mais prático e de menor custo, foi utilizada recentemente para determinar os níveis teciduais de dimetilsulfóxido em córtex ovariano caprino (Luz et al., 2009) e ovino (Pinto et al., 2008).

Resfriamento

Processo de congelamento lento

Durante o resfriamento, à medida que as células são resfriadas a temperaturas entre -5 e -15°C , ocorre primeiramente a formação de gelo no meio extracelular (Fig. 1). Com a continuidade da redução da temperatura, a quantidade de gelo aumenta e os solutos concentram-se no meio extracelular, criando um gradiente osmótico (Elmoazzen, 2000). A partir desse estágio, os eventos físicos subsequentes dependem da velocidade de congelamento. Isso significa que, se a taxa de congelamento 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, 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 – CGI (Karlsson et al., 1993). Ao contrário, sob baixas taxas de congelamento, 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 se move para fora da célula e congela externamente, consequentemente evitando a formação de cristais de gelo intracelular (Friedler et al., 1988). No entanto, nas duas situações – velocidade de congelamento rápida ou lenta –, danos celulares irão ocorrer (Elmoazzen, 2000), conforme será abordado mais adiante.

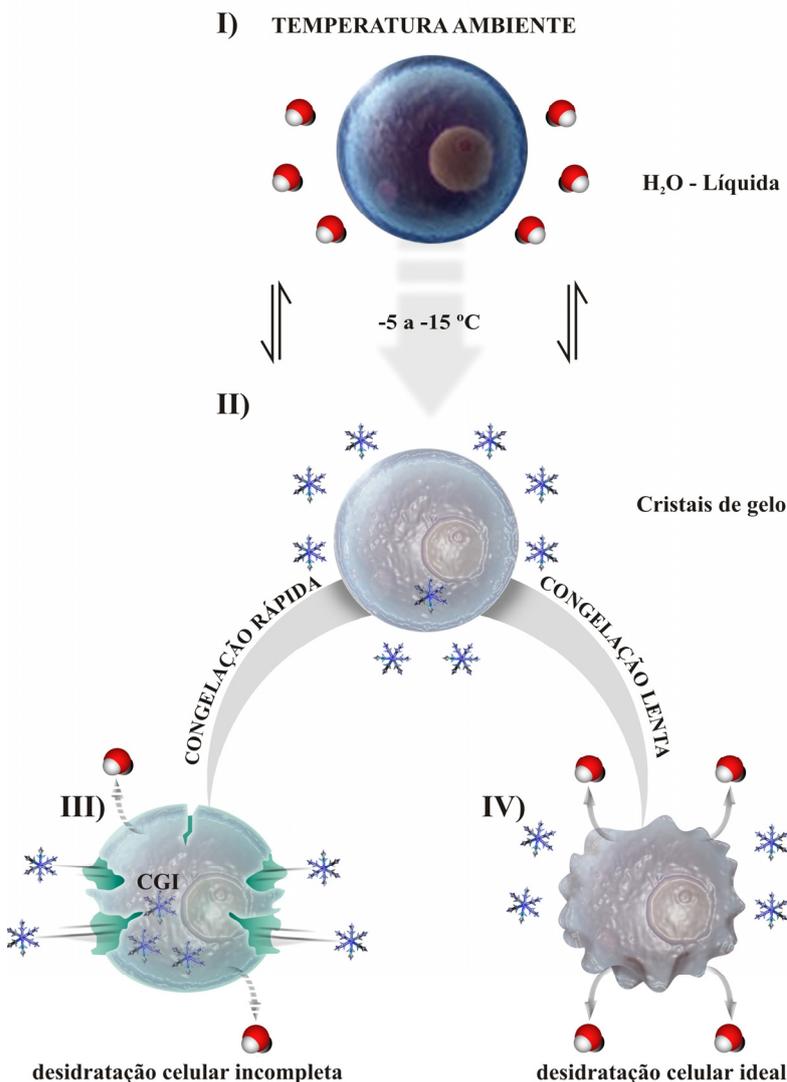


Figura 1. Representação esquemática do comportamento celular durante a congelamento. À medida que a célula é resfriada (I), ocorre primeiramente a formação de gelo extracelular (II). Se a taxa de congelamento for rápida, a formação de cristais de gelo extracelular ocorre mais rápida do que o efluxo de água; a desidratação é incompleta e a solução intracelular congela-se, formando os cristais de gelo intracelular – CGI (III). Por outro lado, se a taxa de congelamento for lenta, ocorre uma desidratação celular e a nucleação intracelular do gelo não ocorre. A água move-se para fora da célula e congela externamente, não permitindo a ocorrência da formação de cristais de gelo intracelular (IV). Linhas descontinuas representam a saída gradual da água, enquanto linhas contínuas representam uma saída mais rápida.

Com a finalidade de reduzir a formação de cristais de gelo intracelular, deve-se induzir a formação de gelo extracelular, processo conhecido como *seeding*, que previne a supercongelação da célula e inicia o processo de desidratação (Shaw et al., 2000a). A indução do *seeding* pode ser realizada automaticamente (*self-seeding* – Maltaris et al., 2005) ou manualmente, por meio do toque de um objeto de metal pré-resfriado a -196°C na parede dos criotubos ou palhetas (Fabbri, 2006). Outra forma de reduzir ou evitar a formação de cristais de gelo intracelular pode ser por meio de uma desidratação celular adequada (Shaw et al., 2000b), uma vez que o aumento da desidratação reduz a água intracelular, diminuindo os danos causados pelo procedimento de congelamento. Além da taxa de congelamento/descongelamento, o processo de desidratação também pode ser influenciado pela presença de agente crioprotetor na solução de congelamento (Fabbri et al., 2000), que provoca a saída de água do citoplasma para diluir a alta concentração de soluto extracelular (Shaw et al., 2000a).

Processo de vitrificação

Diferentemente da congelamento lenta, na vitrificação a velocidade de resfriamento é extremamente rápida, podendo variar de aproximadamente 20.000 a $40.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Lin et al., 2008). Como consequência, a água passa do estado líquido para um estado vítreo, considerado um sólido amorfo, sem exposição ao estágio cristalino (Rall e Fahy, 1985), ou seja, não se observa a formação de cristais de gelo (Yeoman et al., 2005).

A vitrificação do citoplasma é obtida experimentalmente por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes de mergulhar a amostra em nitrogênio líquido. Com isto, a solução intracelular se torna muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de resfriamento apropriada é utilizada (Santos, 2000).

Armazenamento

Ao fim do processo de criopreservação, a amostra deve ser armazenada até o momento imediato de sua descongelamento. Embora temperaturas abaixo de -80°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 e Toner, 1996). Dessa forma, diversos trabalhos utilizam com frequência o nitrogênio líquido para estocagem de materiais biológicos, cuja temperatura é de -196°C . Segundo McGee e Martin (1962), à temperatura de -196°C , a energia térmica existente é insuficiente para a ocorrência das reações químicas. Estudos prévios sobre a influência do tempo de armazenamento mostraram que os processos de criopreservação, e não o tempo de estocagem, exercem os principais efeitos sobre as células (Kleeberger et al., 1999; Smith et al., 2001).

Descongelamento ou aquecimento

Outra etapa crítica da criopreservação é a descongelamento. Durante essa etapa, o reaquecimento do material congelado pode ocasionar injúrias celulares por meio 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 (Santos, 2000). Portanto, recomenda-se que o processo de descongelamento seja suficientemente rápido para permitir que o gelo extracelular derreta e atravesse a membrana extracelular em estado líquido para a reidratação da célula (Friedler et al., 1988).

Remoção ou diluição do agente crioprotetor

Após o procedimento de descongelamento, é necessária a remoção do agente crioprotetor, que pode ser realizada por meio de uma ou várias lavagens do material criopreservado (Santos et al., 2008); geralmente se usam três lavagens, com duração entre cinco e 15 minutos, cada uma. A 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 agente crioprotetor em contato com um meio contendo baixa ou concentração nula deste agente, a água passa a entrar de forma mais rápida na célula para diluir o agente crioprotetor ainda presente na amostra congelada, causando aumento de volume ou até mesmo rompimento celular (Fabbri, 2006). Portanto, recomenda-se também que a remoção do agente crioprotetor seja realizada em passos seriados, utilizando-se, para isso, soluções em concentrações decrescentes de crioprotetor extracelular, como, por exemplo, a sacarose, que funciona como tampão osmótico extracelular (Mandelbaum et al., 1988).

Principais resultados da criopreservação de tecido ovariano

Criopreservação de tecido ovariano em animais de laboratório

Desde a década de 50, fragmentos do tecido ovariano de roedores têm sido submetidos à congelamento e a

autotransplante subcutâneo (Deanesly, 1954; Green et al., 1956). Nos últimos anos, diversos estudos realizados em animais de laboratório têm demonstrado que folículos pré-antrais apresentaram-se morfológicamente normais após congelação na presença de 1,5 M de dimetilsulfóxido (Hovatta et al., 1996) ou propanodiol, associado ou não a 0,1 M de sacarose (Candy et al., 1997). Além disso, também foi relatada a retomada do ciclo reprodutivo após transplante de fragmentos ovarianos previamente congelados utilizando o dimetilsulfóxido (1,5 M) como agente crioprotetor (Candy et al., 1995). Em camundongas ovariectomizadas, 75 e 80% dos animais apresentaram ciclos estrais regulares após autotransplante de tecido ovariano fresco ou previamente congelado, respectivamente, na presença de 1,4 M de dimetilsulfóxido, a uma taxa de 0,5°C/min até -55°C. Neste mesmo estudo, os autores relataram uma taxa de 86% de gestação após transplante de ovários fetais para fêmeas adultas (Harp et al., 1994). Em ratas neonatas, após avaliação da sobrevivência folicular de ovários vitrificados, foi observado um número considerável de folículos com morfologia normal (92 folículos/ovário), no entanto este número foi menor que o tecido ovariano não criopreservado (334 folículos/ovário; Sugimoto et al., 1996).

Após exposição do tecido ovariano de camundongas a uma solução contendo 1,5 M de dimetilsulfóxido ou propanodiol, por 25 minutos a 4°C, foi relatado que a congelação, a uma taxa de 0,3°C/min até -40°C, seguida de cultivo por oito dias, promoveu o crescimento *in vitro* de folículos isolados, apesar de a taxa de desenvolvimento e a de sobrevivência folicular terem sido baixas em relação ao tecido fresco (Newton e Illingworth, 2001). Trabalhando também com camundongas, Segino et al. (2005) mostraram que folículos pré-antrais isolados do tecido ovariano previamente congelado desenvolvem-se mais lentamente do que aqueles não congelados. Para exposição por cinco minutos a 4°C, os autores utilizaram como solução 40% de etilenoglicol, 18% de Ficoll e 0,3 M de sacarose. Recentemente, foi demonstrado que a criopreservação suprime temporariamente a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais de camundongas por meio da redução da expressão de ciclinas e quinases (Choi et al., 2008), o que pode estar relacionado ao atraso no desenvolvimento folicular. No entanto, atualmente foi mostrado que folículos isolados derivados de tecido previamente exposto por cinco minutos, a temperatura ambiente, e vitrificado, em solução composta por 40% de etilenoglicol, 30% de Ficoll 70 e 1,0 M de sacarose, apresentaram crescimento folicular e maturação oocitária similar aos folículos não vitrificados (Haidari et al., 2008).

O nascimento de crias saudáveis de camundongas tem sido obtido a partir de ovário previamente congelado em 1,5 M de dimetilsulfóxido, seguido do transplante sob cápsula renal e do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no próprio tecido ovariano (Liu et al., 2001), ou mesmo após acasalamento quando o transplante foi realizado na bursa ovariana (Liu et al., 2008). No entanto, existem poucos relatos de crias nascidas a partir de folículos pré-antrais que cresceram, maturaram e foram fertilizadas somente com o cultivo *in vitro* após criopreservação. Nessas condições, ou seja, sem utilização do transplante, Hasegawa et al. (2006), recentemente obtiveram duas crias de camundongos após exposição e vitrificação do tecido ovariano, a uma solução de vitrificação contendo 15% de etilenoglicol, 15% de dimetilsulfóxido e 0,5 M de sacarose por 30 minutos a 4°C.

Criopreservação de tecido ovariano em animais domésticos

Em animais domésticos como os ovinos, a viabilidade folicular foi demonstrada após congelação do tecido ovariano com 1,0 M dimetilsulfóxido (exposição prévia por 10 minutos - Pinto et al., 2008) ou 1,5 M de etilenoglicol (exposição prévia por 20 minutos - Tsuribe et al., 2009), ambos expostos a 20°C e com taxa de resfriamento de 0,3°C/min até -40°C. Além disso, após autotransplante do tecido ovariano ovino previamente congelado e pré-exposição por 30 minutos a 0°C a uma solução contendo 1,5 M de dimetilsulfóxido e taxa de 0,3°C/min até -40°C, foi observado um aumento nos níveis de progesterona quatro semanas após o enxerto (Baird et al., 1999). Foi relatada também a restauração da atividade hormonal quando realizado o autotransplante de ovário inteiro com exposição prévia e congelação na presença de 1,4 M de dimetilsulfóxido por três minutos, a uma taxa de 0,3°C/min até -30°C (Revel et al., 2004).

Os primeiros resultados mais encorajadores foram alcançados por Gosden et al. (1994), que relataram a retomada da atividade cíclica e da gestação, obtendo o nascimento de uma cria saudável depois de autotransplante ortotópico de fragmentos do córtex ovariano congelado/descongelado utilizando dimetilsulfóxido. Outros estudos também relataram o nascimento de cordeiros após congelação do tecido ovariano, seguida do transplante utilizando esse mesmo crioprotetor (Salle et al., 2002, 2003). Mais recentemente, dois trabalhos com vitrificação obtiveram três gestações, cada um, com nascimento de cordeiros saudáveis, após autotransplante ortotópico de metade do ovário vitrificado, cuja solução de vitrificação era composta por quatro diferentes tipos de crioprotetores: dimetilsulfóxido (2,62 M), acetamida (2,60 M), propanodiol (1,31 M) e polietilenoglicol (0,0075 M; Bordes et al., 2005; Lornage et al., 2006). Da mesma forma, após congelação do tecido ovariano com 1,5 M de dimetilsulfóxido, seguida de autotransplante ortotópico de ovário inteiro, foram obtidos gestação e nascimento de um cordeiro (Imhof et al., 2006).

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 nesse tecido podem ser congelados (Rodrigues et al., 2004a, b; Luz et al., 2009) ou vitrificados (Santos et al., 2006, 2007) com sucesso na presença

de diferentes crioprotetores (dimetilsulfóxido, etilenoglicol e propanodiol), demonstrando grande potencial para a constituição de bancos de germoplasma (Rodrigues et al., 2004a, b; Santos et al., 2007; Luz et al., 2009). Recentemente, Santos et al. (2009) relataram pela primeira vez a retomada da função ovariana após autotransplante do tecido ovariano caprino descongelado.

Em bovinos, alguns autores têm obtido resultados bastante satisfatórios na criopreservação de tecido ovariano desta espécie, demonstrando que folículos pré-antrais bovinos apresentam altas taxas de sobrevivência, após exposição aos crioprotetores a 20°C por 20 minutos (Lucci et al., 2004; Celestino et al., 2008). Lucci et al. (2004) demonstraram que dimetilsulfóxido ou propanodiol (1,5 ou 2,0 M) preservam a morfologia e a ultraestrutura foliculares, enquanto Celestino et al. (2008) observaram que a viabilidade de folículos pré-antrais não é afetada quando 1,5 M de etilenoglicol é utilizado no meio de congelamento.

Em felinos, resultados bastante animadores foram obtidos após congelamento do córtex ovariano de gatas, seguida de xenotransplante sob cápsula renal de camundongos imunodeficientes, após exposição a 1,5 M de etilenoglicol por 25 minutos a 4°C e taxa de resfriamento de 0,3°C/min até -40°C. Nesse trabalho, os autores mostraram o desenvolvimento de folículos em estádios avançados (Bosch et al., 2004). Enquanto em cadelas, após vitrificação (2,0 M de dimetilsulfóxido, 1,0 M de acetamida e 3,0 M de propanodiol) e xenotransplante do tecido ovariano em camundongas imunodeficientes, foi observada uma estrutura tecidual similar à do tecido fresco, mostrando que o tecido ovariano de cadelas tem potencial para restaurar a função endócrina após criopreservação (Ishijima et al., 2006).

Thomaz et al. (2005) observaram, após criopreservação de tecido ovariano de coelha, a presença somente de folículos primordiais após congelamento lento com 1,5 M de dimetilsulfóxido, sendo observadas alterações histológicas foliculares reversíveis e irreversíveis. Além disso, os autores utilizaram análises imunohistoquímica no tecido ovariano de coelhas fresco ou congelado e relataram que os folículos apresentaram positividade para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), indicando a presença de DNA ativo após criopreservação. Nessa mesma espécie, foram observadas boas taxas de viabilidade folicular após congelamento utilizando 1,5 M de propanodiol ou dimetilsulfóxido, associados a 0,2 M de trealose (79,8 e 78%, respectivamente), sendo ainda possível a visualização de folículos primordiais e primários com morfologia bem preservada (Neto et al., 2008).

Em suínos, poucos trabalhos relatam o efeito da criopreservação sobre o tecido ovariano. Gandolfi et al. (2006) relataram que, nessa espécie, a criotolerância foi maior que em bovinos e humanos, após exposição a 1,5 M de dimetilsulfóxido ou propanodiol, associado a 0,1 M de sacarose por 30 minutos a 4°C, com taxa de resfriamento de 0,3°C/min até -40°C. Nesse trabalho, tanto o dimetilsulfóxido como o propanodiol causaram danos significativos aos folículos primordiais bovinos comparados ao controle não congelado, enquanto os folículos primordiais de suínos foram bem preservados em ambos os crioprotetores. Além disso, os autores observaram que, independente da espécie estudada, os protocolos de vitrificação testados para criopreservação de tecido ovariano causaram danos extensos aos folículos de bovinos e suínos, sendo menos eficiente do que a congelamento lento. Borges et al. (2009) observaram ainda que o tecido ovariano suíno, após descongelamento e incubação por período de duas horas em estufa (38,5°C; 5% CO₂), apresentou porcentagem de folículos morfológicamente normais similar à observada no tecido não congelado e incubado nas mesmas condições. Esses autores também mostraram que a ultraestrutura dos folículos pré-antrais foi bem preservada. Após xenotransplante em camundongas de tecido ovariano suíno vitrificado, foi observada revascularização tecidual, bem como o desenvolvimento folicular até o estágio secundário, embora este segundo evento tenha sido mais lento do que o tecido fresco, que apresentou, inclusive, formação da cavidade antral (Moniruzzaman et al., 2009).

Criopreservação de tecido ovariano em humanos

Experiências com a criopreservação de tecido ovariano humano tem sido realizadas desde a década de 90, quando Newton et al. (1996) demonstraram que o tecido exposto por 30 minutos a 4°C em 1,5 M de dimetilsulfóxido, etilenoglicol ou propanodiol permaneceu viável após congelamento, a uma taxa de resfriamento de 0,3°C/min até -40°C, seguido de transplante sob cápsula renal em camundongos imunodeficientes. A viabilidade de tecido ovariano humano após descongelamento também foi relatada após xenotransplante subcutâneo (Van den Broecke et al., 2001), utilizando 1,5 M de propanodiol e o mesmo protocolo descrito por Newton et al. (1996), bem como após transplante ortotópico (Radford, 2003), utilizando dimetilsulfóxido como agente crioprotetor. Já a função ovariana, seguida de crescimento folicular, foi comprovada primeiramente após transplante subcutâneo de tecido congelado (Oktay e Karlikaya, 2000), com relato inclusive de formação da cavidade antral após transplante do ovário congelado sob cápsula renal, previamente exposto a 1,5 M de propanodiol associado a 0,1 M de sacarose por 90 minutos a temperatura ambiente, com taxa de resfriamento de 0,3°C/min até -30°C (Gook et al., 2003).

Estudos recentes relataram o nascimento de crianças saudáveis após transplante ortotópico de tecido ovariano previamente congelado (Donnez et al., 2004; Meirou et al., 2005; Demeestere et al., 2007; Andersen et al., 2008), evidenciando, assim, um avanço extremamente significativo da criopreservação e do transplante de

tecido ovariano. Recentemente, uma dessas mulheres concebeu novamente mais uma criança, sendo, portanto, a primeira mulher a dar a luz a duas crianças oriundas de diferentes gestações, após transplante de tecido ovariano criopreservado (Ernst et al., 2010). Esses resultados mostram que a associação dessas técnicas (criopreservação e transplante do tecido ovariano) é de grande valor para preservação da fertilidade de mulheres, sobretudo daquelas que são submetidas, ainda em idade reprodutiva, à quimio/radioterapia para tratamento de cânceres.

Apesar de a maioria dos estudos focar o transplante de tecido ovariano, já foi relatado que, após cultivo por duas semanas, os folículos congelados, conforme protocolo descrito por Hovatta et al. (1996), apresentaram taxas de sobrevivência e crescimento semelhantes aos folículos não congelados, com o desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio de folículos secundários (Hovatta et al., 1997). Em outro estudo, foi mostrado que, apesar da utilização do transplante de tecido ovariano congelado com dimetilsulfóxido sob a pele de uma paciente, foi possível a recuperação de oócitos aptos à maturação e fertilização *in vitro*, resultando em um embrião em estágio de 4-células (Oktay et al., 2000).

Desafios da criopreservação do tecido ovariano

Apesar dos estudos promissores já relatados na literatura utilizando a criopreservação do tecido ovariano, alguns entraves intrínsecos ao procedimento são decisivos para que resultados satisfatórios e contínuos sejam obtidos. Primeiro, para cada tipo celular, existe uma taxa ótima de resfriamento (Fabbri, 2006), sendo esta uma das razões que dificulta a criopreservação do tecido ovariano, uma vez que este tecido é composto por muitos tipos celulares diferentes, como as células do estroma e os folículos (oócito e células foliculares), além dos vasos sanguíneos e nervos, que são importantes para o restabelecimento da função ovariana após transplante (Hovatta, 2005).

As injúrias celulares também estão relacionadas à natureza e cinética das células ao responderem às condições induzidas pela temperatura. Mazur et al. (1972) propuseram que, durante a congelamento lento, as injúrias celulares ocorrem devido à exposição relativamente longa das células às condições deste processo que alteram as propriedades das soluções intra e extracelulares como resultado da desidratação. Segundo Santos (2000), durante a redução da temperatura quando as células são desidratadas em excesso, elas podem ser danificadas pela exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos eletrólitos celulares, evento conhecido como efeito solução, que inclui alterações de pH, aumento na concentração e precipitação de solutos, resultando em alterações no citoplasma (Mazur et al., 1984), causando injúrias nas proteínas celulares (Jain e Paulson, 2006). Em 1974, Meryman propôs a existência de um volume crítico de tolerância a que as células poderiam resistir durante a retração. Outros autores sugeriram ainda que, durante as injúrias do resfriamento, a área de superfície celular é reduzida como resultado da perda de material da membrana (Steponkus e Weist, 1978). Um estudo mostrou que os lipídios da membrana podem ser eliminados durante a desidratação e que danos podem ocorrer durante a reidratação se não existir uma quantidade suficiente de constituintes da membrana que façam com que a célula retorne ao seu volume isotônico (Elmoazzen, 2000).

Como visto anteriormente, os crioprotetores são imprescindíveis para os protocolos de criopreservação. No entanto, nos casos em que altas concentrações são utilizadas, a toxicidade dos agentes crioprotetores pode ser prejudicial. Embora sua toxicidade tenha sido observada em numerosos modelos celulares e teciduais, ainda não existem evidências experimentais adequadas para explicar o mecanismo das injúrias. Numerosos estudos propõem que a toxicidade esteja relacionada às ações não específicas de desidratação e ao aumento intracelular da concentração de soluto ou à indução de danos na membrana pela alteração da polaridade do meio celular ou pela fusão da membrana (Huang et al., 2006).

Apesar de os fatores citados serem responsáveis por danos celulares, na congelamento lento, a formação de cristais de gelo intracelular é considerada um dos mais importantes, visto que os cristais de gelo são responsáveis por graves danos mecânicos às células. Essa formação de gelo ocorre quando as células não estão suficientemente desidratadas (Széll e Shelton, 1986). Segundo Jain e Paulson (2006), os danos dos cristais de gelo intracelular estão relacionados à expansão do gelo dentro da célula, a qual causa pressão no citoplasma, tencionando as organelas, que podem sofrer consideráveis injúrias irreparáveis. Essas injúrias podem ser observadas por meio de técnicas que permitem avaliar a viabilidade morfológica e ultraestrutural da célula.

Análise da qualidade folicular após criopreservação do tecido ovariano

Para avaliar a eficiência da criopreservação do tecido ovariano, diversas técnicas podem ser aplicadas com base na morfologia (Rodrigues et al., 2004a, b), ultraestrutura (Celestino et al., 2008), viabilidade celular (Santos et al., 2006; Pinto et al., 2008), dentre outras.

A histologia clássica, considerada de baixo custo e de fácil execução, tem sido largamente utilizada para análise da morfologia folicular por ser um método quantitativo, no qual um grande número de folículos pode ser avaliado. Entretanto, esta técnica permite identificar somente sinais avançados de atresia, como picnose nuclear, danos citoplasmáticos, destacamento das células da granulosa e danos na membrana basal (Demirci et al., 2002). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é capaz de revelar alterações das organelas celulares e mudanças

ultraestruturais, inclusive na membrana nuclear (Salehnia et al., 2002), sendo considerada, portanto, um método qualitativo. No entanto, essa técnica apresenta várias limitações, como a necessidade de um maior tempo para sua execução, ser bastante onerosa e permitir a avaliação de uma baixa quantidade de folículos. Todos esses fatores não permitem que a microscopia eletrônica de transmissão seja utilizada como uma técnica de rotina, mas apenas como uma técnica para confirmar a aplicabilidade da histologia clássica.

Estudos demonstraram, contudo, que a análise morfológica também apresenta suas limitações, pois nem sempre pode ser correlacionada com a viabilidade e capacidade de desenvolvimento folicular (Martinez-Madrid et al., 2004), e, como já se sabe, a criopreservação pode induzir à ruptura da membrana celular, levando à morte dos folículos. Dessa forma, estudos sobre a integridade da membrana utilizando corantes vitais, como o azul de Trypan (Pinto et al., 2008), ou marcadores fluoescntes, como a calceína-AM e o etídio homodímero-1 (Santos et al., 2007; Aerts et al., 2008), são ferramentas importantes para análise da viabilidade dos folículos após isolamento do tecido ovariano.

Além dessas técnicas, Rodrigues et al. (2005) mostraram que o cultivo folicular *in vitro* pode ser uma ferramenta importante para avaliar a eficiência da criopreservação, uma vez que lesões foliculares não detectadas pós-descongelamento podem evoluir e serem manifestadas após cultivo. Outra estratégia para avaliar o sucesso da criopreservação consiste no transplante do tecido ovariano, haja vista muitos pesquisadores usarem esse artifício visando à retomada da função ovariana (Arav et al., 2005; Salle et al., 2002, 2003).

Considerações finais

A criopreservação do tecido ovariano se apresenta como uma valiosa ferramenta para a preservação de gametas femininos de mamíferos. Contudo, apesar do sucesso dos protocolos de criopreservação em algumas espécies, os resultados não têm se repetido de forma rotineira, evidenciando que uma melhor compreensão e maiores ajustes nos protocolos de criopreservação poderão auxiliar na obtenção de resultados mais satisfatórios, com taxas de sobrevivência folicular semelhantes ao que ocorre com os folículos frescos. Além disso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que visem ao crescimento de folículos pré-antrais e à maturação de seus oócitos, bem como ao aperfeiçoamento dos transplantes, para que o tecido ovariano armazenado em banco de germoplasma animal/humano possa resultar na propagação dos gametas femininos em larga escala.

Referências bibliográficas

- Aerts JMJ, De Clercq JBP, Andries S, Leroy JLMR, Van Aelst S, Bols PEJ. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology*, v.57, p.163-169, 2008.
- Adashi EY. Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod*, v.9, p.815-827, 1994.
- Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, Schmidt KLT, Andersen AN, Ernst E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.23, p.2266-2272, 2008.
- Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, Gavish Z, Uri M. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod*, v.20, p.3554-3559, 2005.
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Longterm ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C. *Endocrinology*, v.140, p.462-471, 1999.
- Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin JF, Salle B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod*, v.20, p.2745-2748, 2005.
- Borges EN, Silva RC, Futino DO, Rocha-Junior CMC, Amorim CA, Bão SN, Lucci CM. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*, v.59, p.195-200, 2009.
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Winingar JD, Massey JB, Lamb SV, Brackett BG. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, v.61, p.581-594, 2004.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v.70, p.231-239, 2005.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil*, v.110, p.11-19, 1997.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod*, v.10, p.2334-2338, 1995.

- Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Martins FS, Matos MHT, Melo MAP, Bão SN, Rodrigues APR, Silva JRV, Figueiredo, JR.** Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.108, p.309-318, 2008.
- Choi JY, Lee B, Lee E, Yoon B, Bae D, Choi D.** Cryopreservation of ovarian tissue temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. *Cryobiology*, v.56, p.36-42, 2008.
- Cormack DH.** O sistema reprodutor feminino. In: Cormack DH. *Ham histologia*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.485-508.
- Cortvrindt R, Smitz JEJ.** *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.3-9, 2001.
- Deanesly R.** Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol*, v.11, p.197-200, 1954.
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y.** Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist*, v.12, p.1437-1442, 2007.
- Demirci B, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF, Lornage J.** Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep. *Fertil Steril*, v.77, p.595-600, 2002.
- Dobrinsky J.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v.45, p.17-26, 1996.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A.** Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v.16, p.1405-1410, 2004.
- Elmoazzen HY.** *Parameters affecting water permeability across biological cell membranes*. 2000. 141f. Dissertation – University of Alberta: Faculty of Graduate Studies and Research, Edmonton, AB, 2000.
- Elmoazzen HY, Elliott JAW, McGann LE.** Cryoprotectant equilibration in tissues. *Cryobiology*, v.51, p.85-91, 2005.
- Erickson GF.** An analysis of follicles development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, 4: 233-254, 1986.
- Ernst E, Bergholdt S, Jørgensen JS, Andersen CY.** The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.25, p.1280-1281, 2010.
- Fabbri R.** Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. *Cell Tissue Bank*, v.7, p.113-122, 2006.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C.** Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*, v.169, p.39-42, 2000.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV.** Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.143-152, 2007.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.303-327.
- Friedler S, Giudice SC, Lamb EJ.** Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril*, v.49, p.743-764, 1988.
- Fuller B, Paynter S.** Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *RBM Online*, v.9, p.680-691, 2004.
- Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, Bonetti S, Brevini TAL, Ragni G.** Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril*, v.85, p.1150-1156, 2006.
- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Archer J, Lutjen PJ, McBain JC.** Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod*, v.18, p.1772-1781, 2003.
- Gordon I.** Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In: Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: CAB International, Raven Press, 1994. p.293-328.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R.** Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod*, v.9, p.597-603, 1994.
- Green SH, Smith AU, Zuckerman S.** The number of oocytes in ovarian autographs after freezing and thawing. *J Endocrinol*, v.13, p.330-334, 1956.
- Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser, JK.** Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*, v.12, p.101-106, 1997.
- Hafez B, Hafez ESE.** Anatomia da reprodução feminina. In: Hafez B, Hafez ESE. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p.13-29.
- Haidari K, Salehnia M, Valojerdi MR.** The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the *in vitro* maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. *Fertil Steril*, v. 90, p.2389-2397, 2008.
- Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A.** Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology*, v.31, p.336-343, 1994.

- Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, Koyama K.** Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertil Steril*, v.86, p.1182-1192, 2006.
- Hovatta O.** Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *RBM Online*, v.10, p.729-734, 2005.
- Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RML.** Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod*, v.12, p.1032-1036, 1997.
- Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G.** Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectant. *Hum Reprod*, v.11, p.1268-1272, 1996.
- Huang JYJ, Chen H, Tan SL, Chian R.** Effects of osmotic stress and cryoprotectant toxicity on mouse oocyte fertilization and subsequent embryonic development *in vitro*. *Cell Pres Tech*, v.4, p.149-160, 2006.
- Hussein MR.** Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*, v.11, p.162-178, 2005.
- 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*, v.85, p.1208-1215, 2006.
- Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, Lee JY, Suwa Y, Miyahara K, Suzuki H.** Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev*, v.52, p.293-299, 2006.
- Jain JK, Paulson RJ.** Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*, v.86, p.1037-1046, 2006.
- Karlsson JOM, Cravalho EG, Toner M.** Intracellular ice formation: causes and consequences. *Cryo Lett*, v.14, p.323-336, 1993.
- Karlsson JOM, Toner M.** Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, v.17, p.243-256, 1996.
- Karow AM.** Cryobiology 2001 for mammalian embryologist. Augusta, Georgia, USA (Xytex Corporation). Disponível em: <<http://www.xytexinternational.com/pdf/cryobiology>> Acesso em: 17 fev. 2009.
- Kleeberger CA, Lyles RH, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, Giorgi JV.** Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.6, p.14-19, 1999.
- Lin T, Yen J, Kuo T, Gong K, Hsu K, Hsu T.** Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnol*, v.8, p.38-50, 2008.
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Chont M.** Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*, v.64, p.171-178, 2001.
- Liu L, Wood GA, Morikawa L, Ayearst R, Fleming C, McKerlie C.** Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum Reprod*, v.23, p.122-128, 2008.
- 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. *Gynecol Obstet Fertil*, v.34, p.746-753, 2006.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JRV, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of sections of ovarian tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LHR, Rumpf R, Bao SN.** Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1101-1114, 2004.
- Luz, VB, Santos, RR, Pinto, LC, Soares, AAX, Celestino, JJH, Mafezoli, J, Campello CC, Figueiredo, JR, Rodrigues, APR.** DMSO perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. *Fertil Steril*, v.91, p.1513-1515, 2009.
- Maltaris T, Dimmler A, Müller A, Binder H, Hoffmann I, Kohl J, Siebzehrnrußl E, Beckmann MW, Dittrich R.** The use of an open-freezing system with self-seeding for cryopreservation of mouse ovarian tissue. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.250-254, 2005.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Alvarez S, Debache C, Salat-Baroux J, Cohen J.** Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod*, v.2, p.709-715, 1988.
- Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J.** Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril*, v.82, p.1390-1394, 2004.
- Mazur P.** Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Origin Life*, v.10, p.137-159, 1980.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY.** A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*, v.71, p.345-355, 1972.
- Mazur P, Rall WF, Leibo SP.** Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys*, v.6,

- p.197-213, 1984.
- McGee HA Jr, Martin WJ.** Cryochemistry. *Cryogenics*, v.2, p.1-11, 1962.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J.** Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*, v.353, p.318-321, 2005.
- Meryman HT.** Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu Rev Biophys*, v.3, p.341-363, 1974.
- Moniruzzaman M, Bao RM, Taketsuru H, Miyano T.** Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, v.72, p.280-288, 2009.
- Neto V, Buff S, Lornage J, Bottollier B, Guérin P, Joly T.** Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.89, p.1348-1356, 2008.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R.** Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.11, p.1487-1491, 1996.
- Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG.** Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod*, v.13, p.376-380, 1998.
- Newton H, Illingworth P.** *In vitro* growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.16, p.423-429, 2001.
- Oktay K, Karlikaya G.** Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med*, v.342, p.1919, 2000.
- Oktay K, Newton H, Aubard Y.** Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril*, v.354, p.1-7, 1998.
- Paynter SJ.** Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Updated*, v.6, p.449-456, 2000.
- Pinto LC, Santos RR, Faustino LR, Silva CMG, Luz VB, Maia Júnior JE, Soares AAX, Celestino JJH, Mafezoli J, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Quantification of dimethyl sulfoxide perfusion in sheep ovarian tissue: a predictive parameter for follicular survival to cryopreservation. *Biopreservation Biobanking*, v.6, p.269-276, 2008.
- Radford J.** Restoration of fertility after treatment for cancer. *Horm Res*, v.59, p.21-23, 2003.
- Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, v.24, p.387-402, 1985.
- Rall WF, Reid DS, Polge C.** Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology*, v.21, p.106-121, 1984.
- Revel A, Elami A, Bor A, Yavin S, Natan Y, Arav A.** Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertil Steril*, v.82, p.1714-1715, 2004.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004a.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.211-227, 2004b.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Santos RR, Lucci CM, Nunes JF, Figueiredo JR.** Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Rum Res*, v.56, p.103-111, 2005.
- Salehnia M, Moghadam EA, Velojerdi MR.** Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.78, p.644-645, 2002.
- 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. *Fertil Steril*, v.80, p.172-177, 2003.
- 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*, v.77, p.403-408, 2002.
- Santos I.** Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal, *Rev Bras Fisiol Veg*, v.12, ed. especial, p.70-84, 2000.
- Santos RR.** *Criopreservação de foliculos pré-antrais ovinos*. 2005. 182f. Tese - Universidade Estadual do Ceará: Faculdade de Medicina Veterinária, Fortaleza, CE, 2005.
- Santos RR, Celestino JJH, Lopes CAP, Melo MAP, Rodrigues APR, Figueiredo JR.** Criopreservação de foliculos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.9-15, 2008.
- Santos RR, Knijn HM, Vos PL, Oei CH, Van Loon T, Colenbrander B, Gadella BM, Van den Hurk R, Roelen BA.** Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertil Steril*, v.91, p.1455-1458, 2009.
- Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haeften T, Van den Hurk R.** Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res*, v.325, p.523-531, 2006.
- Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JRV, Van den Hurk R.** Vitrification of goat

- preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*, v.327, p.167-176, 2007.
- Saumande J.** Ovogenèse et folliculogénèse. *Rec Méd Vét*, v.157, p.29-38, 1991.
- Segino M, Ikeda M, Hirahara F, Sato K.** *In vitro* development of cryopreserved mouse ovarian tissue. *Reproduction*, v.130, p.187-192, 2005.
- Shaw JM, Wood EC, Trounson AO.** Cryopreservation of oocyte and embryo. In: Trounson A, Gardner D. *Handbook of In vitro fertilization*. 2 ed. Florida: CRC Press, 2000a. p.376-380.
- Shaw JM, Cox SL, Trounson AO, Jenkin G.** Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrin*, v.161, p.103-110, 2000b.
- Silva JRV.** *Growth factors in goat ovaries and the role of activina-A in the development of early-staged follicles*. 2005. 142f. Thesis (PhD) - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, 2005.
- Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, Clair J, Caulfield MJ.** Development and validation of a gamma interferon elispot assay for quantization of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.18, p.871-879, 2001.
- Steponkus PL, Weist SC.** Plasma membrane alterations following cold acclimation and freezing. In: Li PH, Sakai A. *Plant cold hardiness and freezing stress-mechanisms and crop implications*. New York: Academic Press, 1978. p.75-91.
- Sugimoto M, Miyamoto H, Kabasawa T, Manabe N.** Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification. *Cryo-Lett*, v.17, p.93-98, 1996.
- Széll A, Shelton JN.** Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fertil*, v.78, p.699-703, 1986.
- Taylor MJ, Busza AL.** A convenient, non-invasive method for measuring the kinetics of permeation of dimethyl sulphoxide into isolated corneas using NMR spectroscopy. *Cryo Lett*, v.13, p.273-282, 1992.
- Thomas N, Busza A, Cooper A, Paynter S, Fuller B, Shaw R.** Measurement of permeating levels of cryoprotectant during ovarian tissue cryopreservation using H-NMR spectroscopy in human and porcine ovaries. *Cryo Lett*, v.18, p.179-184, 1997.
- Thomaz BAC, Simões MLPB, Almodin CG, Câmara VCM, Ceschin AP, Ioshii SO.** Aspectos histológicos de ovários de coelhas após criopreservação. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v.27, p.642-649, 2005.
- Tsuribe PM, Gobbo CAM, Landim-Alvarenga FC.** Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. *Fertil Steril*, v.91, p.1976-1983, 2009.
- Van den Broecke R, Liu J, Handyside A, Van der Elst JC, Krausz T, Dhont M, Winston RM, Hovatta O.** Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.97, p.193-201, 2001.
- Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM.** Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril*, v.83, p.1248-1254, 2005.
-