

ASSOCIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PARA A OBTENÇÃO DE EMBRIÕES CAPRINOS.

(Cryopreservation and in vitro culture of ovarian preantral follicles to obtaining goat embryos)

Ana Paula Ribeiro RODRIGUES¹, Simone Vieira CASTRO¹, Roberta Nogueira CHAVES¹, José Ricardo de FIGUEIREDO¹.

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Av. Paranjana, n 1700, Campus do Itaperi, Bairro Itaperi, CEP 60700-000 Fortaleza, CE, Brasil.
E-mail para correspondência: aprrdrigues@yahoo.com.br

RESUMO

A criopreservação tem sido de extrema importância para a preservação de material genético de machos e fêmeas para a utilização posterior em programas de reprodução assistida. Por essa razão, o emprego da criopreservação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais tem se mostrado como uma ferramenta complementar para as biotecnologias da reprodução que visam maximizar o potencial reprodutivo de animais de grande valor genético mesmo após a morte ou descarte programado. A aplicação da criopreservação de folículos pré-antrais, isolados ou inclusos no tecido ovariano, permitirá a implantação de bancos de germoplasma animal/humano, com o intuito de preservar o patrimônio genético e, conseqüentemente, a preservação e manutenção da fertilidade de fêmeas. Vários estudos em diferentes espécies, notadamente em humanos, têm demonstrado a retomada da função reprodutiva relatando inclusive o nascimento de crias saudáveis após transplante de tecido ovariano previamente criopreservado. No

entanto, em pequenos ruminantes, especialmente em caprinos, os avanços ainda são pouco significativos. Portanto, conclui-se que mais estudos são requeridos com o objetivo de definir um protocolo (congelamento lento ou vitrificação) que garanta a viabilidade e função ovariana e folicular, normais após a descongelamento/aquecimento.

Palavras-chave: criopreservação, folículo pré-antral, ovário, banco de germoplasma, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Cryopreservation has been extremely important for the preservation of male and female genetic material for later use in assisted reproduction procedures. Thus, the use of cryopreservation of oocytes enclosed in preantral follicles has been shown as a complementary tool for the reproduction biotechnologies aimed at maximizing the reproductive potential of animals of great genetic value even after death, unexpected or not, as well as after planned elimination. The application of isolated or *in situ* preantral follicles cryopreservation, will allow salvage animal genetic resources in gene/banks animal / or even genetic human, and consequently to preserve and maintaining the female fertility. Several studies in different species, especially humans, have demonstrated the resumption of reproductive function including reporting the birth of healthy offspring after transplantation of cryopreserved ovarian tissue previously. However, in small ruminants, especially in goats, improvements are still not very significant. Therefore, it is concluded that further studies are required in order to define a protocol (slow freezing or vitrification) that ensures the viability and normal function of ovary and preantral follicles after thawing/warming.

Key words: Cryopreservation, preantral follicle, ovarian, gene banking, *in vitro* culture.

INTRODUÇÃO

A criopreservação e estocagem de material genético de sêmen e embriões é uma ferramenta bastante utilizada na reprodução animal assistida com o intuito de maximizar

a produtividade utilizando recursos de animais geneticamente superiores. No entanto, a expressão *preservação de material genético* é bastante ampla, refere-se não somente ao material oriundo de machos, mas também do material genético de fêmeas, o qual pode ser realizado através da crioestocagem de células germinativas, presentes no ovário mamífero.

Embora, tendo sido iniciada no final dos anos 50 (Parkes & Smith, 1953), estudos envolvendo a criopreservação de tecido ovariano foram bastante intensificados na década de 90, inclusive com o relato em 1994 do primeiro nascimento de um cordeiro após o transplante de tecido ovariano previamente congelado (Gosden et al., 1994). Exatamente dez anos mais tarde, Donnez e sua equipe (Donnez et al., 2004) relataram o nascimento de uma criança utilizando também a associação das técnicas de transplante e criopreservação de tecido ovariano humano. A partir de então dezenas de estudos têm demonstrado o potencial da técnica de criopreservação de tecido ovariano como alternativa para a manutenção e preservação do material genético de fêmeas e, retomada da função reprodutiva.

Especificamente na medicina reprodutiva humana, tem sido observado que a aplicação do transplante de ovário é a alternativa de eleição para a retomada da função reprodutiva. No entanto, na medicina veterinária, sobretudo no que concerne aos animais de produção, considerando o fato de envolver o animal a um procedimento cirúrgico e pós-cirúrgico, a prática de transplante de ovário é pouco prática, onerosa para o produtor, sendo, portanto, considerada com uma baixa relação custo-benefício. Porém, todos esses inconvenientes poderão ser eliminados se o material criopreservado (folicúlos pré-antrais presentes no tecido ovariano) for submetido ao cultivo *in vitro*, utilizando a tecnologia do ovário artificial.

O cultivo *in vitro* de folicúlos ovarianos pré-antrais ou tecnologia do ovário artificial tem sido desenvolvida e aperfeiçoada em um grande projeto coordenado pelo professor José Ricardo de Figueiredo no Laboratório de manipulação de oócitos e folicúlos ovarianos pré-antrais (LAMOFOPA) com a finalidade de permitir o crescimento e desenvolvimento até a maturação de oócitos contidos nos milhares de folicúlos pré-antrais presentes no ovário e, conseqüentemente aumentar o potencial reprodutivo de um animal. Esse trabalho foi elaborado com o objetivo de mostrar a

viabilidade da associação das técnicas de criopreservação de tecido ovariano e ovário artificial visando à obtenção de um grande número de embriões produzidos *in vitro*.

Princípios gerais da criopreservação

A criopreservação consiste na conservação do material biológico, por tempo indefinido a temperaturas negativas (Rubinsky, 2003), para que quando descongelado, o material biológico possa prosseguir seu desenvolvimento normal (Pegg, 2007). Comumente, é utilizado o nitrogênio líquido, cuja temperatura de -196 °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 (Sheikhiet al., 2011). Porém, para que não haja danos letais às células, é necessária a utilização de um agente crioprotetor na composição da solução de criopreservação, cuja concentração depende do método de criopreservação empregado.

O processo de criopreservação pode ser realizado por congelação lenta ou por vitrificação que divergem entre em 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 (Yamakiet 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).

Por que criopreservar tecido ovariano

O ovário mamífero alberga o pool de folículos pré-antrais que funciona como a reserva oocitária por toda a vida da fêmea (Paris et al., 2009). Centenas de oócitos

imaturos, no interior desses folículos encontram-se no córtex ovariano e podem ser criopreservados *in situ* (inclusos no tecido ovariano). Os oócitos imaturos presentes no interior dos folículos pré-antrais parecem ser mais resistentes ao processo de criopreservação do que oócitos maduros. Outra grande vantagem da criopreservação do córtex, e consequentemente dos milhares de folículos nele contido, é que a colheita independe da idade e fase do ciclo estral (Shaw et al., 2000) além de envolver menos questões éticas e sociais que a criopreservação de oócitos e embriões, sobretudo quando esse processo é realizado na espécie humana (Zhang et al., 2009). Desta forma a criopreservação de tecido ovariano desperta grande interesse para a reprodução clinicamente assistida em humanos, especialmente para mulheres que necessitam iniciar de imediato o tratamento contra o câncer, não havendo atraso no tratamento (Zhou et al., 2010), sendo também uma alternativa para meninas que ainda não tenham atingido a puberdade ou mulheres que não possuam parceiros para a doação de gametas masculinos (Varghese et al., 2008). Para a medicina veterinária, a criopreservação de tecido ovariano tem uma grande importância, sobretudo para animais domésticos de alto valor genético que venham a óbito de forma inesperada (Shaw et al., 2000), linhagens de animais de laboratório geneticamente modificados, ou até mesmo para os programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção.

Resultados da criopreservação de tecido ovariano de pequenos ruminantes

Na espécie caprina, já foi demonstrado que folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano podem ser criopreservados isolados ou *in situ* (Rodrigues et al., 2006), mantendo a morfologia (Rodrigues et al., 2004; Luz et al., 2009) viabilidade (Santos et al., 2006) e ultraestrutura (Castro et al., 2011). Embora ainda não tenha sido relatado nascimento de animais após criopreservação de tecido ovariano caprino, já foi descrita a retomada da função ovariana após transplante do tecido ovariano congelado/descongelado (Santos et al., 2009).

Na tentativa de melhor avaliar os efeitos da congelação de folículos pré-antrais caprinos, isolados ou inclusos no tecido ovariano, foi realizado após criopreservação o cultivo folicular por até cinco dias (Rodrigues et al., 2006). A viabilidade dos folículos *in situ*, criopreservados e cultivados foi similar ao controle cultivado. Para os folículos

isolados, a porcentagem de folículos viáveis somente foi similar ao controle cultivado após congelamento. Além disso, nossa equipe também congelou folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano caprino, na ausência ou presença de sacarose. Os resultados mostraram que o tratamento contendo a sacarose apresentou percentual de folículos viáveis similar aos folículos cultivados sem prévia criopreservação (Santos et al., 2006). Em 2007, foi realizado pela primeira vez a vitrificação de folículos pré-antrais em tecido ovariano caprino. Nesse estudo, os autores mostraram que esse método de criopreservação também é capaz de manter a viabilidade semelhante à observada em folículos não vitrificados (Santos et al., 2007).

Considerando os excelentes resultados obtidos com a criopreservação de tecido ovariano em ruminantes, acredita-se que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antraiscriopreservados no córtex do ovário é uma alternativa promissora para a obtenção de um grande número de oócitos fertilizáveis para a obtenção de embriões produzidos *in vitro*, oriundos de animais de grande interesse genético, comercial ou para a biodiversidade que estejam impedidos de assumir a sua função reprodutiva ou mesmo após sua morte. Os tópicos a seguir mostram a evolução do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano.

Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

Os primeiros estudos realizados com o cultivo *in situ* de folículos pré-antrais tiveram o intuito de estabelecer um meio de base que atendesse as necessidades para o desenvolvimento *in vitro* dessa estrutura. Uma solução a base de água de coco (SBAC), Meio Essencial Mínimo (MEM) e adição dessas duas substâncias foi inicialmente empregada para o cultivo de folículos pré-antrais caprinos, em que foi verificado que o MEM apresenta as melhores taxas de sobrevivência e ativação folicular (Silva et al., 2004). Posteriormente, Matos et al., (2006) testaram somente a auxina presente na água de coco, denominado ácido 3-indol acético (IAA), a qual aumentou a ativação de folículos primordiais, porém a microscopia eletrônica não confirmou a manutenção da integridade morfológica (Matos et al., 2006).

A importância do uso de antioxidantes tais como o α -tocoferol, ternatina e ácido ascórbico também foram investigados. Quando o α -tocoferol e a ternatina foram

estudados verificou-se que esses antioxidantes também não mantiveram a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos cultivados por 5 dias, bem como não tiveram efeito adicional sobre a ativação e o crescimento folicular (Lima-Verde et al., 2009). Por outro lado, o ácido ascórbico mostrou ser um importante antioxidante para o cultivo *in vitro* de folículos caprinos por um período de 14 dias, mantendo a integridade, além de promover a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos (Rossetto et al., 2009).

Os efeitos de hormônios e fatores de crescimento ovarianos sobre a regulação da foliculogênese, também foram investigados. O hormônio folículo estimulante (FSH) na concentração de 50 ng/mL demonstrou manter a integridade morfológica, além de estimular a ativação de folículos primordiais e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos após 7 dias de cultivo (Matos et al. 2007). Saraiva et al. (2008) demonstraram que o FSH (50 ng/mL) associado com uma baixa concentração de LH (1 ng/mL) também manteve a integridade ultraestrutural porém, altas concentrações de LH (5 ng/mL) associadas ou não ao FSH induziram a atresia. Além das gonadotrofinas, outros hormônios como o estradiol (Lima-Verde et al., 2010), GH (Martins et al., 2010), insulina (Chaves et al., 2011a) apresentaram efeitos benéficos sobre a sobrevivência e o desenvolvimento folicular.

A influência de vários fatores de crescimento intraovarianos no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos também foi reportado. Muitos desses fatores de crescimento são pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformante β (ativina, a folistatina, as BMPs -6, -7 e -15 e GDF-9), a família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-2, FGF-7 e FGF-10), neurotrofinas (VIP e NGF), além do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), KL, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator inibidor de leucemia (LIF) (Chaves et al., 2011b).

Apesar dos importantes resultados obtidos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais no tecido ovariano utilizando diferentes substâncias, constatou-se que somente a partir da utilização de um meio de base que continha FSH sequencial suplementado com LH (100 ng/mL) e EGF (100 ng/mL) (Saraiva et al., 2010) ou GH (50 ng/mL) (Magalhães et al., 2011), para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados e não presentes no córtex ovariano foi possível a obtenção dos primeiros

embriões caprinos oriundos de folículos secundários isolados crescidos, maturados e fecundados *in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente já é conhecido e estabelecido que o material genético de fêmeas, ou seja, oócitos inclusos em folículos pré-antrais pode ser criopreservado e armazenados com sucesso em baixíssima temperatura (-196°C). Além disso, esse material após remoção do nitrogênio líquido é perfeitamente viável como demonstrado pelo nascimento oriundo de gestações obtidas a partir de tecido ovariano transplantado e previamente criopreservado, relatados por diferentes equipes de pesquisadores.

Além do transplante, o tecido ovariano após criopreservação também pode ser cultivado *in vitro* visando o crescimento e desenvolvimento folicular e maturação oocitária visando à obtenção de embriões produzidos *in vitro*. No entanto, em animais domésticos como os caprinos, apesar de já ter sido relatado a produção de embriões a partir de folículos pré-antrais, bem como o sucesso da criopreservação desses folículos, os resultados de pesquisas envolvendo o cultivo *in vitro* de folículos caprinos previamente criopreservados ainda são pouco conclusivos. Portanto, acredita-se que muitos desafios nessa área ainda devem ser enfrentados de modo que um protocolo ideal seja estabelecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; CAMPELLO, C.C.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains culture of ovarian tissue. *Cell and Tissue research*, v. 346, p. 283-292, 2011.

CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.C.V.; FAUSTINO, L.R.; OLIVEIRA, K.P.L.; CAMPELLO, C.C.; LOPES, C.A.P.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell&TissueResearch*, v.346, n. 3, p. 451-456, 2011a.

CHAVES, R.N. Efeito do Fator de Crescimento do Nervo (NGF), Fator de Crescimento de Fibroblasto-10 (FGF-10) e insulina sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículo pré-antrais caprinos. 2011b. 391p. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDON, a. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v. 364, n. 9443, p. 1405-1410, 2004.

GOSDEN, R.G.; BAIRD, D.T.; WADE, J.C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Human Reproduction*, v. 9, n. 597, p. 60, 1994.

LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; MARTINS, F.S.; SANTOS, R.R.; BÁO, S.N.; LUQUE, M.C.A.; VIEIRA, G.A.B.; SILVEIRA, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Effects of α -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 1, p. 57-65, 2009.

LIMA-VERDE, I.B.; SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; TENÓRIO, S.B.; MARTINS, F.S.; CUNHA, L.D.; NAME, K.P.O.; BÁO, S.N., CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Interaction between estradiol and follicle stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprinepreantral follicles. *Cells Tissues Organs*, v. 191, n. 3, p. 240-247, 2010.

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.

MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOARES, T.G.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.;

FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.H.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C.M.G.; LIMA-VERDE, I.B.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010.

MATOS, M.H.T.; VAN DEN HURK, R.; MARTINS, F.S.; SANTOS, R.R.; LUQUE, M.C.A.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural features of caprinepreantral follicles after *in vitro* culture in the presence or absence of indole-3-acetic acid. *Animal Reproduction*, v. 3, n. 4, p. 415-422, 2006.

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A.; MAIA JR, J.E.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, A.M.; FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprinepreantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 15, n. 2, p. 173-182, 2007.

PARIS, M.C.J.; ANDERSEN, C.Y.; SHAW, J.M. Ovarian cryopreservation and grafting: its potential for human reproductive biology and animal conservation. *Animal Reproduction*, v.6, p.96-113, 2009.

PARKES, A.S.; SMITH, A.U. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 140, p. 455-470, 1953.

PEGG, D.E. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. In: *Molecular Biology*. 2nd edn. Totowa: Humana Press Inc., 348p, 2007.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.

Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 61, p. 1009-1024, 2004.

RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; NUNES, J.F.; RONDINA, D.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. *Cell Pres Tech*, v. 4, p. 290-67, 2006.

ROSSETO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F.S.; FAUSTINO, L.S.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.; NAME, K.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 37, n. 2, p. 112–123, 2009.

RUBINSKY, B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews*. 8: 277-284, 2003.

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, R.R.; THARASANIT, T.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN HAEFTEN, T.; VAN DEN HURK, R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell and Tissue Research*, v. 325, p. 523-531, 2006.

SANTOS R.R.; THARASANIT T.; Van HAEFTEN T.; FIGUEIREDO J.R.; SILVA J.R.V. & Van den HURK R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*, v. 327, p. 167-176, 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

SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SILVA, G.M.; PORFIRIO, E.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J. R.. Influence of different concentrations of LH and FSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. *Small Ruminant Research*, v. 78, p. 87-95, 2008.

SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; ALMEIDA, A.P.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES, D.M.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamic medium produces caprine embryo From Preantral Follicles Grown In Vitro. *Reproductive Sciences*, v. 17, n. 12, p. 1135-1143, 2010.

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*. 2011.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; NUNES, A.P.A.; FERREIRA, F.V.A.; LÔBO, R.N.B.; FIGUEIREDO, J.R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, v. 81, n. 3-4, p. 273-286, 2004.

VARGHESE, A.C.; DU PLESSIS, S.S.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and *in vitro* maturation of follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. *Reproductive Biology Endocrinology*, v.6, p.1-10, 2008.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60, 11-22, 2010

YAMAKI, S.B.; PEDROSO, A.G.; ATVARIS, T.D.Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físicoquímica). *Química Nova* v.25, p.330-334, 2002.

ZHANG, J.M.; LI, L.X.; LIU, X.L.; YANG, Y.X.; WAN, X.P. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *Journal Assisted Reproduction and Genetics* v.26, p.137–142, 2009.

ZHOU, X.H.; WU, Y.J.; SHI, J.; XIA, Y.X.; ZHENG, S.S. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*, v.60, n. 2, p. 101-105, 2010