

**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Animal**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIIS  
SUÍNOS**

**EMILY NÓBREGA BORGES**

**Dissertação de Mestrado**

**2009**

**Universidade de Brasília – UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Animal**

## **CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS SUÍNOS**

**Orientadora: Profa. Dr. Carolina Madeira Lucci**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal da Universidade de  
Brasília como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do  
título de Mestre em Biologia Animal.**

**Brasília – DF**

**2009**

## Ficha Cartográfica

Name, Emily Nóbrega Borges

Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais suínos

Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.  
Universidade de Brasília. 2009.

xiii + 75p: il.

Dissertação: Mestrado em Biologia Animal

1. Crioprotetores; 2. Cultivo *in vitro*; 3. Ultra-estrutura; 4. Histologia.

I – Universidade de Brasília

II – Título

“É difícil perder-se. É tão difícil que provavelmente arrumarei depressa um modo de me achar, mesmo que achar-me seja de novo a mentira de que vivo.”

"Mas tenho medo do que é novo e tenho medo de viver o que não entendo - quero sempre ter a garantia de pelo menos estar pensando que entendo, não sei me entregar à desorientação."

“O que me atormenta é que tudo é 'por enquanto', nada é 'sempre'”

“Eu não sou tão triste assim, é que hoje eu estou cansada...”

**Clarice Lispector**

## DEDICATÓRIA

À minha avó Luzia: “Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.”  
Clarice Lispector.

## Agradecimentos

À Prof<sup>a</sup>. Dra Chefia: "Às vezes por uma palavra tua ou por uma palavra lida, de repente tudo se esclarece"; "Ouve-me, ouve o meu silêncio. O que falo nunca é o que falo e sim outra coisa. Capta essa outra coisa de que na verdade falo porque eu mesma não posso." Clarice Lispector.

Ao meu pai: "Depois de toda luta e cada descanso, quero me levantar forte e pronta, como um cavalo novo." Clarice Lispector.

À minha mãe: "... e ela cada vez maior, vacilante, tímida, gigantesca se conseguisse chegar mais perto de si mesma, ver-se-ia ainda maior... e em cada olho podia-se-lhe mergulhar dentro e nadar sem saber que era um olho..." Clarice Lispector.

À minha amiga Renatinha: "O que obviamente não presta sempre me interessou muito" "Até cortar os próprios defeitos pode ser perigoso. Nunca se sabe qual é o defeito que sustenta nosso edifício inteiro" Clarice Lispector.

Ao Mica: "Acho que devemos fazer coisa proibida - senão sufocamos. Mas sem sentimento de culpa e sim como aviso de que somos livres." Clarice Lispector.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB-UnB pelas condições oferecidas: "... O que me mata é o cotidiano. Eu queria só exceções." Clarice Lispector.

Ao meu cachorro Dicky (in memoriam): "Por enquanto estou inventando a tua presença..." Clarice Lispector.

Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo por disponibilizar o Laboratório de Morfologia e Morfogênese: "Sou como vc me vê Posso ser leve como uma brisa, ou forte como uma ventania, depende de quando, e como vc me vê passar" Clarice Lispector.

Ao professor Umberto Euzébio por disponibilizar seu laboratório: "A harmonia secreta da desarmonia. Quero não o que está feito, mas o que tortuosamente ainda se faz" Clarice Lispector

À Capes pela bolsa disponibilizada: "As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas."

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos". Clarice Lispector.

Aos membros da banca examinadora: "Não me corrijam. A pontuação é a respiração da frase, e minha frase respira assim. E se você me achar esquisita, respeite também. Até eu fui obrigada a me respeitar" Clarice Lispector.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Por que criopreservar células germinativas femininas?.....	3
2.2 As células germinativas femininas e os os folículos ovarianos.....	4
2.2.1 Folículos Pré-antrais.....	5
2.2.2 Folículos Antrais .....	9
2.3 Células germinativas que podem ser criopreservadas .....	10
2.4 Criopreservação .....	16
2.4.1 Bases Físicas e biológicas.....	16
2.4.2 Crioprotetores .....	19
2.4.3 Métodos de congelamento.....	23
2.4.3.1 Métodos de criopreservação lenta .....	23
2.4.3.2 Métodos de criopreservação rápida.....	24
2.4.3.3 Vitrificação .....	24
2.4.4 Descongelamento.....	26
2.5 Métodos de avaliação da viabilidade folicular .....	26
2.5.1 Análise por Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão.....	26
2.5.2 Descrição por histologia e microscopia eletrônica de transmissão.....	27
2.5.3 Cultivo <i>in vitro</i> .....	29
2.5.4 Outros métodos de avaliação .....	30
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Objetivos Geral .....	33
4.2 Objetivos Específicos.....	33
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
5.1 Obtenção e processamento dos ovários.....	34
5.2 Congelamento do tecido ovariano .....	35
5.3 Descongelamento do tecido ovariano.....	36
5.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	36



5.5 Análise histológica .....	37
5.6 Avaliação ultra-estrutural .....	38
5.7 Análise estatística .....	39
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema apresentando o desenvolvimento dos folículos ovarianos de mamíferos.....	4
<b>Figura 2:</b> Secção histológica e desenho esquemático de folículos pré-antrais.....	5
<b>Figura 3:</b> Ultraestrutura de folículo pré-antral morfologicamente normal .....	7
<b>Figura 4:</b> Esquema mostrando os folículos pré-antrais visualizados na microscopia eletrônica de transmissão .....	8
<b>Figura 5:</b> Formação de cristais de gelo e alterações osmóticas que acompanham a criopreservação. ....	17
<b>Figura 6:</b> Lesões celulares antes e depois do índice de máxima sobrevivência embrionária.....	18
<b>Figura 7:</b> Estrutura química dos crioprotetores GLY, EG, PROH e DMSO.....	20
<b>Figura 8:</b> Alteração osmótica em ovócito em função da exposição ao crioprotetor ...	22
<b>Figura 9:</b> Curva de congelamento lenta.....	24
<b>Figura 10:</b> Folículo pré-antral análise histológica.....	28
<b>Figura 11:</b> Congelador Programável.....	35
<b>Figura 12:</b> Curva de congelamento Rápida .....	36
<b>Figura 13:</b> Protocolo Experimental para testar o efeito de diferentes crioprotetores na morfologia de folículos pré-antrais em tecido ovariano suíno criopreservado .....	37
<b>Figura 14:</b> Porcentagem média de folículos pré-antrais totais morfologicamente normais .....	41
<b>Figura 15:</b> Porcentagem de folículos primordiais morfologicamente normais.....	42
<b>Figura 16:</b> Porcentagem de folículos em crescimento morfologicamente normais ....	43
<b>Figura 17:</b> Análise histológica de folículos pré-antrais .....	44
<b>Figura 18:</b> Análise por microscopia eletrônica de transmissão de folículos do controle e controle CIV .....	45
<b>Figura 19:</b> Análise por microscopia eletrônica de transmissão de folículos criopreservados com DMSO antes e depois do CIV.....	46
<b>Figura 20:</b> Análise por microscopia eletrônica de transmissão de folículos criopreservados com EG antes e depois do CIV .....	47

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Características que influenciam a sensibilidade ao congelamento e fatores que favorecem a criopreservação.....	13
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = Análise de Variância

CIV = Cultivo *in vitro*

DMSO = Dimetilsulfóxido

D. P. = Desvio Padrão

EG = Etilenoglicol

FMN = Folículo Morfologicamente Normal

GLY = Glicerol

ITS = Insulina Transferrina Selênio

MET = Microscopia eletrônica de Transmissão

MIV = Maturação *in vitro*

ML = Microscopia de Luz

MII = Metáfase II

OPS = Open pulled straw

PBS = Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salina)

PROH = Propanoglicol

SFB = Soro Fetal Bovino

VG = Vesícula Germinativa

ZP = Zona pelúcida

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes crioprotetores na criopreservação de tecido ovariano suíno. Ovários suínos (n=3) foram coletados em abatedouro local. De cada ovário foram retiradas 10 fatias do córtex ovariano, sendo uma imediatamente fixada (controle) e outra submetida ao cultivo *in vitro* (Controle CIV). As outras 8 amostras foram criopreservadas, em pares, usando 4 diferentes crioprotetores: DMSO (1,5 M), etilenoglicol (EG 1,5 M), glicerol (GLY 10%) ou propanoglicol (PROH 1,5M) adicionados de 0,4% de sacarose. As amostras foram congeladas pelo método lento e estocadas em nitrogênio líquido por 7 dias. Posteriormente, o tecido ovariano foi descongelado, o crioprotetor foi removido por lavagens sucessivas em meio contendo concentrações decrescentes dos crioprotetores em questão e 0,4% de sacarose. Após a remoção do crioprotetor uma amostra de cada tratamento foi imediatamente fixada e a outra colocada em cultivo *in vitro* (CIV) com duração de 2 horas e em seguida fixada. As amostras foram processadas para histologia e microscopia eletrônica de transmissão. A porcentagem de folículos morfologicamente normais (FMN) após a criopreservação utilizando DMSO (67,0±4,9), EG (81,8±1,4) e PROH (55,9±9,9) foi significativamente menor ( $P<0,05$ ) do que a observada no controle fresco (97,7±1,2). Quando o tecido ovariano foi criopreservado com GLY, nenhum folículo morfologicamente normal foi encontrado (0%). Depois do CIV, o tecido criopreservado com PROH (40,1±2,9) apresentou a menor porcentagem de FMN quando comparado aos outros tratamentos e ao controle (85,1±3,3 DMSO CIV; 84,6±3,4 EG CIV; 97,5±1,2 controle CIV). Em geral, a ultraestrutura dos folículos criopreservados com DMSO ou EG, antes e após o cultivo *in vitro*, foi similar. Apesar de sua ultraestrutura não ter sido muito diferente do controle, algumas alterações leves puderam ser observadas. Em conclusão, a criopreservação de tecido ovariano suíno utilizando DMSO ou EG permite a preservação de um grande número de folículos pré-antrais com morfologia normal.

Palavras-chave: Crioprotetores; Cultivo *in vitro*; Ultra-estrutura; Histologia.

## ABSTRACT

The present work aimed to test different cryoprotectants on cryopreservation of pig ovarian tissue. Pig ovaries (n=3) were collected at a local slaughterhouse. From each ovary 10 cortex slices were taken, and one was immediately fixed (control) and another placed in *in vitro* culture (IVC control). The other 8 samples were cryopreserved, in pairs, using 4 different cryoprotectants: DMSO (1.5 M), ethylene glycol (EG - 1.5 M) glycerol (GLY - 10%) or propanediol (PROH - 1.5 M) with 0.4% sucrose. Samples were slowly cooled and stored in liquid nitrogen for 7 days. After thawing and cryoprotectant removing, one sample from each treatment was immediately fixed and the other was placed in *in vitro* culture (IVC) for 2h and then fixed. Samples were processed for histology and transmission electron microscopy. The percentages of morphologically normal follicles (MNF) in cryopreserved tissue using DMSO (67.0±4.9), EG (81.8±1.4) and PROH (55.9±9.9) were significantly lower ( $P<0.05$ ) than the observed in fresh control tissue (97.7±1.2). When ovarian tissue was cryopreserved with GLY no morphologically normal follicle could be found (0%). After IVC, PROH (40.1±2.9) presented significantly lower percentage of MNF compared to all other treatments and to the control (85.1±3.3 DMSO IVC; 84.6±3.4 EG IVC; 97.5±1.2 control IVC). In general, the ultrastructure of follicles cryopreserved with DMSO or EG, before and after *in vitro* culture, was similar. Although their ultrastructure was not very different from control follicles, some alterations could be observed. Signs of advanced degeneration were not observed. In conclusion, the cryopreservation of pig ovarian tissue using DMSO or EG allows a good number of MNF.

Keywords: Cryoprotectant; *in vitro* culture; Ultrastructure; Histology.



## 1. INTRODUÇÃO

Com o advento das tecnologias de reprodução assistida e os avanços no entendimento da criobiologia, estratégias têm sido desenvolvidas permitindo o armazenamento de gametas e embriões (Picton *et al.*, 2000). Os embriões e as células germinativas passaram a ser preservados, por longos períodos, em temperaturas nas quais a atividade biológica esteja bastante diminuída, a do nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Hafez, 2004).

Existem diversos tipos de células reprodutivas e tecidos que podem ser conservados. Porém, enquanto a criopreservação de alguns tipos de células já está estabelecida, os resultados para outros tipos celulares são limitados, existindo baixa viabilidade após a descongelamento.

A conservação de células germinativas femininas possui diversas aplicações nas diferentes espécies animais, possibilitando, entre outras vantagens, a preservação de material genético de espécies em vias de extinção. Com relação especificamente aos suínos, a criopreservação apresenta uma grande vantagem auxiliando na proteção de espécies de animais pertencentes à mesma família do suíno, como o cateto (*Tayassu tajacu*) e o queixada (*Tayassu pecari*).

Porém, nessa espécie, as células germinativas femininas, os ovócitos de folículos antrais, são extremamente sensíveis à baixas temperaturas, não existindo relatos de sucesso do método tradicional de criopreservação lenta para essas células (Somfai *et al.* 2007). Os efeitos degenerativos que ocorrem nos ovócitos dessa espécie, após o congelamento, podem ser observados depois da maturação



*in vitro* (MIV) incluindo redução da formação normal do fuso meiótico e decréscimo da maturação nuclear e citoplasmática (Liu *et al.* 2003).

Todavia, uma alternativa para estocar células germinativas femininas é a criopreservação de tecido ovariano. Esse método proporciona o estoque de um grande número de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais.

Ao contrário dos ovócitos crescidos, os ovócitos de folículos pré-antrais, especialmente os primordiais, presentes no tecido ovariano toleram a criopreservação muito bem. Essa maior tolerância se deve a várias características que os tornam menos vulneráveis à crioinjúria, sendo as mais importantes: a) o pequeno tamanho do ovócito, b) a baixa taxa metabólica c) o estágio de ciclo celular (prófase da meiose I), d) a ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais periféricos, e e) a pequena quantidade de gotículas de lipídio intracitoplasmático (Gosden *et al.* 1994; Shaw *et al.* 2000). A criopreservação de tecido ovariano possui muitas vantagens sendo que o tecido pode ser coletado a qualquer tempo, não dependendo da idade do animal ou do estágio em que se encontra no ciclo estral, podendo também ser aplicada em animais que morreram inesperadamente (Shaw *et al.* 2000).

A criopreservação de tecido ovariano se mostrou efetiva em muitas espécies incluindo ovelha (Gosden *et al.* 1994; Newton *et al.* 1999; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004; Santos *et al.* 2006b), vaca (Paynter *et al.* 1999, Lucci *et al.* 2004a; Celestino *et al.* 2008), cabra (Rodrigues *et al.* 2004; Santos *et al.* 2006c) e humanos (Newton *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 2003). Porém, não existe informação sobre a criopreservação de folículos pré-antrais em tecido ovariano suíno.

A criopreservação de ovócitos imaturos em folículos pré-antrais suínos pode ser uma boa alternativa para a conservação de células germinativas femininas, nessa espécie, em função da grande sensibilidade ao frio do ovócito proveniente do folículo antral suíno. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito de diferentes crioprotetores na congelamento de folículos ovarianos pré-antrais, em tecido ovariano suíno.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Por que criopreservar células germinativas femininas?

Criopreservar células germinativas femininas tem como finalidade manter a viabilidade reprodutiva de fêmeas por longos períodos de tempo. Essa técnica pode ser usada para a formação de bancos de germoplasmas, permitindo: (a) o melhoramento animal, onde um grande número de características genéticas seja confrontado ao longo do tempo; (b) exportação e importação de espécies e raças de interesse zootécnico ou zoológico (Reichenbach *et al.*, 2002); (c) facilitação na permuta mundial de germoplasma (Hafez, 2004), programas de pesquisas e preservação de espécies em extinção (Crister & Gunasena, 1997; Hafez, 2004); (d) preservação de fertilidade e função endócrina em mulheres de idade avançada ou que serão submetidas ao tratamento de câncer com medicações tóxicas às gônadas, por meio da conservação prévia do tecido ovariano (Lee *et al.*, 2001).

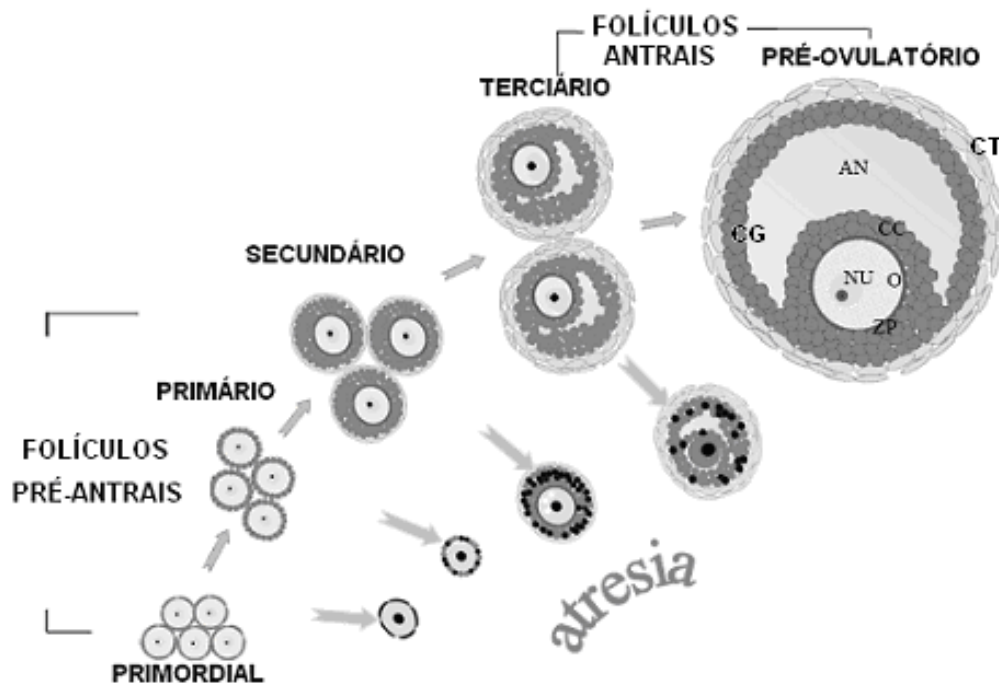
Porém, o sucesso de um método de criopreservação para um tipo celular pode ser letal para um outro tipo de célula. A diferença na sensibilidade ao frio também está relacionada ao estágio de desenvolvimento que a célula se encontra (Doyle *et al.*, 1988). Para a criopreservação de células germinativas femininas pode ser utilizado o ovócito em diferentes estádios de desenvolvimento.

Para uma melhor compreensão será apresentada a seguir uma breve revisão sobre o desenvolvimento dos ovócitos, os tipos de células germinativas femininas que podem ser criopreservadas, bem como o processo de criopreservação e os métodos de avaliação da qualidade celular.

## 2.2. As células germinativas femininas e os folículos ovarianos

O ovário mamífero contém um grande número de células germinativas (ovócitos) que se encontram em folículos ovarianos em vários estádios de desenvolvimento. O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um ovócito circundado por células somáticas (células da granulosa e da teca). Ele desempenha duas funções principais que são interdependentes; uma endócrina (produção e liberação de hormônios) e outra exócrina ou gametogênica (produção de gametas). Nessa última função, o folículo é elemento essencial para manutenção da viabilidade, crescimento e maturação ovocitária (Figueiredo *et al.* 2002).

De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários e b) folículos antrais ou cavitários, como pode ser visto na figura 1. No tocante à distribuição folicular, 90-95% correspondem a folículos pré-antrais, sendo que a maior quantidade deles são folículos primordiais. (Saumande, 1981; Erickson 1986)

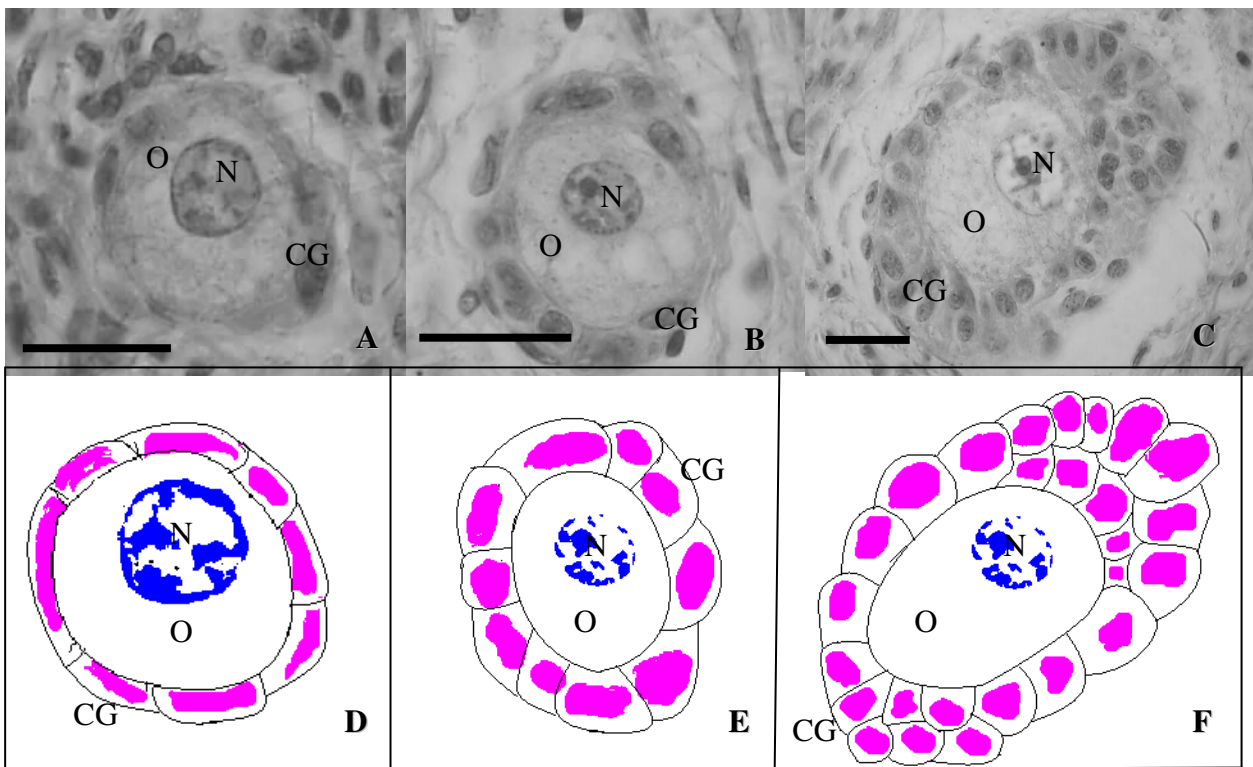


**Figura 1** – Esquema apresentando o desenvolvimento dos folículos ovarianos de mamíferos. O: ovócito; CG: Célula da granulosa; CT: Célula da Teca, ZP: Zona Pelúcida, AN: Antro; NU: Núcleo. FONTE: Adaptada de Santos, 2007.

Durante a vida reprodutiva de uma fêmea, somente uma pequena proporção desses folículos é competente para atingir com sucesso a maturação e ovulação. O restante dos folículos (>99,9%) entra em atresia, conforme mostra a figura 1 (Nuttinck *et al.*, 1993).

### 2.2.1 Folículos pré-antrais

Conforme anteriormente citado, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários e b) folículos antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais são constituídos pelos folículos primordiais, em transição, primários e secundários. Eles podem ser diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células da granulosa que circundam o ovócito imaturo ou primário, como é mostrado na figura 2 (Figueiredo *et al.* 2002).



**Figura 2** – Seção histológica e desenho esquemático de folículos pré-antrais. (A e D) Folículo primordial; (B e E) Folículo primário; (C e F) Folículo secundário. Barra=20µm. O: ovócito; CG: Célula da granulosa; N: Núcleo.FONTE: Arquivo Pessoal.

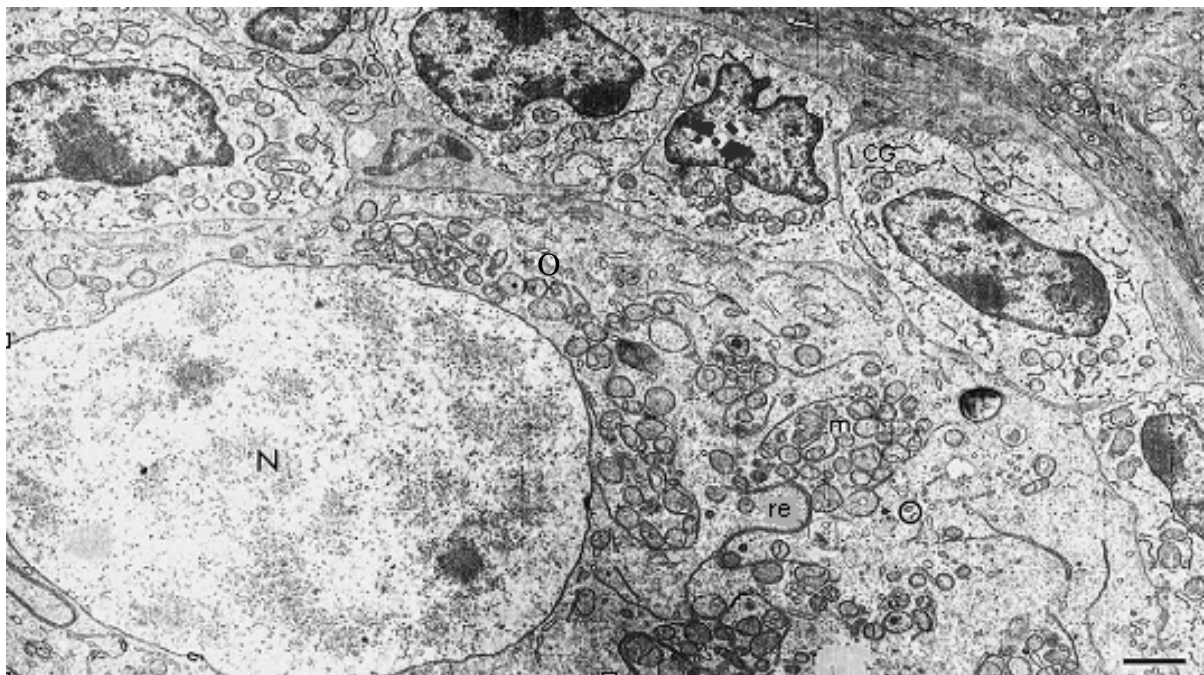
Os folículos primordiais (Figura 2A e 2D) são os primeiros folículos formados no ovário e os menores folículos encontrados. Consistem em um ovócito imaturo (VG), circundado por uma única camada de células da granulosa, de forma pavimentosa. Os folículos primordiais se encontram em estágio de quiescência ou dormência (Van den Hurk *et al.*, 1997; Figueiredo *et al.* 2002).

A proliferação celular é retomada quando o folículo primordial é ativado e começa a crescer passando sucessivamente pelo estágio de folículo primário, secundário e terciário até chegar ao estágio de folículo pré-ovulatório.

Os folículos primários (Figura 2B e 2E) caracterizam-se pela presença de um ovócito imaturo central, circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica (Figueiredo *et al.* 2002). Com relação aos folículos secundários (Figura 2C e 2F), esses caracterizam-se pela presença de um ovócito imaturo central, sendo circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. São caracterizados por apresentarem o ovócito circundado por, pelo menos, duas camadas de células da granulosa de forma cubóide, e o aparecimento das células da teça e da zona pelúcida (Hafez 2004).

Esses folículos pré-antrais analisados por microscopia eletrônica podem revelar ainda outras características morfológicas, com relação a suas organelas citoplasmáticas. Folículos pré-antrais nas espécies domésticas, apresentam um ovócito grande com o núcleo bem delimitado, mitocôndrias redondas, alongadas ou pleomórficas com cristas irregulares e membrana mitocondrial contínua (Figura 3) (Lucci *et al.* 2004b ; Kacinskis *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006b).

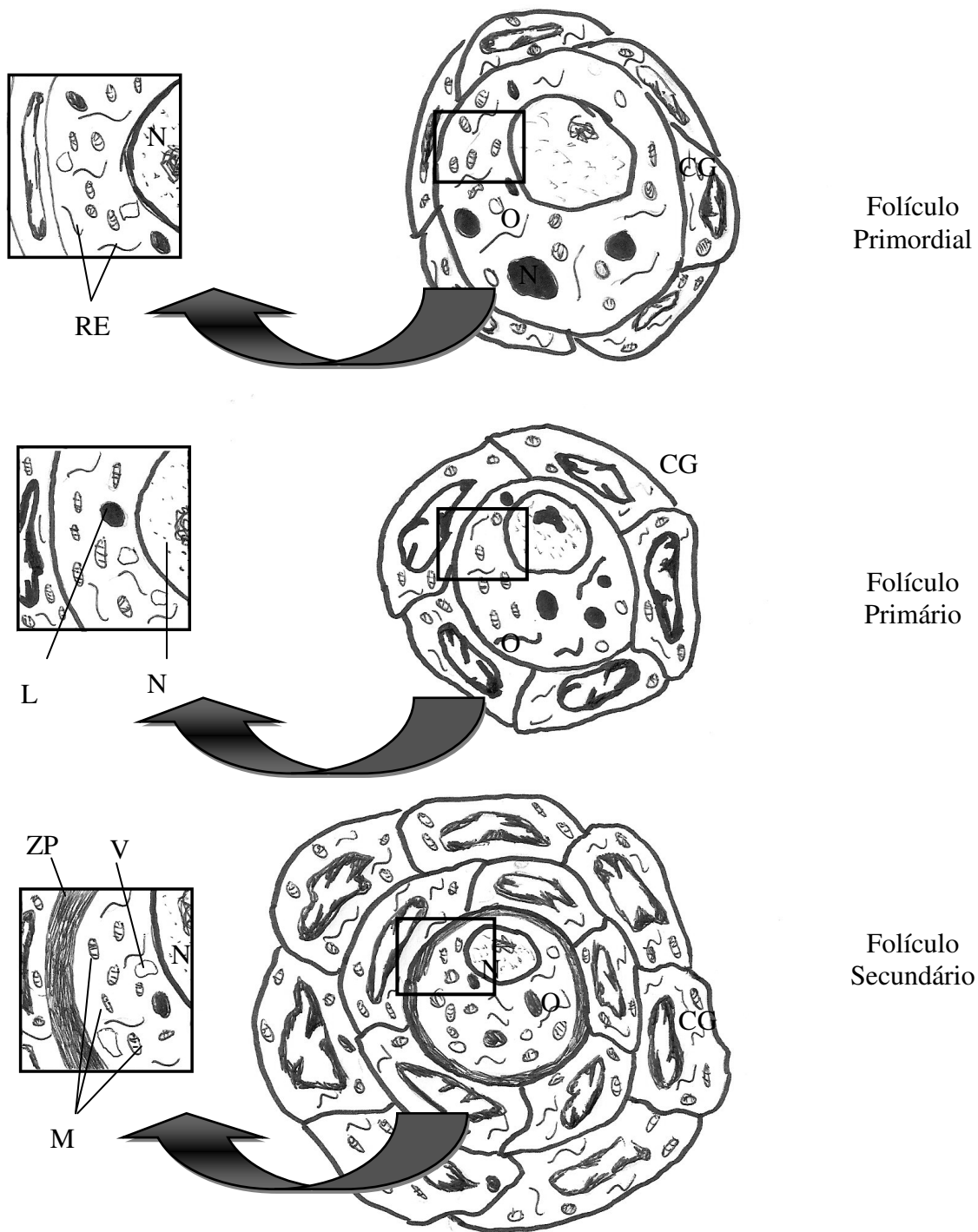
No desenho esquemático abaixo (Figura 4) é possível reconhecer as principais organelas citoplasmáticas observadas na análise por microscopia eletrônica de transmissão dos folículos primordiais, primários e secundários. Observar as diferentes morfologias das células da granulosa (pavimentosa ou cubóide) e a presença de zona pelúcida no folículo secundário.



**Figura 3** – Ultraestrutura de folículo pré-antral morfologicamente normal O: ovócito; CG: Célula da granulosa; N: Núcleo; re; Retículo endoplasmático; m mitocôndria; Barra = 2 $\mu$ m. FONTE: Adaptado de Kacinskis *et al.*, 2005.

Os folículos pré-antrais podem apresentar também uma pequena quantidade de vesículas distribuídas homogeneamente no citoplasma do ovócito, relatado em algumas espécies animais, como a bovina (Lucci *et al.*, 2004a). Nos ovinos e caprinos um maior número dessas vesículas espalhadas pelo citoplasma do ovócito foi relatado (Matos *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006 b).

Um outro achado observado na microscopia eletrônica de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais, diz respeito ao complexo de golgi e o retículo endoplasmático liso e rugoso. Esses, geralmente encontram-se isolados, ou em associações complexas com mitocôndrias e vesículas (Santos *et al.*, 2006b; Lucci *et al.* 2004b; Matos *et al.*, 2004). Já as células da granulosa apresentam um formato irregular, com uma grande proporção entre núcleo e citoplasma (Matos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2006b).



**Figura 4** – Esquema mostrando os folículos pré-antrais visualizados na microscopia eletrônica de transmissão. O: ovócito; CG: Célula da granulosa; N: Núcleo; RE: Retículo endoplasmático; M: mitocôndria; V: Vesícula; ZP: Zona pelúcida; L: Gotícula de lipídio. O tamanho dos folículos não está em escala de proporcionalidade. FONTE: Arquivo pessoal.

Ao longo do desenvolvimento dos folículos pré-antrais, apesar do ovócito permanecer em VG ele aumenta de tamanho e mudanças ultra-estruturais acontecem. Por exemplo, o núcleo que ocupava uma posição central passa a ocupar uma posição excêntrica. Aparecem os primeiros grânulos corticais dispostos em cachos na periferia dos ovócitos. Com a formação da zona pelúcida as células da granulosa lançam projeções até o ovócito, onde junções comunicantes podem ser observadas. O número de pequenas vesículas (*coated pits*) no córtex do ovócito diminui e as microvilosidades entre ovócito e a célula da granulosa aumentam de número e se tornam cada vez mais eretas. As mitocôndrias que prevaleciam de formato arredondado passam a ter o formato predominantemente alongado (Hyttel *et al.*, 1997; Fair *et al.*, 1997; Kacinkis *et al.*, 2005).

### **2.2.2 Folículos antrais**

A categoria de folículos antrais compreende os folículos terciários e os folículos de De Graaf, estes últimos são também denominados de folículos maduros, pré-ovulatórios ou dominantes (Figueiredo *et al.* 2002). Esses folículos são caracterizados pela camada da teca, a granulosa, que consiste de várias camadas de células. Um ovócito rodeado pela corona radiata, as células do cummulus que conectam o ovócito à granulosa e uma cavidade contendo líquido folicular (Figueiredo, 2002)

Ultraestruturalmente conforme o aumento folicular as gotículas de lipídios se tornam cada vez mais comum no citoplasma. O número de cachos de grânulos corticais aumenta e se deslocam para a periferia do ovócito. Ocorre um aumento também do complexo de golgi e suas cisternas parecem ficar mais largas. Mitocôndrias redondas, alongadas, pleomórficas e predominantemente em capuz estão presentes e se deslocam para a periferia do ovócito. Numerosas microvilosidades se estendem para a zona pelúcida e ocorre o aumento do espaço perivitelinico. Um grande número de pequenas e médias vesículas é notado no córtex profundo. O núcleo se localiza predominantemente na região periférica do ovócito (Hyttel *et al.*, 1997; Fair *et al.*, 1997).



## 2.3 Células germinativas femininas que podem ser criopreservadas

Para a criopreservação de células germinativas femininas, pode-se utilizar ovócitos maduros, imaturos puncionados de folículos antrais ou imaturos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (isolados ou em fragmentos de tecido ovariano).

A criopreservação de ovócitos é uma importante ferramenta para a conservação de material genético de fêmeas de interesse comercial ou mesmo espécies ou raças ameaçadas de extinção. A melhoria na técnica de criopreservação de ovócitos também diminuirá a dependência de ovócitos frescos, simplificando, assim, o manejo dos recursos genéticos. Porém, os resultados da criopreservação de ovócitos são limitados em várias espécies domésticas, existindo baixa viabilidade após a descongelamento (Santos *et al.*, 2006a).

Um dos fatores que influencia a sobrevivência após a criopreservação do ovócito é o estágio da meiose em que ele se encontra. Nos ovócitos maduros (ovócitos em MII), elementos ultra-estruturais delicados como o fuso metafásico são formados. Este fator torna estas células susceptíveis a danos severos durante a criopreservação (Woods *et al.*, 2004). Além disso, o frio induz a uma ativação partenogenética prematura em ovócitos maduros. O congelamento está associado a um aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático que deveria ocorrer normalmente durante a ativação do ovócito em MII. Porém, essa ativação prematura evita uma fertilização normal após o descongelamento. Recentemente, foi descoberto que essa elevação de cálcio pode ser disparada somente pelo contato com o crioprotetor em algumas espécies como ratos e ovelhas. Entretanto, em ovócitos suínos, o contato com o crioprotetor não dispara a ativação partenogenética. Somente o procedimento de resfriamento provoca essa alteração (Somfai *et al.*, 2007).

Os efeitos da baixa temperatura estão também relacionados com a integridade das fibras do fuso presente no ovócito em MII, sendo que esta despolimerização das fibras está relacionada à aneuploidia (Agca, 2000; Demirci *et al.*, 2003; Vanhoutte *et al.*, 2004).

Os ovócitos em MII também apresentam grânulos corticais dispostos na periferia do ovócito. Essa disposição propicia a liberação prematura dos grânulos corticais ocasionados pela baixa temperatura. A liberação desses grânulos está relacionada com um endurecimento da zona pelúcida, sendo essa a causa da

dificuldade de penetração do espermatozóide em ovócitos maduros criopreservados, levando a baixas taxas de fecundação (Agca, 2000; Demirci *et al.*, 2003). Nos ovócitos em VG (obtidos de folículos antrais) os grânulos corticais não estão na periferia, não ocorrendo, portanto, esse problema de liberação prematura (Shaw *et al.* 2000).

Com relação aos ovócitos imaturos obtidos de folículos antrais, esses não apresentam o problema de liberação prematura de grânulos corticais e estão em estágio de VG, o que elimina o problema de despolimerização das fibras do fuso durante a criopreservação. Porém, até o momento, ainda não existem relatos de sucesso na criopreservação de ovócitos pelo método lento tradicional de algumas espécies como o suíno (Somfai *et al.* 2007). Efeitos deletérios do congelamento foram observados depois da MIV, incluindo redução da formação do fuso e decréscimo da maturação nuclear e citoplasmática (Liu *et al.* 2003).

Os ovócitos especificamente da espécie suína são extremamente sensíveis a baixa temperatura e essa sensibilidade é observada à temperaturas abaixo de 15°C (Didion *et al.*, 1990). A sensibilidade dos ovócitos suínos está relacionada com a grande quantidade de lipídio intracitoplasmático que esses possuem (Somfai *et al.*, 2007). Os ovócitos suínos apresentam 2,5 vezes mais lipídios do que os ovócitos bovinos, sendo que esses lipídios são em grande parte triglicérides. Os ácidos graxos presentes nos ovócitos suínos, em sua maioria, apresentam natureza poliinsaturada, estando relacionados a sua maior sensibilidade ao frio quando comparado aos ovócitos bovinos (McEvoy *et al.*, 2000).

Na análise ultraestrutural das gotículas de lipídios os ovócitos de suínos e bovinos também apresentam diferenças. Enquanto os lipídios de ovócitos bovinos em vesícula germinativa (VG) não revelam alterações morfológicas após o resfriamento, os lipídios de ovócitos suínos apresentam mudanças morfológicas significativas (Isachenko *et al.*, 2001). Segundo estes mesmos autores, essas mudanças podem estar relacionadas com alterações físico-químicas dos lipídeos que tornam os ovócitos suínos mais sensíveis a baixas temperaturas.
















Para contornar esse problema foi realizada a delipidação (retirada dos lipídios presentes no citoplasma de ovócitos maduros) na tentativa de diminuir a sensibilidade dos ovócitos suínos ao frio. Porém, observou-se que o procedimento de retirada de lipídios compromete o desenvolvimento embrionário posterior (Nagashima *et al.*, 1994).

Outra opção, em função dos baixos resultados da criopreservação de ovócitos suínos maduros (MII) e imaturos puncionados de folículo antral, seria preservar ovócitos em estádios de desenvolvimento mais precoces (ovócitos imaturos de folículos pré-antrais). Esses ovócitos imaturos podem ser coletados mais facilmente, em qualquer estágio da vida da fêmea, e em maior quantidade. Além disso, os ovócitos desses folículos também têm se mostrado menos susceptíveis a crioinjúria (Oktay *et al.*, 1998).

Os ovócitos imaturos, diferente dos maduros, apresentam núcleo no estágio de VG, que é caracterizado pela presença de cromossomos estendidos envoltos por uma membrana nuclear, ausência de fuso meiótico, grânulos corticais que não estão prontos para serem liberados, menor quantidade de lipídio intracitoplasmático e células do cummulus compactas ao seu redor. A criopreservação de ovócitos em VG evitaria problemas associados ao estágio de MII, relacionados com a organização do fuso e dispersão cromossômica, que são relacionados com um dos motivos da baixa fertilização (Agca, 2000).

Um resumo das características que influenciam a sensibilidade ao congelamento de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, bem como os fatores que favorecem a criopreservação, podem ser vistos no quadro 1.

Os ovócitos imaturos obtidos de folículos ovarianos pré-antrais podem ser criopreservados utilizando duas diferentes técnicas: criopreservação de folículos no tecido ovariano ou dos folículos isolados do córtex ovariano. A criopreservação de folículos pré-antrais no tecido ovariano é uma alternativa para preservar e proteger o material genético de raças ou espécies em vias de extinção, sendo que a coleta do tecido não depende da idade ou do estágio do ciclo estral e pode ser aplicada em animais que morreram há pouco tempo ou *in vivo* por meio de uma biopsia ou ovariectomia (Shaw *et al.*, 2000).

	Ovócito em VG incluso em folículo pré-antral	Ovócito em VG de folículo antral	Ovócito em MII
Grânulos corticais	Ausente 	Dispostos em cachos 	Dispostos na periferia do ovócito 
ZP	Ausente ou não totalmente formada 	Presente 	Presente 
Lipídio	Pouco 	Pode ser abundante 	Pode ser abundante 
Maturação nuclear	VG membrana nuclear 	VG Membrana nuclear 	MI I Fuso sensível a temperatura 
Disponibilidade	Abundante Sempre presente	Escasso Somente folículo antral	Escasso, Somente oócito maturado
Tamanho	<50µm 	>80 µm 	>80µm 
Coleta	Biopsia	Punção folicular	Punção folicular

**Quadro 1** – Características de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento que podem influenciar a sensibilidade a criopreservação.

: favorável à criopreservação; : desfavorável à criopreservação.

FONTE: Adaptada de Shaw *et al.* (2000)

A criopreservação de tecido ovariano e posterior transplante ou isolamento para cultivo *in vitro* é também um método muito interessante para mulheres que irão sofrer tratamento de radioterapia, quimioterapia, menopausa prematura ou qualquer fator que acarrete em diminuição da fertilidade. Porém, a criopreservação de tecido

ovariano apresenta alguns problemas em função da complexidade da arquitetura do tecido. Os protocolos de criopreservação devem atender condições ótimas para diferentes tipos de células presentes no tecido. A velocidade de congelamento e aquecimento que forneçam condições para uma ótima sobrevivência de um tipo celular pode não ser ideal para outra célula que compõe o mesmo tecido (Picton *et al.*, 2000).

As dimensões do tecido ou do órgão impõem, portanto, restrições na velocidade de congelamento e descongelamento, sendo necessária a preservação de um adequado arranjo tridimensional. O tecido depende da inter-relação e interconexão entre as células, mantendo intactas algumas estruturas como a membrana basal, glicosaminoglicanas e as fibras de colágeno para que a função do órgão seja mantida (Pegg, 2002). Outro problema é a permeabilidade do tecido ovariano ao crioprotetor. Para facilitar essa permeabilidade, os experimentos utilizam peças do ovário de 2 mm<sup>3</sup> para permitir que o crioprotetor penetre na amostra (Amorim *et al.*, 2003).

Após uma criopreservação eficiente, o tecido ovariano pode ser transplantado para a localização original anatômica (transplante ortotópico) ou para uma posição diferente (transplante heterotópico), como na cápsula renal. Pode ser transplantado para o próprio indivíduo (autotransplante), para outro indivíduo da mesma espécie animal (halotransplante) ou para uma espécie diferente (xenotransplante) (Amorim *et al.*, 2003).

Os resultados são aceitáveis para criopreservação de tecido ovariano em espécies que não são sensíveis ao frio como o rato, utilizando a curva de congelamento rápido, onde o tecido é imerso no nitrogênio líquido a -33°C ou -40°C. Porém, em outras espécies como humanos e, principalmente, em espécies sensíveis ao frio, como o bovino, os resultados são mais baixos. Os lipídios intracitoplasmáticos contribuem para o problema, mas, fatores adicionais como formação de gelo intracelular em temperaturas abaixo de zero estão envolvidos (Shaw *et al.*, 2000).

Pesquisas a respeito de criopreservação de tecido ovariano já foram feitas em ovinos (Gosden *et al.*, 1994; Newton *et al.* 1999; Santos *et al.* 2006b; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004), caprinos (Rodrigues *et al.* 2004; Santos *et al.* 2006c) bovinos (Paynter *et al.* 1999, Lucci *et al.* 2004a; Celestino *et al.* 2008) e

humanos (Newton *et al.* 1996; Schmidt *et al.* 2003). Contudo, os melhores resultados foram obtidos em camundongos, com o nascimento de filhotes (Sztein *et al.*, 1998).

A criopreservação de folículos pré-antrais isolados também tem sido estudada como uma nova alternativa para preservação de gametas femininos (Amorim *et al.*, 2006). Os melhores resultados também foram obtidos em camundongos com o nascimento de filhotes (Carrol *et al.*, 1990). Contudo, pesquisas também foram realizadas em felinos (Jewgenow *et al.*, 1998), caprinos (Rodrigues *et al.*, 2005) e ovinos (Amorim *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2007).

Na criopreservação do tecido ovariano, os estudos sugerem que o DMSO e o EG são os crioprotetores que causam menos danos para os ovócitos e folículos pré-antrais em várias espécies (bovino - Lucci *et al.* 2004a; Celestino *et al.* 2008; caprino - Santos *et al.* 2006c; Rodrigues *et al.* 2004; ovino - Santos *et al.* 2006b; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004; humano - Schmidt *et al.* 2003; felino - Lima *et al.* 2006), em função da sua fácil permeabilidade no tecido. Em contrapartida, o GLY, por ter seu coeficiente de permeabilidade muito menor do que o DMSO, EG ou PROH, apresenta baixas taxas de sobrevivência oocitária (Agca, 2000). Os estudos são claros ao demonstrar que o GLY não é indicado para criopreservação de folículos pré-antrais (Amorim *et al.*, 2007).

Porém, com relação ao DMSO e o EG, as pesquisas são contraditórias. Alguns autores relataram que o EG foi melhor do que o DMSO para criopreservação de tecido ovariano ovino, bovino e caprino (Amorim *et al.* 2007; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004; Celestino *et al.* 2008; Santos *et al.* 2006c), afirmando que isso se dá em função do menor peso molecular do EG (62,07 kDa) quando comparado com o peso molecular do DMSO (78,13 kDa) (Santos *et al.*, 2006c). Entretanto, outros trabalhos em bovinos (Lucci *et al.* 2004a) e ovinos (Santos *et al.* 2006b) mostraram que DMSO apresentou melhores resultados do que EG. Entretanto, com relação a folículos pré-antrais suínos não existem trabalhos. A criopreservação de ovócitos imaturos em folículos pré-antrais pode ser uma boa alternativa para a conservação de células germinativas femininas nessa espécie, já que, os ovócitos maduros são extremamente sensíveis.

Para elaborarmos protocolos eficientes de criopreservação de gametas femininos precisamos primeiramente entender as bases físicas e biológicas da criopreservação.

## **2.4 Criopreservação**

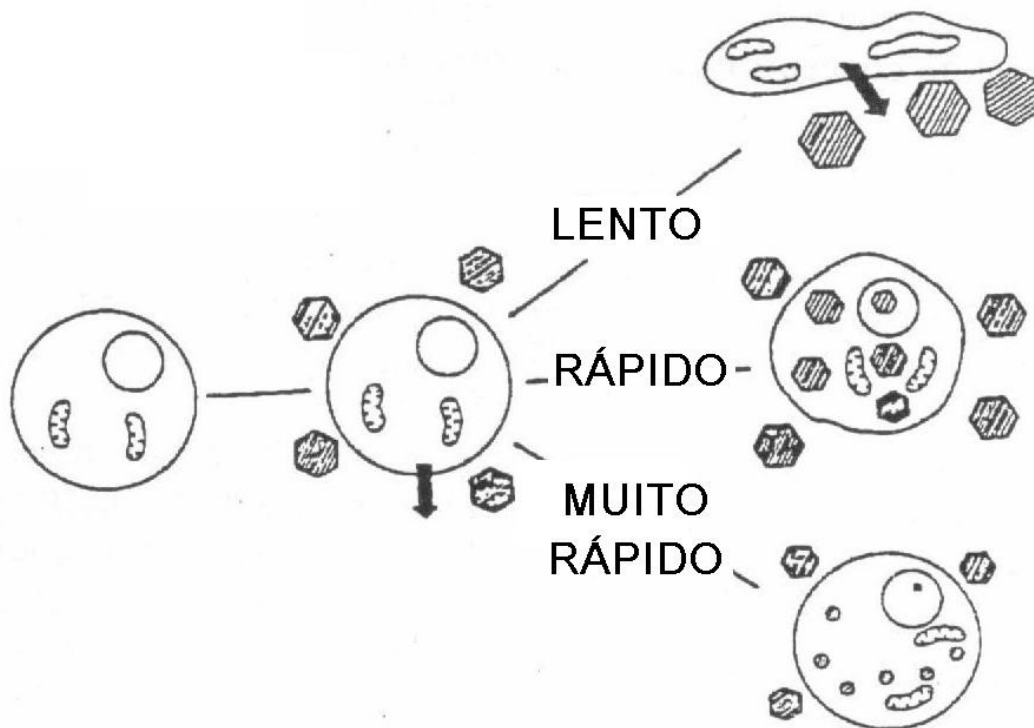
### **2.4.1 Bases físicas e biológicas**

Ao mesmo tempo que o congelamento pode preservar as células viáveis por longos períodos como foi citado, ele também pode destruir as organelas e a ultra-estrutura celular (Mazur, 1984). Portanto, durante a criopreservação e/ou descongelamento, as células podem ser danificadas, seja pela formação de grandes cristais de gelo intracelular, seja pelo aumento da concentração intracelular de solutos ou alterações que acompanham esses eventos (Hafez, 2004).

Essas alterações foram relatadas inicialmente por Mazur em 1963, mostrando que a velocidade com que a água sai da célula, relaciona-se com a velocidade de aumento da concentração de soluto extracelular, determinando o equilíbrio osmótico (Mazur, 1984). Em seu trabalho, Mazur conclui que, de acordo com a velocidade de congelamento das células, elas podem ficar retraídas ou pouco retraídas contendo ou não cristais de gelo intra ou extracelulares, como pode ser visto na figura 5.

A formação do gelo não necessariamente resulta em morte celular e o local de formação e o tamanho dos cristais de gelo influenciam nesta sobrevivência. Durante o congelamento, a temperatura declina, a água se cristaliza, provocando um aumento da concentração de solutos no meio extracelular, resultando em um gradiente osmótico. Portanto, quando a velocidade de congelamento é lenta, a célula sofre desidratação, porém, quando essa velocidade é rápida, a célula não perde água para o meio externo, tendo a formação de gelo intracelular, que pode levar à morte celular após o descongelamento (England, 1993).

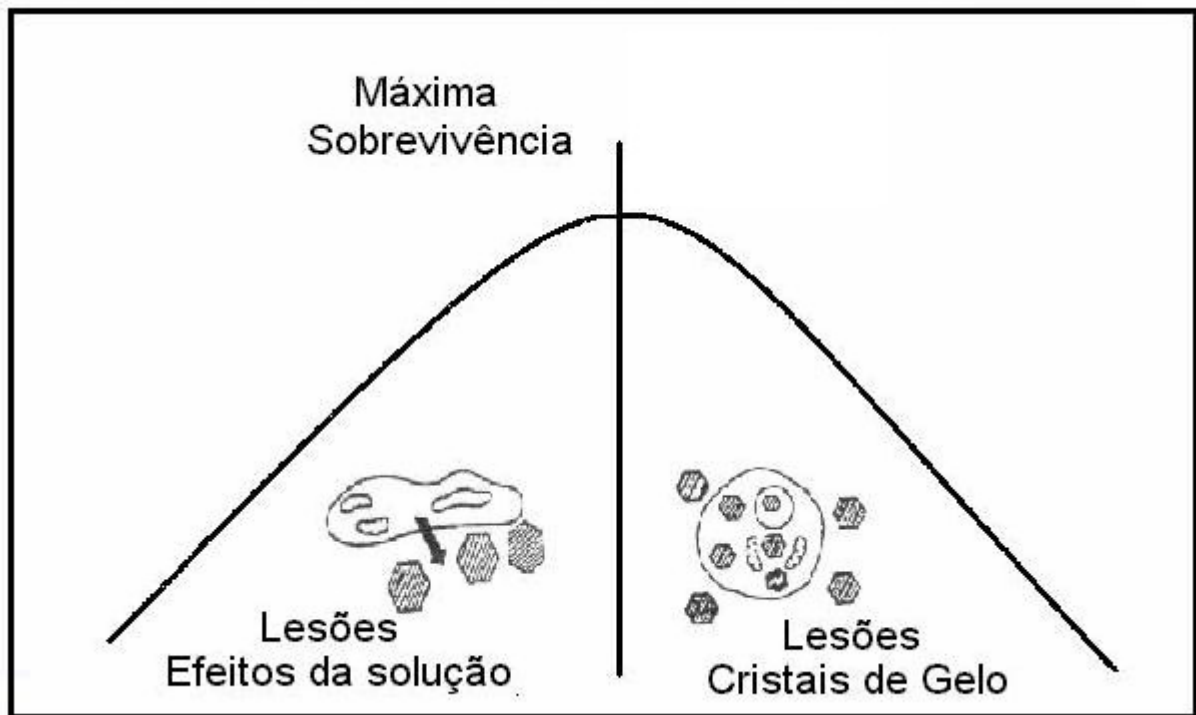
Posteriormente, em 1980, Mazur descreveu uma relação estreita entre a velocidade de congelamento e o aparecimento dessas lesões celulares. Foram correlacionados a velocidade de congelamento e os índices de sobrevivência embrionária em um gráfico que se comporta como uma parábola. À medida que a velocidade de congelamento aumenta o índice de sobrevivência embrionária também aumenta após a descongelamento, até que seja alcançada uma relação ideal, na qual o índice de sobrevivência será máximo.



**Figura 5** – Formação de cristais de gelo e alterações osmóticas que acompanham a criopreservação. Congelamento lento: a célula mantém o equilíbrio osmótico através da saída de água, tornando-se retraída e desidratada formando gelo somente no meio extracelular. Congelamento rápido: a célula não perde água rapidamente e mantém o equilíbrio osmótico, tornando-se pouco retraída e contendo uma pequena porção de gelo no meio intracelular. Congelamento muito rápido: a célula contém um grande número de pequenos cristais de gelo no meio intracelular. FONTE: Mazur, (1984).

A partir dessa constatação, foi elaborada a teoria dos dois fatores, que subdivide as causas do aparecimento de lesões celulares em duas etapas, sendo uma antes e a outra depois desse índice máximo de sobrevivência embrionária (Reichenbach *et al.*, 2002). As lesões que ocorrem antes da relação ideal são consideradas uma consequência dos efeitos da solução (osmóticos) e as que ocorrem depois, como resultantes da formação de cristais de gelo, como demonstra a Figura 6.





**Figura 6** – Lesões celulares antes e depois do índice de máxima sobrevivência embrionária. FONTE: Adaptado de Reichenbach *et al.*, (2002) e Mazur, (1984).

A taxa ótima de congelamento para um dado tecido depende, então, de sua tolerância relativa ao dano causado pelos cristais de gelo e dos efeitos de solução (Hafez, 2004). Lesões decorrentes dos efeitos da solução crioprotetora podem acontecer devido ao aumento da osmolaridade intracelular, ocorrendo concentração de sais no meio extracelular após a cristalização, desidratação osmótica e diminuição do volume celular, hiper-concentração salina intracelular após a desidratação parcial, união intracelular das macromoléculas, alteração do pH, precipitações dos sais concentrados e choque osmótico na descongelamento (Reichenbach *et al.*, 2002). Danos ocorrem também na superfície da membrana plasmática, microtúbulos e microfilamentos (Doyle *et al.*, 1988). Essas lesões na membrana facilitam a perda de lipídios, permitindo o influxo de sais para a célula, perda de água, destruição da organização interna afetando o metabolismo, contribuindo, assim, para a degeneração celular (Reichenbach *et al.*, 2002).

Lesões devido à formação de cristais de gelo ocorrem quando a velocidade de congelamento é muito rápida, superior a considerada ideal, não havendo desidratação celular suficiente, levando à formação de cristais de gelo intracelular.

Esses cristais podem causar lesões mecânicas às organelas e membranas celulares (Reichenbach *et al.*, 2002).

Ao contrário do que se pensaria, o desafio das células durante o congelamento, portanto, não está na sua habilidade de serem estocadas a temperaturas muito baixas (-196 °C). Esta letalidade ocorre antes, em uma zona de temperatura entre -15 °C e -60 °C, que a célula atravessa duas vezes, uma no congelamento e outra no descongelamento (Mazur, 1984). De acordo com Picton *et al.* (2000), esta temperatura está entre -5 °C e -15 °C onde ocorre a formação de gelo e a concentração de solutos no meio extracelular, criando um gradiente osmótico, fazendo com que a água se movimente do citoplasma para o meio extracelular, causando uma desidratação e retração da célula.

Vajta (2000) afirma ainda que os danos celulares podem ocorrer em qualquer momento do processo de criopreservação. Segundo esse autor, durante o equilíbrio com a solução de crioprotetor, os prejuízos tóxicos e osmóticos são os principais. Porém, no resfriamento, existem três mecanismos de danos. Inicialmente, de 20 °C a -5 °C, ocorrem alterações nos lipídios, microfilamentos e microtúbulos. Em seguida, de -5 °C a -35 °C, a formação de cristais de gelo é a principal causa de danos. Finalmente, de -35 °C a -130 °C, podem ocorrer lesões estruturais como, por exemplo, ruptura de membrana celular. Além disso, um longo período a -196 °C pode promover eventos como a formação de radicais livres e quebras de macromoléculas, ocasionando danos ao DNA (Mazur, 1984).

Apesar de todos esses eventos que danificam as células, durante o congelamento e descongelamento podem ser utilizadas técnicas que diminuem esses danos e, ainda, alguns fatores de proteção celular, como os crioprotetores.

#### **2.4.2 Crioprotetores**

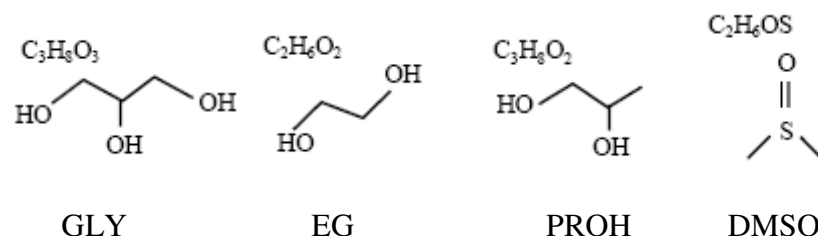
Os crioprotetores são componentes químicos que protegem as células contra o estresse do congelamento e descongelamento (Doyle *et al.*, 1988). São substâncias de baixo peso molecular que podem penetrar, ou não, através da membrana plasmática (Cabodevila & Teruel, 2001). Entre os penetrantes, se encontram o glicerol (GLY), DMSO, propanodiol (PROH) e etilenoglicol (EG); e ao grupo dos não penetrantes pertencem açúcares como sacarose, trealose, glicose,

rafinose e macromoléculas, tais como polivinilpirrolidona, álcool polivinílico e hialuronato de sódio (England,1993).

Dentre os agentes crioprotetores intracelulares, o GLY historicamente foi o crioprotetor usado em bancos de sêmen de animais e humanos. Recentemente, foram identificados canais específicos que facilitam o transporte do GLY para dentro da célula denominados AQP7. A AQP7 é expressa extensivamente em células de algumas espécies animais, nas quais o transporte de GLY é prioridade e não o transporte de água. As células de algumas espécies em que se acredita haver uma falta da AQP7, como os espermatozóides de coelho, não são, portanto, bem criopreservadas com a utilização do GLY (Curry, 2000).

Em função dessas diferenças entre as espécies para permeabilidade, toxicidade e ação dos crioprotetores, recentemente, tem sido feito o uso de outros crioprotetores penetrantes como: DMSO, PROH e EG (Picton *et al.*, 2000). Cada crioprotetor tem mecanismos próprios de ação, porém, seus efeitos são, geralmente, estabilizar membranas celulares, produzir desidratação parcial das células e diminuir o ponto de fusão do sistema (Cabodevila & Teruel, 2001; Picton *et al.*, 2000).

Os crioprotetores penetrantes possuem diferentes pesos moleculares GLY= 92,09 kDa; EG= 62,07 kDa; PROH= 76,09 kDa; DMSO= 78,13 Kda e estruturas químicas (Figura7). Devido a essas diferenças são observadas diferentes velocidades de penetração nas células. Por exemplo, o baixo peso molecular do EG em relação ao DMSO, GLY e PROH, possibilita uma maior penetração nas células durante curto período de exposição, prevenindo a ocorrência de injúrias celulares de origens tóxica e osmótica (Shaw *et al.*, 2000).



**Figura 7** – Estrutura química dos crioprotetores glicerol (GLY), etilenoglicol (EG), propanodiol (PROH) e DMSO. FONTE: Van den Hurk & Santos 2009.

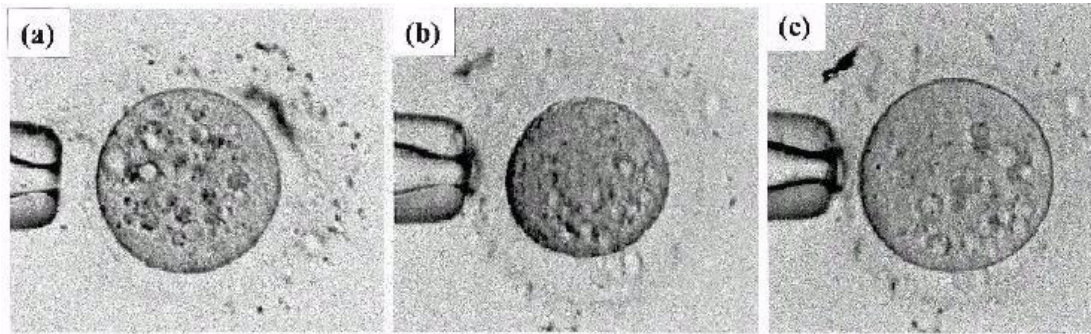
Para os crioprotetores que não penetram nas células, acredita-se que a ação de proteção celular na congelamento ocorra através da estabilização das membranas celulares (Reichenbach *et al.*, 2002). Além disso, estas substâncias criam um meio hipertônico que induz à saída de água do meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação da célula reduzindo assim, a probabilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula, durante a congelamento (Shaw *et al.*, 2000)

Apesar dos seus efeitos benéficos, os crioprotetores podem levar a alterações no citoesqueleto, estruturas de microtúbulos e organização do fuso meiótico/mitótico. Esses efeitos podem alterar a organização normal e o tráfego de moléculas e organelas, prejudicando o desenvolvimento embrionário, aumentando a incidência de aneuploidia (efeito mutagênico) e outras anomalias cromossômicas (Picton *et al.*, 2000).

Além dos efeitos citotóxicos ocasionados pela exposição a crioprotetores, as soluções de criopreservação são hiperosmóticas e os crioprotetores penetram nas células mais lentamente do que a água sai. Essa exposição causa uma diminuição do volume celular (Figura 8 b) e do gradiente osmótico, ocorrendo, então, um retorno ao volume normal da célula e entrada do crioprotetor. Quando a célula retorna para a solução isotônica depois do descongelamento, pode ocorrer um fluxo osmótico de entrada com a possibilidade de um excessivo inchaço para 140-150% (Figura 8 c) do volume fisiológico. Essas mudanças volumétricas podem contribuir para um mecanismo de danos celulares durante a criopreservação e, em casos extremos, podem levar à lise celular (Picton *et al.*, 2000).

O choque osmótico pode ser reduzido pelo uso de tampões osmóticos, como a sacarose e o manitol, substâncias impermeáveis que agem tamponando contra o inchaço, principalmente, durante a adição e remoção do crioprotetor impedindo a rápida entrada de água nas células (Picton *et al.*, 2000).

Assim, para se otimizar o protocolo de congelamento e descongelamento de cada tipo de célula, é necessário observar a sobrevivência pós-descongelamento, sendo que esta é profundamente afetada pelo tipo de crioprotetor usado e o tempo de equilíbrio necessário para que o crioprotetor seja adicionado ou removido.



**Figura 8** – Alteração osmótica em ovócito em função da exposição ao crioprotetor, sendo: (a) morfologia normal de um ovócito humano maduro exposto a um meio isotônico; (b) ovócito retraído após 30s de exposição a 1,5 M de DMSO; (c) o inchaço do ovócito após reintrodução ao meio isotônico. FONTE: Adaptada de Picton *et al.*, (2000).

A diluição do crioprotetor, após a descongelamento, é dependente da temperatura e do coeficiente de permeabilidade celular. Quanto maior a concentração de sacarose, maior o gradiente de concentração extracelular e mais rápido ocorre a difusão do crioprotetor através das membranas celulares. Por outro lado, quanto menor a concentração de sacarose, maior será o tempo necessário para que ocorra a diluição da solução crioprotetora. Dessa forma, conforme a concentração da solução utilizada ocorrem alterações do volume celular (Reichenbach *et al.*, 2002). A partir dessas informações, é possível concluir que um bom crioprotetor deve não somente ser eficiente para proteger as células durante a criopreservação, mas também ser removido sem alterar a viabilidade celular e a sua capacidade de desenvolvimento.

Observa-se, então, que a adição de um componente crioprotetor leva a um aumento do número de variáveis que podem afetar a sobrevivência celular. Isso inclui a natureza e a concentração do crioprotetor, a temperatura na qual esse é adicionado, a velocidade de congelamento e de aquecimento, a temperatura de estoque, a temperatura e a velocidade em que o crioprotetor é removido (Pegg, 2002; Vega & Wilde, 1991). Essas variáveis estão intimamente relacionadas ao método de congelamento utilizado.

## 2.4.3 Métodos de congelamento

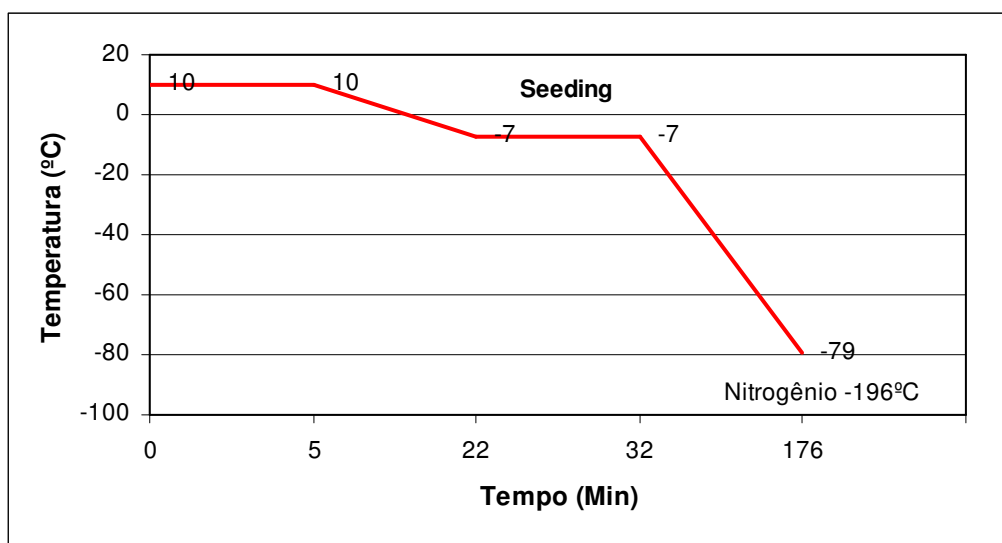
### 2.4.3.1 Método de criopreservação lenta

As curvas de congelamento que correlacionam a queda de temperatura, em função do tempo, são obtidas com velocidades de 0,3°C a 1°C/minuto (Reichenbach *et al.*, 2002). Essa queda gradual e controlada da temperatura é normalmente conseguida com a utilização de congeladores programáveis.

No entanto, ao chegar à temperatura de -10°C a -15°C, ocorre um subresfriamento, onde se forma gelo de maneira espontânea, produzindo um aumento brusco de temperatura denominado calor latente de fusão. Esse subresfriamento pode persistir até, aproximadamente, -21°C, temperatura ao redor da qual ocorre a cristalização do meio de forma espontânea, se não for artificialmente induzida. Se a cristalização do meio ocorrer em temperaturas inferiores ao seu ponto de solidificação, passa a existir uma liberação de energia sob a forma de calor e ocorre uma elevação da temperatura do sistema até próximo à temperatura do ponto de solidificação da solução. Em seguida, a temperatura é novamente reduzida de modo bastante rápido até atingir o equilíbrio térmico com a temperatura anterior. Esse sub-resfriamento causa alterações estruturais da membrana celular com conseqüentes distúrbios da permeabilidade hídrica (Reichenbach *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008).

Para evitar esse fenômeno prejudicial, se induz a formação de gelo no meio extracelular. Tal manobra denomina-se “seeding” e a temperatura realizada varia de acordo com a natureza e concentração do crioprotetor utilizado e a velocidade de congelamento da cruva (Demirci *et al.*, 2003) variando entre -4°C e -7°C (Cabodevila & Teruel, 2001) ou até mesmo -8°C e -9°C (Demirci *et al.*, 2003). Essa indução é geralmente efetuada com auxílio de algum instrumento, como uma pinça, previamente resfriada em nitrogênio líquido a -196°C (Reichenbach *et al.*, 2002) ou de maneira automática em alguns equipamentos programáveis (Cabodevila & Teruel, 2001).

Após a indução da cristalização da solução crioprotetora à temperatura de -7°C, a queda de temperatura prossegue até -79°C, quando, então, as amostras são diretamente imersas em nitrogênio líquido (Reichenbach *et al.*, 2002), como pode ser observado na figura 9.



**Figura 9** – Curva de congelamento lenta. FONTE: Arquivo pessoal.

#### 2.4.3.2 Método de criopreservação rápida

Além do método de criopreservação lenta, foram testadas diversas metodologias com diferentes velocidades de congelamento. Com relação a essas mudanças, uma das primeiras modificações do protocolo original com resultados substanciais foi introduzida por Willadsen, em 1977 (Cabodevila & Teruel, 2001). Na curva desenvolvida por Willadsen *et al.* (1976, 1978), a velocidade de congelamento era semelhante as que foram utilizadas nos métodos anteriores, porém, com a imersão no nitrogênio líquido sendo feita em temperaturas mais altas, ao redor de – 32°C (Reichenbach *et al.*, 2002).

A contribuição de Willadsen foi relevante, uma vez que possibilitou a redução do tempo para menos da metade do requerido pelo protocolo original (Cabodevila & Teruel, 2001). Essa curva de congelamento é o método atualmente mais utilizado.

#### 2.4.3.3 Vitrificação

Outro importante método de congelamento é a vitrificação que teve origem na década de 80 (Vajta, 2000). Nesse método, os meios de criopreservação sofrem uma passagem direta do estado líquido para um estado amorfo ou vítreo, sem que

haja uma cristalização do meio, evitando, portanto, a formação de cristais de gelo (Hafez, 2004). Ocorre uma desidratação parcial sem que as células alcancem um equilíbrio osmótico (Vajta, 2000).

Essa técnica tem como vantagens: a eliminação da necessidade de máquinas de congelar de alto custo; redução do tempo necessário para o equilíbrio e resfriamento e propicia uma diluição de crioprotetor em uma etapa simples e rápida, após a descongelamento (Hafez, 2004).

Além das vantagens citadas, a vitrificação, quando comparada à criopreservação, apresenta menores danos no resfriamento, visto que as amostras passam rapidamente pelos intervalos mais críticos de temperatura (15°C e -5°C), porém lesões estruturais podem ocorrer em ambos os processos (Vajta, 2000).

Quando o material biológico vitrificado é exposto à temperatura ambiente, utiliza-se o termo esquentar e não descongelar. Por outro lado, desvitrificação não significa, como pareceria, sair do estado de vitrificação para voltar à temperatura ótima celular corporal, mas sim, indica a perda do estado vítreo passando para a cristalização. Isso é indesejável e pode ser incompatível com a viabilidade celular e/ou embrionária (Cabodevila & Teruel, 2001).

A vitrificação apresenta uma velocidade de esfriamento de, aproximadamente, 2500°C/min, sendo necessário o emprego de soluções altamente concentradas de um ou mais crioprotetores permeáveis, que podem ser tóxicos para as células. Essa possibilidade é decorrente das soluções crioprotetoras serem de alto grau de viscosidade e da rápida velocidade de congelamento por imersão direta dessas soluções no nitrogênio líquido, a partir da temperatura ambiente.

Além do aumento das taxas de resfriamento, aquecimento e da concentração de crioprotetores, outros fatores podem facilitar a vitrificação, como a diminuição do volume da solução e o aumento da pressão hidrostática (Vajta, 2000). Foram desenvolvidas diversas ferramentas para um pequeno volume na vitrificação, estas incluem: telas de microscopia eletrônica, o open pulled straw (OPS), os *cryoloops*, as microgotas nas paredes de palhetas comuns de 0,25 ml e capilares de vidro, sendo o OPS mais extensivamente utilizado (Vajta, 2000).

A vitrificação é uma técnica de grandes perspectivas de sucesso, pois apesar de não se ter ainda protocolos consolidados para todas as espécies e tipos celulares, apresenta um grande potencial para a formação futura de bancos de germoplasma. No entanto, os métodos tradicionais de criopreservação (lento e



rápido) ainda são os mais utilizados atualmente para embriões, células germinativas e tecido ovariano.

#### **2.4.4 Descongelamento**

A velocidade de congelamento tem uma relação direta com a velocidade de descongelamento. Quando as células são congeladas a altas velocidades é provável que contenham gelo intracelular e a sobrevivência dessas células aumentam quando o descongelamento é rápido. Em contrapartida, quando as células são congeladas mais lentamente, o descongelamento também deve ser lento (Doyle *et al.*, 1988).

Podem ocorrer danos de natureza osmótica se a velocidade de descongelamento for lenta, fenômeno este denominado recristalização, quando, após a formação de cristais de gelo, eles se rearranjam e fazem uma fusão desigual, aumentando o seu tamanho e acarretando em lesões intracelulares e mecânicas das membranas (Mazur 1984; England 1993).

Assim, segundo Cabodevila e Teruel, (2001) quando o esfriamento vai a temperaturas de  $-30$  a  $-40^{\circ}\text{C}$  é possível realizar a descongelamento de maneira rápida, submergindo as amostras em um banho-maria de  $20$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20-30 segundos. Em contrapartida, no congelamento lento, onde o resfriamento se estende até  $-70^{\circ}\text{C}$ , a descongelamento deve ser efetuada lentamente.

Após o congelamento/descongelamento existem vários métodos para se avaliar a qualidade dos folículos, dentre eles, podemos destacar: histologia clássica e a microscopia eletrônica de transmissão.

### **2.5. Métodos de avaliação da viabilidade folicular**

#### **2.5.1 Análise por Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão**

A viabilidade folicular em tecido ovariano congelado/descongelado pode ser estimada por análise histológica. A histologia pode ser realizada tanto em folículos isolados como naqueles inclusos no córtex ovariano (Matos *et al.*, 2007). Contudo, a análise morfológica via histologia não é suficiente para avaliar o processo de criopreservação (Van den Hurk *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2001; Lucci *et al.*, 2004a). Esse tipo de análise irá permitir somente a identificação dos sinais avançados de

atresia (picnose nuclear, danos citoplasmático, desconexão entre células da granulosa e o ovócito, bem como irregularidades na membrana basal). Por outro lado, essa técnica apresenta uma grande vantagem, pois possibilita que um grande número de folículos seja avaliado, o que a torna importante quando se deseja realizar uma análise quantitativa (Matos *et al.*, 2007).

Porém, na análise histológica, a morfologia celular não está sempre correlacionada com a integridade das organelas. Folículos considerados normais após avaliação histológica podem apresentar alterações degenerativas na sua ultraestrutura, tanto após o isolamento (Lucci *et al.*, 1999), como após resfriamento (Silva *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Lucci *et al.*, 2004b) e criopreservação (Rodrigues *et al.*, 2004; Lucci *et al.*, 2004a).

Van der Hurk *et al.*, (1998) afirmam que a investigação ultraestrutural promove informações adicionais sobre a qualidade dos folículos e que somente a determinação da viabilidade folicular pela análise histológica não é suficiente.

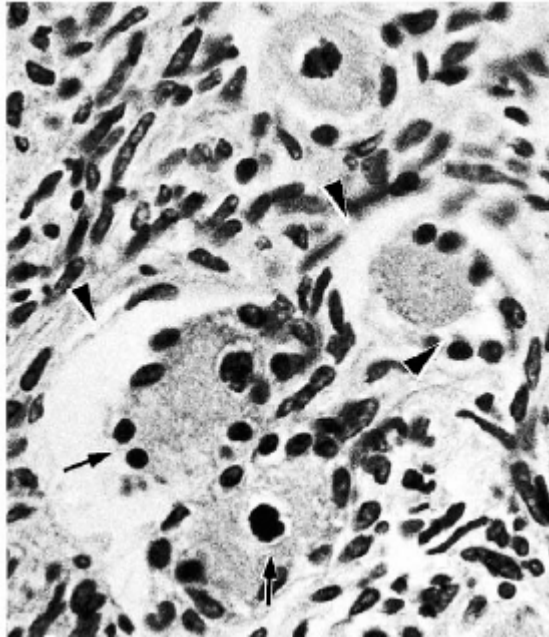
Gosden (2000) observou que a histologia clássica também é relativamente pouco precisa se realizada imediatamente após a descongelamento do tecido ovariano, pois algumas alterações das organelas podem se manifestar como degeneração mais avançada somente algumas horas após o processo de descongelamento.

Portanto, para avaliar as organelas celulares é necessário um método de maior acurácia. A avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (MET) satisfaz essa necessidade (Rodrigues *et al.*, 2004). Na MET os folículos podem ser avaliados com mais detalhes, por meio da detecção da integridade das mitocôndrias e retículo endoplasmático, bem como vacuolização celular, sendo este um método de análise qualitativa (Matos *et al.*, 2007).

### **2.5.2 Descrição por histologia e microscopia eletrônica de transmissão**

Na análise histológica, as características dos folículos classificados como degenerados após um processo de criopreservação são semelhantes entre as espécies domésticas (ovinos, bovinos e caprinos). Após a criopreservação, os folículos degenerados podem ser distinguidos em vários tipos: folículo caracterizado por picnose do núcleo do ovócito, retração do ovócito, separação do folículo do estroma, perda do contato entre o ovócito e as células da granulosa e picnose da

célula da granulosa, algumas dessas características podem ser vista na figura 10 (Lucci *et al.*, 2004b; Rodrigues *et al.* 2004; Capachietti *et al.* 2004 e Cecconi *et al.* 2004).



**Figura 10** – Folículo pré-antral análise histológica. Note nas setas destacamento do folículo das células do estroma, e do ovócito e das células da granulosa (cabeça da seta) e também picnose do núcleo do ovócito e das células da granulosa (setas). FONTE: Lucci *et al.*, 2004b.

Quando os folículos pré-antrais são criopreservados podem ocorrer alterações indicativas de atresia que ocorrem na maioria das vezes primariamente no ovócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal. Segundo Matos *et al.* (2007), os ovócitos se mostram mais sensíveis a degeneração do que as células da granulosa. Porém, alguns autores afirmam que com relação aos folículos secundários, os ovócitos e as células da granulosa são igualmente afetados pela degeneração (Silva *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2004). Vanhoutte *et al.*, (2004) sugeriram que ovócitos rodeados por duas ou mais camadas de células da granulosa estão mais protegidos, e por isso, são mais resistentes aos danos causados pela baixa temperatura. Portanto, a maior sensibilidade do ovócito em relação a granulosa ocorre somente em folículos com poucas camadas de células da granulosa (folículos primordiais ou primários).

Já por meio da MET, alguns autores relataram folículos após a criopreservação, em estágio inicial de degeneração (Rodrigues *et al.*, 2006; Santos

*et al.*, 2006b). Nesses trabalhos foi descrito, um citoplasma do ovócito extremamente vacuolizado com fusão desses vacúolos apresentando áreas vazias no citoplasma. Sinais iniciais de danos na membrana da mitocôndria e de suas cristas também foram observados após a criopreservação de folículos. Também foi descrito e em alguns casos sinais avançados como retração do ovócito e irregularidade da membrana nuclear (Santos *et al.*, 2006b). As células da granulosa foram descritas como inchadas, com baixa quantidade de organelas no seu citoplasma, sendo que algumas células desapareceram surgindo um espaço vacuolizado (Rodrigues *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006b).

### **2.5.3 Cultivo *in vitro***

Outro método de avaliação da viabilidade folicular é o cultivo *in vitro* (Matos *et al.*, 2007). Evidentemente que para se aproveitar os folículos criopreservados pode ser realizado um cultivo *in vitro* de longo período após o congelamento e descongelamento de folículos pré-antrais, podendo esses crescerem e se diferenciarem até o estágio de folículos pré-ovulatórios. Esse cultivo de longo prazo é um ótimo método para se avaliar a viabilidade folicular, podendo ser de poucos dias, em algumas espécies (ratos: Cain *et al.*, 1995) como também pode chegar a 100 dias (bovinos : Gutierrez *et al.*, 2000).

Entretanto, as condições necessárias para o completo desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de animais domésticos e humanos ainda não foram totalmente estabelecidas. Isso se deve principalmente à falta de informação sobre a regulação do crescimento folicular e ovocitário na fase pré-antral, sendo necessário o estudo dos fatores envolvidos em cada etapa do desenvolvimento folicular, incluindo a ativação, proliferação e diferenciação das células da granulosa, crescimento e maturação oocitária, bem como ovulação (Van den Hurk *et al.*, 2000).

Também existe a possibilidade de se realizar cultivos mais curtos de 1 a 4 horas. A justificativa da utilização desse cultivo de curta duração é que o dano folicular causado pela criopreservação não pode ser imediatamente observado, necessitando de algumas horas de cultivo *in vitro* para que o tecido retome as condições fisiológicas de temperatura. Essa incubação visa fazer com que o tecido e o folículo retornem às condições de metabolismo celular normal após o procedimento de congelamento e descongelamento, e não visa um crescimento

folicular (Vanhoutte *et al.*, 2004). Neste caso, após o cultivo de curta duração, as células devem ser avaliadas por outro método, como por exemplo a histologia e a MET.

Alguns autores afirmam que um cultivo de curta duração (1 hora) em espécies extremamente resistentes ao frio (como ratos) é suficiente para a restauração de algumas alterações provocadas pela queda da temperatura, como desorganização das fibras de actina e tubulina (Vanhoutte *et al.*, 2004).

#### **2.5.4 Outros métodos de avaliação**

Existem outros métodos para análise de folículos pré-antrais, após a criopreservação, dentre eles podemos citar os corantes vitais, sistemas de detecção de apoptose, marcadores de viabilidade folicular e de proliferação de células da granulosa, bem como análise dos produtos de secreção folicular (Matos *et al.*, 2007).

É importante destacar que a utilização concomitante de diferentes técnicas possibilita uma maior confiabilidade nos resultados de folículos normais após o processo de criopreservação.

### 3. JUSTIFICATIVA

A criopreservação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais tem sido largamente testada em animais de laboratório, humanos e algumas espécies domésticas, e apresenta grande potencial uma vez que a criopreservação de ovócitos provenientes de folículos antrais são muito mais sensíveis à baixa temperatura. Essa sensibilidade é observada especialmente em suínos onde a sobrevivência dos ovócitos já está comprometida a partir de 15°C (Didion *et al*, 1990). A presença de grande quantidade de lipídios citoplasmáticos foi considerada um obstáculo ao congelamento de ovócitos (Nagashima *et al.*, 1994). Para contornar esse problema foi realizada a delipidação (retirada de lipídios do citoplasma), porém, após esse método, observou-se o comprometimento do desenvolvimento embrionário posterior (Nagashima *et al*, 1994). A vitrificação também foi utilizada como uma alternativa para diminuir os danos causados pelo frio e a formação de cristais de gelo em ovócitos suínos. Entretanto, também foram obtidos resultados insatisfatórios em ovócitos suínos provenientes de folículos antrais (Somfai *et al.*, 2007).

A utilização de folículo pré-antral suíno, devido à sua baixa quantidade de lipídio e a maior resistência ao frio, seria, portanto uma alternativa para a preservação de gametas femininos nessa espécie, além deles poderem ser obtidos em qualquer fase da vida de uma fêmea. Também apresenta uma grande vantagem auxiliando na proteção de espécies de animais em vias de extinção pertencentes à mesma família do suíno, como o cateto (*Tayassu tajacu*) e o queixada (*Tayassu*

*pecarí*). Como não há relatos na literatura a respeito da criopreservação de folículos pré-antrais suínos, é necessário que pesquisas sejam feitas a respeito, abrindo novas possibilidades para a conservação de ovócitos nesta espécie. As pesquisas devem estudar, por exemplo, a utilização de diferentes crioprotetores para o processo de criopreservação. Caso os ovócitos inclusos em folículos pré-antrais apresentem maior tolerância ao frio e bons resultados na taxa de folículos normais após a criopreservação, a biotecnologia de manipulação de folículos pré-antrais abrirá novas possibilidades para a conservação de ovócitos nesta espécie.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

- Testar o efeito de diferentes crioprotetores sobre a criopreservação de tecido ovariano suíno;

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar quantitativamente a eficiência dos crioprotetores usados na criopreservação sobre a morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais congelados/descongelados, antes e depois de um período de cultivo *in vitro*, por meio de análise histológica;
- Avaliar qualitativamente o efeito dos crioprotetores usados na criopreservação sobre a ultra-estrutura dos folículos ovarianos pré-antrais congelados/descongelados, antes e depois de um período de cultivo *in vitro*, através de MET.



## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

O tecido ovariano de porca foi submetido ao processo de criopreservação utilizando-se 4 diferentes crioprotetores: GLY (10%), DMSO (1,5 M), PROH (1,5 M) e Etileno glicol (1,5 M). As concentrações utilizadas foram escolhidas com base nos melhores resultados obtidos para outras espécies (Lucci et al., 2004a).

### **5.1 Obtenção e processamento dos ovários e protocolo experimental**

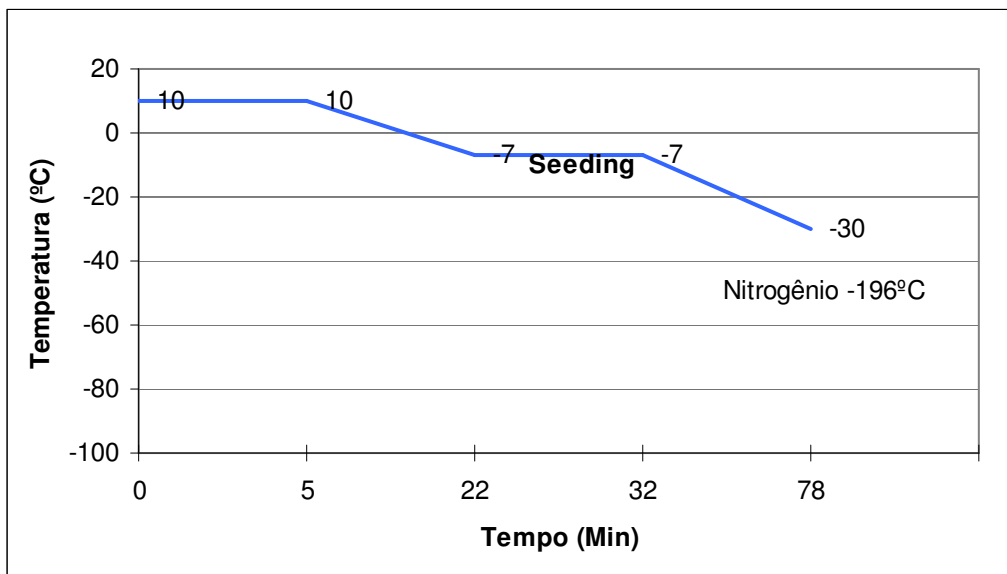
Três ovários de 3 diferentes porcas impúberes foram usados. Ovários de porca foram obtidos em abatedouros locais e transportados até o laboratório em solução salina a temperatura de 36-38°C por 1 hora. No laboratório, os ovários foram lavados em etanol 70% e foram retiradas de cada ovário 10 fatias do córtex medindo aproximadamente 2mm x 1mm x 1cm. Uma fatia de cada ovário foi escolhida ao acaso para ser imediatamente fixada (controle), a outra foi colocada no cultivo *in vitro* por 2 horas (Controle cultivo) e posteriormente fixada. As outras 8 amostras foram escolhidas ao acaso e congeladas utilizando os 4 crioprotetores (GLY (10%), PROH (1.5M), EG (1.5 M) and DMSO (1.5 M)), sendo duas amostras por cada tratamento. Uma amostra, após o descongelamento, foi imediatamente fixada e a outra, após o descongelamento, passou por um cultivo de duas horas e posterior fixação.

## 5.2. Congelamento do tecido ovariano

Todas as soluções de crioprotetores foram preparadas com PBS adicionado de 0,4% de sacarose. Primeiramente, as amostras de tecido ovariano foram equilibradas nas soluções contendo os diferentes crioprotetores por 20 min a 10°C, em criotubos contendo 1,0 ml de solução. Após este período de equilíbrio, os criotubos foram transferidos para o equipamento de congelamento controlado (Dominium K, Biocom Figura 11.), programado para realizar a seguinte curva de congelamento (Figura 12): partindo de 10°C, resfriar 1°C/min até atingir a temperatura de - 7°C, para realização do *seeding* manual, permanecendo a - 7°C por 15 min, resfriar 0,3°C/min até a temperatura de - 30°C, quando os tubos contendo as amostras foram mergulhados em nitrogênio líquido (-196°C). As amostras permaneceram congeladas por, no mínimo, 7 dias antes de serem descongeladas.



**Figura 11** – Congelador Programável. FONTE: Arquivo pessoal.



**Figura 12** - Curva congelamento Rápida. FONTE: Arquivo pessoal.

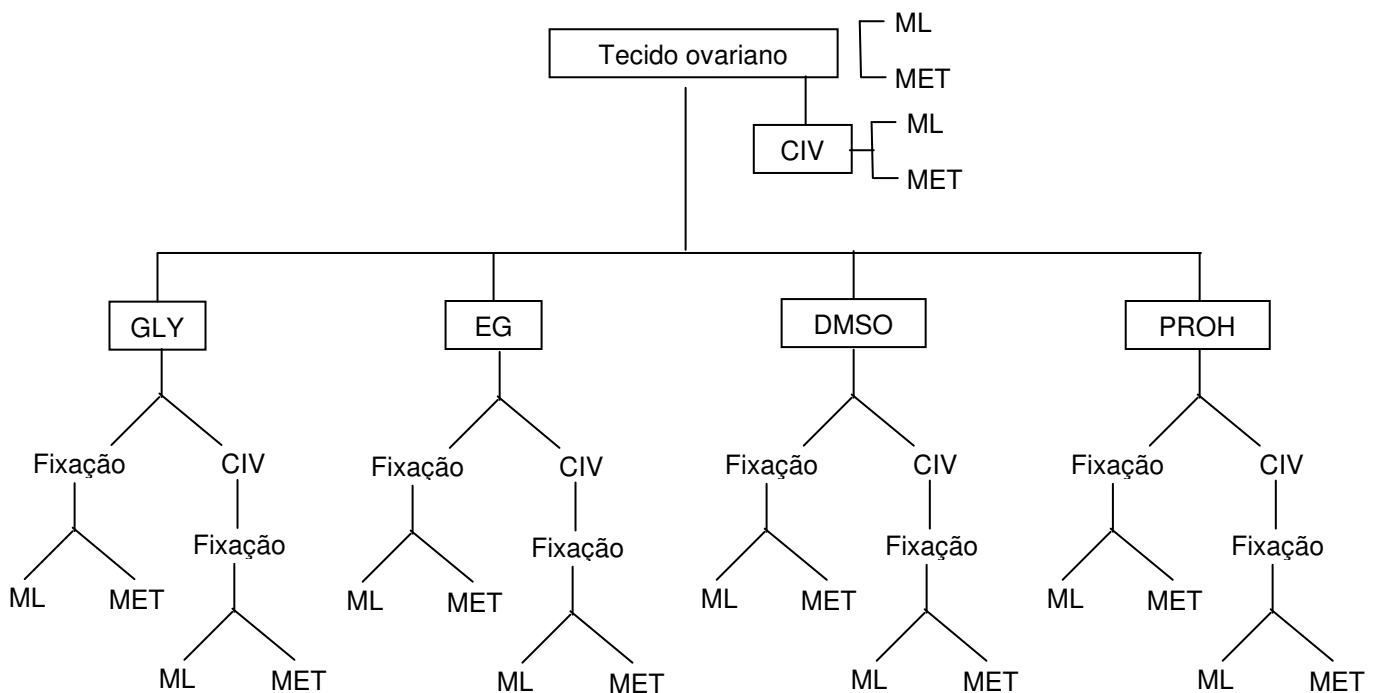
### 5.3 Descongelamento do tecido ovariano

O descongelamento das amostras foi feito por exposição dos criotubos ao ar por 30s, seguido de imersão em banho-maria a 38°C até que as amostras estivessem completamente descongeladas. Após o descongelamento das amostras, foi realizada a retirada dos crioprotetores por lavagens sucessivas em meio contendo concentrações decrescentes dos crioprotetores e 0,4% de sacarose. Desta forma, a primeira lavagem foi feita retirando-se metade da solução de crioprotetor e adicionando-se o mesmo volume de solução de sacarose 0,4% em PBS. Na segunda lavagem, foi retirada metade da solução anterior e adicionado o mesmo volume de PBS e já na terceira retirou-se todo o conteúdo substituindo-o por PBS puro. O tempo entre uma lavagem e a seguinte foi de 5 minutos.

### 5.4. Cultivo *in vitro*

Amostras de tecido ovariano fresco e congelado/descongelado, foram submetidas a 2 h de cultivo *in vitro* incubados em uma placa de 4 poços (Nunc, Roskild, Denmark) em 1mL de meio de cultura. Esta incubação visa fazer com que o tecido e os folículos retornem às condições de metabolismo celular normal após o procedimento de congelamento e descongelamento. As amostras de tecido ovariano provenientes dos tratamentos de criopreservação, bem como de tecido ovariano

fresco foram cultivadas em condições mínimas (meio de manutenção), a saber: o tecido foi incubado em meio Waymouth (Hirao *et al.* 1994, Lucci *et al.*, 2007) suplementado com 0,23mM piruvato, 2mM glutamina, 6,25µg/ml insulina, 6,25µg/ml transferrina e 6,25 ng/ml selênio (ITS), 100µg/ml ácido ascórbico, 100µg/ml penicilina, 50µg/ml estreptomicina e (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5% SBF, a 38,5°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Após este período, o material foi então processado para análise histológica e ultra-estrutural. O desenho esquemático do protocolo experimental pode ser visto nas figura 13.



**Figura 13** – Protocolo Experimental para testar o efeito de diferentes crioprotetores na morfologia de folículos pré-antrais em tecido ovariano suíno criopreservado. ML – Microscopia de luz; MET – Microscopia Eletrônica de transmissão; CIV – Cultivo *in vitro*..

## 5.5. Análise histológica

Foram processadas para análise histológica amostras de tecido proveniente do procedimento de congelamento/descongelamento, além de amostras de tecido fresco (não criopreservado) que serviram como controle, antes e após cultivo *in vitro*. As amostras de tecido foram fixadas em solução Carnoy por 4 h. Após a fixação, os

fragmentos ovarianos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol, embebidos em paraplast (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany) e seccionados à espessura de 5µm. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas ao microscópio de luz (Oberkochen, Germany).

Os folículos pré-antrais observados foram contados (mínimo de 25 folículos/animal/tratamento), classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordial, apresentavam uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso e/ou cúbica, e em crescimento, que apresentavam uma ou mais camadas de célula da granulosa de forma cubóide) e considerados como morfológicamente normais ou degenerados de acordo com a aparência morfológica. Folículos foram considerados degenerados quando apresentaram corpos picnóticos nas células da granulosa, núcleo ovocitário condensado, grandes vesículas no citoplasma do ovócito ou baixa densidade celular. Foram considerados para classificação, apenas, os folículos cujos ovócitos apresentaram núcleo visível.

## **5.6 Avaliação ultra-estrutural**

Para a análise ultra-estrutural, pequenos fragmentos de tecido ovariano retirados do tecido fresco e das amostras criopreservadas com diferentes crioprotetores, antes e após cultivo *in vitro*, foram fixados em solução de Karnowsky (2,5% Glutaraldeído, 2% Paraformaldeído em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M; pH 7,3), pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%) ferricianeto de potássio (0,8%) e 5mM de cloreto de cálcio. As amostras foram desidratados em concentrações decrescentes de acetona e infiltrados e incluídos em resina Spurr. Cortes semi-finos (3µm) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz para localização prévia dos folículos (Jeol, Tokyo, Japan). Os cortes ultra-finos (70nm) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011).

Os folículos observados foram analisados e avaliados em função da aparência geral, aspecto geral do citoplasma, quantidade, tamanho e distribuição das organelas citoplasmáticas do ovócito e da granulosa bem como das gotas de lipídeo, do contorno e integridade das membranas plasmáticas, basais e nucleares das células que compõem o folículo ovariano pré-antral suíno e da frequência de associação entre organelas e estruturas do citoplasma.

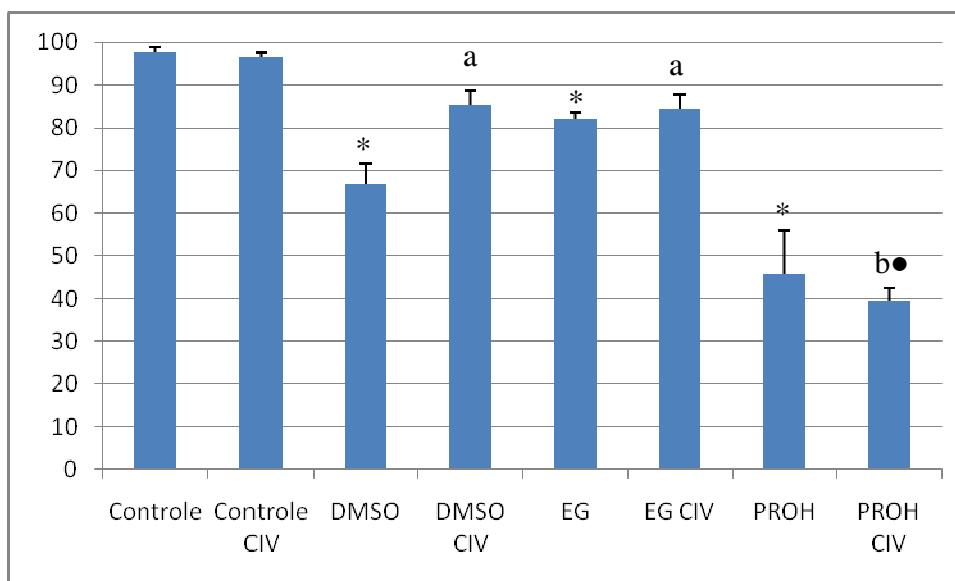
Somente foram analisados pela microscopia eletrônica de transmissão os tratamentos que obtiveram melhores resultados na histologia.

### **5.7 Análise estatística**

As porcentagens de folículos morfológicamente normais observadas em tecido ovariano fresco e nos tratamentos de congelamento/descongelamento utilizando os 4 diferentes crioprotetores, antes e após cultivo *in vitro* foram comparadas entre si. Os dados foram transformados para  $\arcsen\sqrt{\phantom{x}}$  e analisados por ANOVA e Teste Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $P < 0,05$  e foram calculadas as médias  $\pm$  D.P para as três réplicas.

## 6. RESULTADOS

No total, 708 folículos foram analisados. Quando o tecido ovariano foi criopreservado com GLY nenhum folículo morfológicamente normal (FMN) foi encontrado antes ou após o CIV (0% FMN) e, por este motivo, o GLY não foi incluído nos gráficos. As porcentagens de FMN frescos e criopreservados utilizando DMSO, EG e PROH como crioprotetores, antes e depois do cultivo *in vitro* podem ser vistas na figura 14. Uma média muito baixa de degeneração foi observada em tecido ovariano não criopreservado (controle 97,7% FMN, e amostras de tecido fresco cultivado *in vitro* 97,5% FMN). Em amostras de tecido ovariano criopreservadas com DMSO, EG ou PROH, a porcentagem de FMN foi significativamente diferente quando comparada com o controle ( $P < 0,05$ ). Em contrapartida, depois do cultivo *in vitro* (CIV), somente o tratamento criopreservado com PROH diferiu do controle CIV ( $P < 0,05$ ). Antes do CIV, nenhuma diferença foi observada comparando os crioprotetores entre si. Depois do CIV, o uso de PROH apresentou significativamente menos FMN do que o DMSO e o EG ( $P < 0,05$ ).



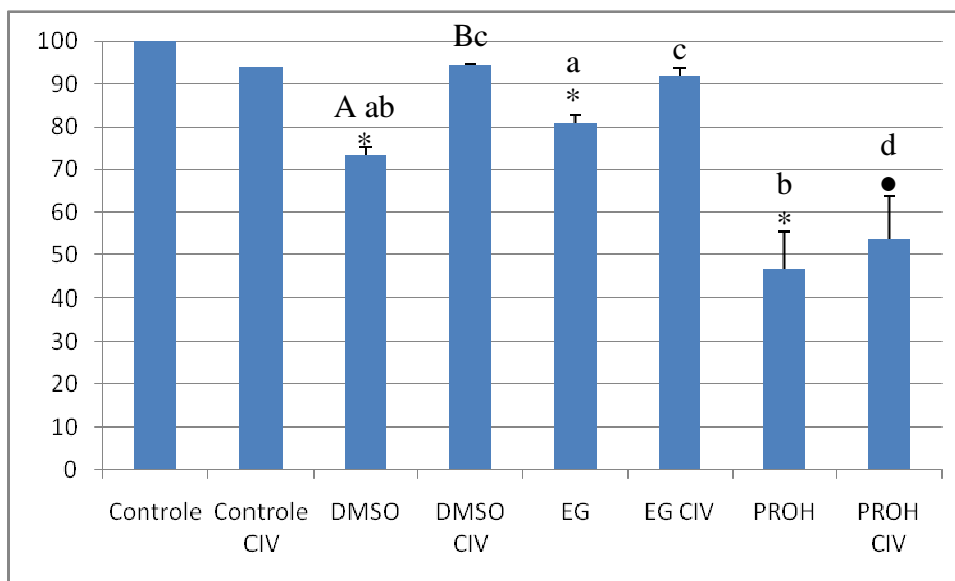
**Figura 14** – Porcentagem média ( $\pm$  D.P.) de folículos pré-antrais totais morfologicamente normais (FMN) em amostras de tecido ovariano fresco (Controle) e tecido ovariano criopreservado utilizando diferentes crioprotetores (DMSO, EG e PROH) antes e após a realização de cultivo *in vitro* (CIV).

\* Difere do controle; • Difere do controle cultivo ( $P < 0.05$ ).

ab Letras diferentes indicam diferenças entre os crioprotetores depois do CIV ( $P < 0.05$ ).

Considerando somente folículos primordiais (Figura 15), a taxa de FMN dos tecidos ovarianos criopreservados com os 3 crioprotetores foi significativamente menor quando comparada à do controle ( $P < 0,05$ ), e depois do cultivo somente o PROH apresentou menor taxa de FMN, quando comparado ao controle CIV ( $P < 0,05$ ). Entre os crioprotetores, o EG teve um melhor resultado em relação ao PROH antes do CIV, e EG e o DMSO foram melhores do que o PROH depois do CIV ( $P < 0,05$ ). Entretanto, quando os resultados do mesmo crioprotetor, antes e depois do cultivo *in vitro*, um significativo aumento na porcentagem de FMN foi observado no DMSO após o CIV ( $P < 0.05$ ).





**Figura 15** – Porcentagem média ( $\pm$  D.P.) de folículos primordiais morfologicamente normais em amostras de tecido ovariano fresco (Controle) e criopreservado utilizando diferentes crioprotetores (DMSO, EG e PROH) antes e após cultivo *in vitro* (CIV).

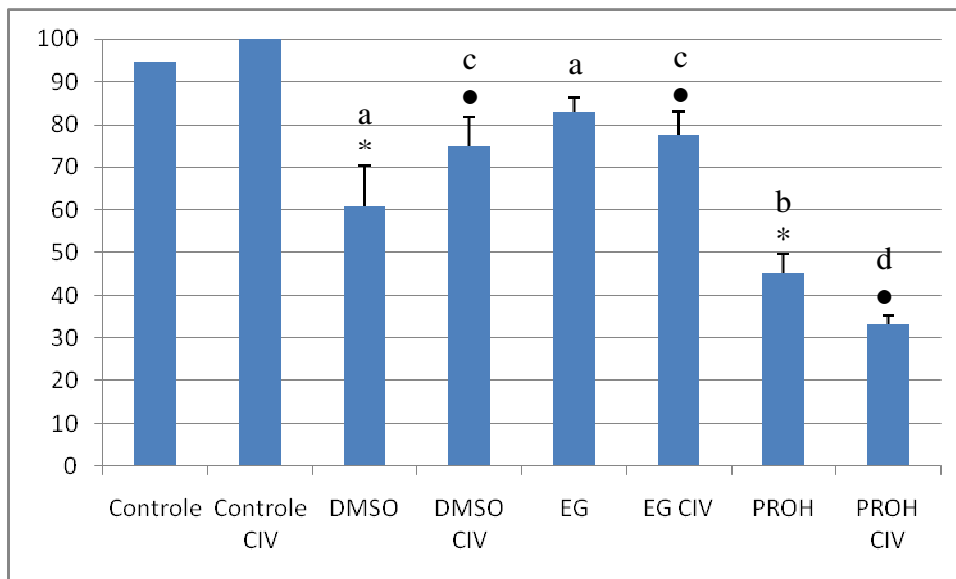
\* Difere do controle ( $P < 0.05$ ); • Difere do controle CIV ( $P < 0.05$ )

ab Diferentes letras indicam diferença entre os crioprotetores antes do CIV ( $P < 0.05$ )

cd Diferentes letras indicam diferença entre os crioprotetores depois do CIV ( $P < 0.05$ ).

AB Letras diferentes indicam diferenças do mesmo crioprotetor antes e depois do CIV ( $P < 0.05$ ).

Em relação aos folículos em crescimento (Figura 16), foi observada nos tecidos criopreservados com DMSO e PROH uma quantidade de FMN significativamente menor quando comparada ao controle ( $P < 0,05$ ), no entanto o EG não apresentou diferença em relação ao controle ( $P > 0,05$ ). Depois do CIV os três crioprotetores utilizados foram significativamente menores quando comparado ao controle cultivo ( $P < 0,05$ ). Entretanto, o PROH mostrou resultados significativamente inferiores ao EG e DMSO tanto antes como depois do CIV ( $P < 0,05$ ).



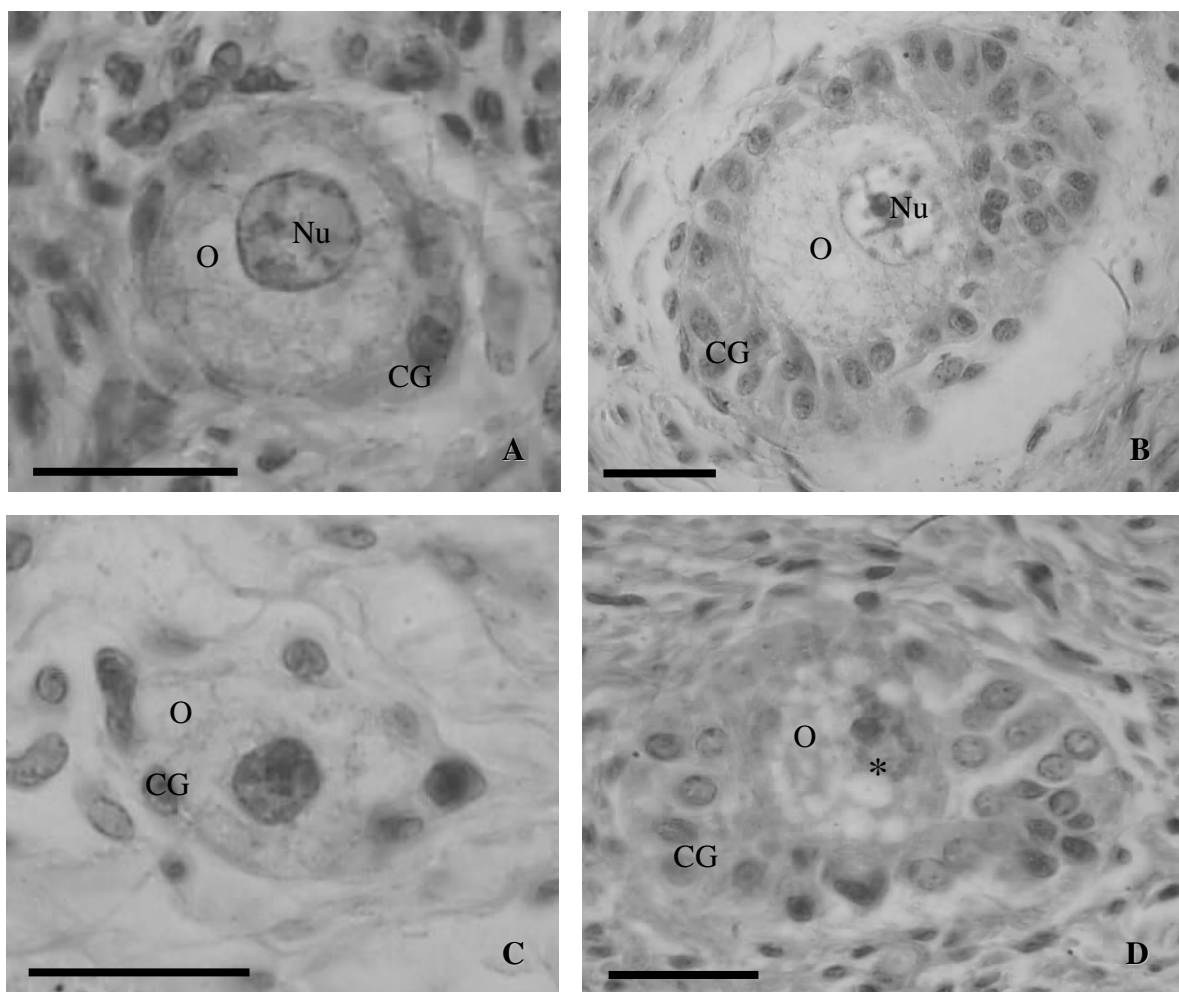
**Figura 16** – Porcentagem média ( $\pm$  D.P.) de folículos em crescimento morfológicamente normais em amostras de tecido ovariano fresco (Controle) e tecido ovariano criopreservado utilizando diferentes crioprotetores (DMSO, EG e PROH) antes e após o cultivo *in vitro* (CIV).

\* Difere do controle ( $P < 0.05$ ); • Difere do controle CIV ( $P < 0.05$ )

ab Diferentes letras indicam diferença entre os crioprotetores antes do CIV ( $P < 0.05$ )

cd Diferentes letras indicam diferença entre os crioprotetores depois do CIV ( $P < 0.05$ ).

Na análise histológica, FMN foram caracterizados pela presença de um ovócito redondo ou oval, com núcleo bem delimitado e cromatina não condensada, rodeado por células da granulosa, que não apresentaram núcleo picnótico (Fig. 17A e B). A respeito dos folículos degenerados, a característica predominante foi o núcleo picnótico, ovócito retraído, ovócito com o citoplasma vacuolizado e desorganização das células da granulosa (Fig. 17C e D).



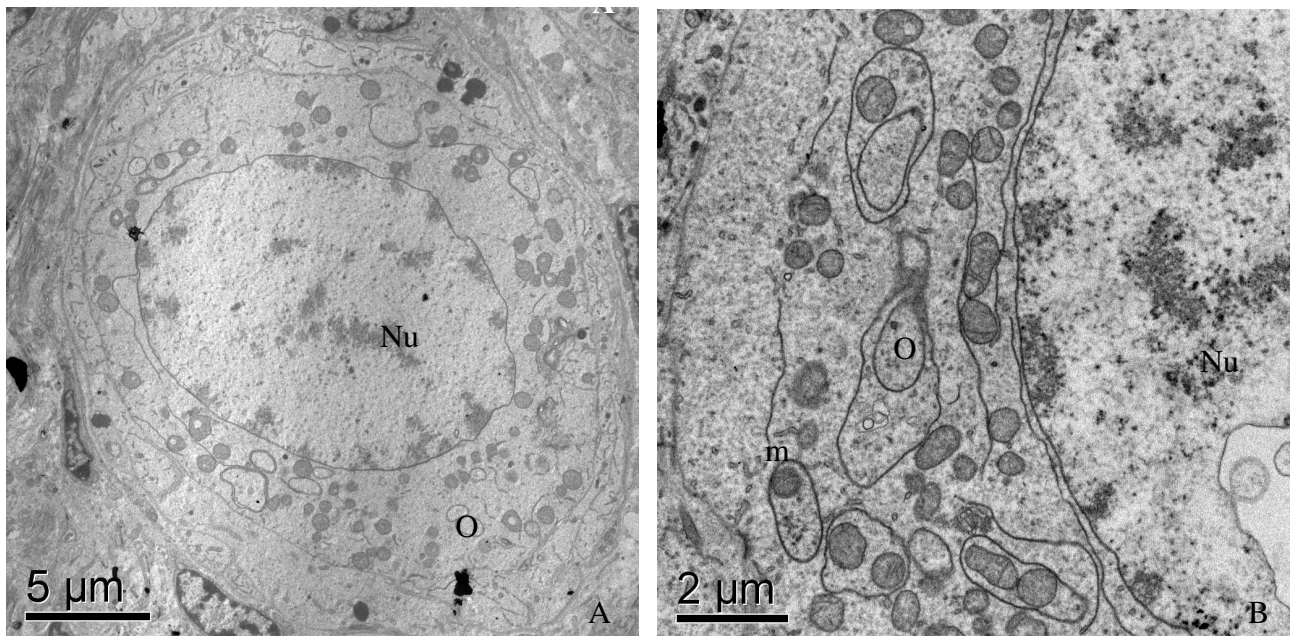
**Figura 17** – Análise histológica de folículos pré-antrais. (A) Folículo primordial morfológicamente normal criopreservado com DMSO. (B) Folículo em crescimento morfológicamente normal criopreservado com EG (C) Folículo primordial degenerado criopreservado com PROH e cultivado *in vitro*, notar a desorganização das células da granulosa. (D) Folículo em crescimento degenerado criopreservado com PROH, notar ovócito com o núcleo picnótico (\*) e citoplasma vacuolizado. O: Ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo. Barra= 20 $\mu$ m.

A respeito da análise ultraestrutural, os folículos do grupo controle (Figura 18A) apresentaram os ovócitos com um grande núcleo central bem delimitado por um envelope nuclear. As organelas estavam uniformemente distribuídas no citoplasma. As organelas mais evidentes foram as mitocôndrias que apresentaram formato redondo. Um pequeno número de mitocôndrias, de formato alongado, também foi observado em alguns casos. Algumas cisternas de retículo

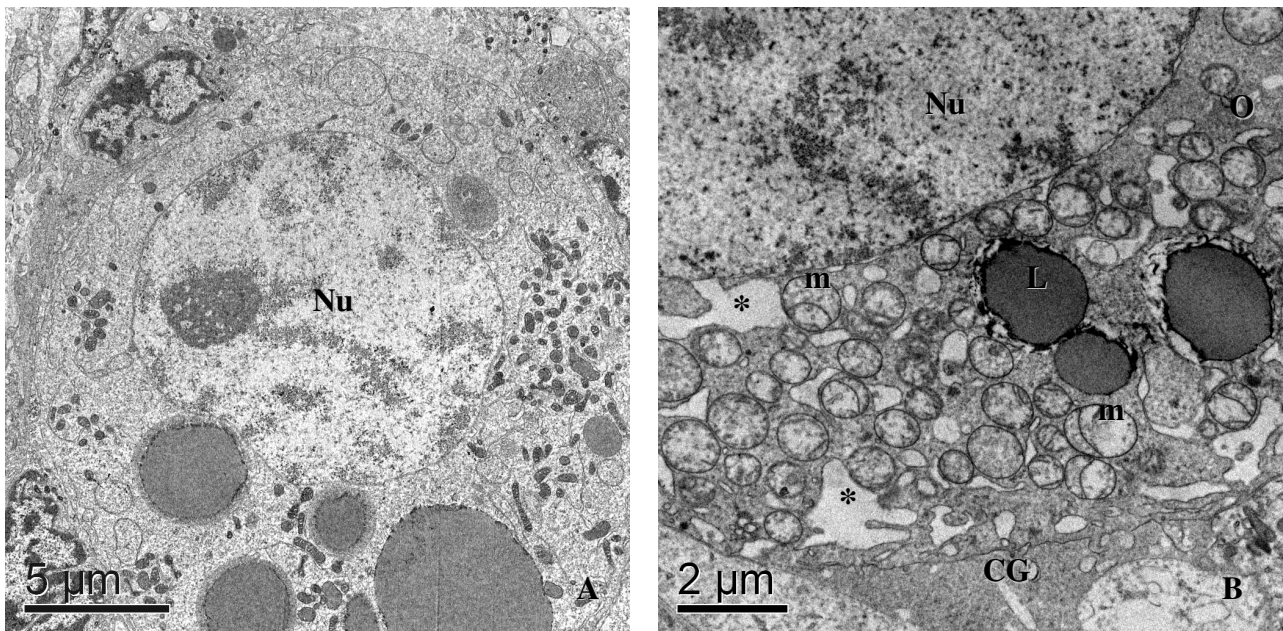
endoplasmático liso, gotículas de lipídio e vesículas também foram vistas igualmente distribuídos pelo citoplasma de maneira homogênea.

Folículos do controle CIV (Figura 18B) apresentaram uma ultraestrutura similar ao controle.

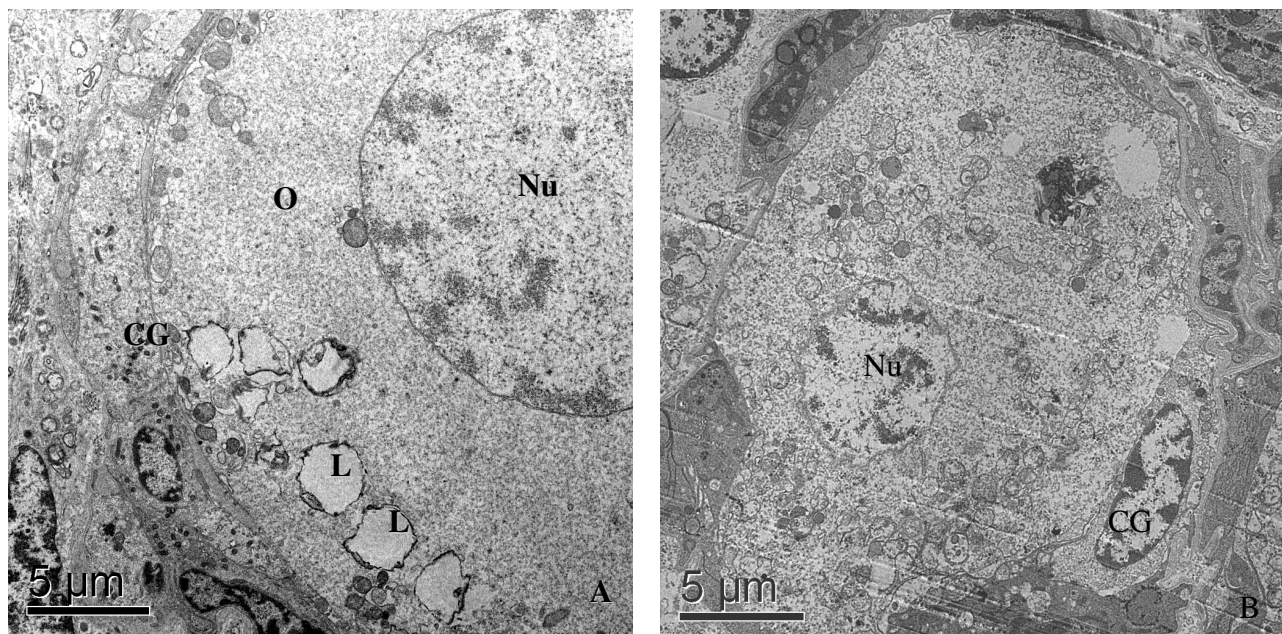
Em geral, a ultraestrutura dos folículos criopreservados com DMSO ou EG, antes e depois do CIV, foi similar. A sua ultraestrutura não foi muito diferente dos folículos do controle (Figura 19A), porém algumas alterações puderam ser observadas. Os citoplasmas de ovócitos criopreservados tinham uma aparência granulada (Figura 20A e 20B) e espaços vazios (Figura 19B). Mitocôndrias inchadas (Figura 19B) também puderam ser vistas. Em todos os folículos analisados, as células da granulosa apresentaram uma aparência normal.



**Figura 18.** Análise por microscopia eletrônica de transmissão de folículos do controle (A) e controle CIV (B). Note a estrutura normal com mitocôndrias redondas e retículo endoplasmático no citoplasma do ovócito. O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, L: gotícula de lipídio, m: mitocôndria, re: cisterna de retículo endoplasmático.



**Figura 19.** Análise por microscopia eletrônica de transmissão de folículos criopreservados com DMSO antes (A) e depois do CIV (B). Note a estrutura normal (A), com mitocôndrias redondas e cisternas de retículo endoplasmático. As principais alterações observadas em folículos criopreservados foram mitocôndrias inchadas (B). O citoplasma de ovócitos criopreservados também apresentou uma aparência granulada e alguns espaços vazios (B). O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, L: gotícula de lipídio, m: mitocôndria, re: cisterna de retículo endoplasmático, \*: espaços vazios.



**Figura 20** - Análise por microscopia eletrônica de transmissão de folículos criopreservados com EG antes (A) e depois do CIV (B). O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, L: gotícula de lipídio.

## 7. DISCUSSÃO

Esse estudo foi o primeiro relato sobre o efeito de diferentes crioprotetores sobre a criopreservação de folículos pré-antrais em tecido ovariano suíno. Estudos similares foram feitos em tecido ovariano de humano (Schmidt *et al.* 2003), ovelha (Santos *et al.* 2006b; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004), cabra (Santos *et al.* 2006c; Rodrigues *et al.* 2004), bovino (Celestino *et al.* 2008; Lucci *et al.* 2004a), e felino (Lima *et al.* 2006).

No presente estudo, o tecido ovariano suíno foi melhor preservado em DMSO ou EG do que em PROH ou GLY. DMSO e EG têm sido relatados como melhores agentes crioprotetores para criopreservação de tecido ovariano de muitas espécies (bovino - Lucci *et al.* 2004a; Celestino *et al.* 2008; caprino - Santos *et al.* 2006c; Rodrigues *et al.* 2004; ovino - Santos *et al.* 2006b; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004; humano - Schmidt *et al.* 2003; felino - Lima *et al.* 2006). Comparando DMSO e EG entre si, alguns autores relataram que o EG foi melhor do que o DMSO para criopreservação de tecido ovariano ovino, bovino e caprino (Amorim *et al.* 2007; Cappachietti *et al.* 2004; Cecconi 2004; Celestino *et al.* 2008; Santos *et al.* 2006c). Entretanto, outros trabalhos em bovino (Lucci *et al.* 2004a) e ovino (Santos *et al.* 2006b) mostraram que DMSO apresentou melhores resultados do que EG.

Quando a velocidade de penetração do GLY, EG, DMSO e PROH foi comparada, resultados indicam que o EG e o DMSO são melhores para criopreservar tecido ovariano, por que possuem menor peso molecular, o que permite uma maior velocidade de penetração quando comparado ao PROH e ao GLY (Newton *et al.* 1998). De acordo com Newton *et al.* (1998), a melhor sobrevivência folicular está em parte determinada pela permeabilidade do

crioprotetor. A maioria das células é relativamente impermeável ao GLY, podendo causar severos danos osmóticos. Conseqüentemente esse crioprotetor não é indicado para alguns tipos celulares, incluindo tecido ovariano (Amorim *et al.* 2006).

Foram identificados canais específicos que facilitam o transporte do GLY para dentro da célula denominados AQP7. A AQP7 é uma proteína expressa extensivamente em algumas células de espécies animais. Nas células em que a AQP7 é expressa o transporte de GLY é prioridade (não o transporte de água). As células de algumas espécies em que se acredita haver uma falta de AQP7, como os espermatozóides de coelho, não são, portanto, bem criopreservados com a utilização do GLY (Curry, 2000). Como ainda não há trabalhos mostrando a presença de AQP7 em ovócitos suínos, talvez os suínos não apresentem esses canais específicos para o transporte de GLY.

O presente estudo demonstrou que o tecido ovariano criopreservado com EG ou DMSO apresentou uma alta porcentagem de FMN na análise histológica, e esses folículos apresentaram pequenas alterações quando avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. Estudos prévios de congelamento e descongelamento de tecido ovariano (Lucci *et al.* 2004a) também relataram que a análise histológica não é sempre confirmada pela análise ultraestrutural.

No presente estudo, mudanças discretas na ultraestrutura, como mitocôndria inchada e algumas áreas vazias, puderam ser vistas em folículos pré-antrais criopreservados com DMSO e EG. Essas áreas vazias do citoplasma do ovócito podem representar cisternas de retículo endoplasmático dilatadas (Tassel & Kennedy, 1980; Sobaniec-Lotowska & Lebensztejn, 2006). Cisternas de retículo endoplasmático dilatadas e mitocôndrias inchadas foram descritos em ovócitos (Silva *et al.* 2001; Van den Hurk *et al.* 1998) células luteais (Coss *et al.* 1979; Fields *et al.* 1992) e outros tipos celulares (Ding *et al.* 2003; Kaassik *et al.* 2007). O inchaço da mitocôndria e do retículo endoplasmático é descrito como conseqüência de mudança no balanço iônico causado por alteração na permeabilidade da membrana plasmática (Coss *et al.* 1979). No presente experimento, essas alterações podem ser devidas a danos osmóticos relacionados com os agentes crioprotetores no processo de criopreservação.

As mitocôndrias inchadas podem afetar o metabolismo da célula (Safiulina *et al.* 2006; Kaasik *et al.* 2007). No entanto, trabalhos mostraram que essa alteração pode ser reversível em um pequeno intervalo de tempo (Kalashnikova, 1979;



Kwiatkowska, 1981). Mudanças discretas na ultraestrutura do folículo pré-antral também foram vistas em tecido ovariano de ovelha criopreservado com EG (Santos *et al.* 2006c). De acordo com Silva *et al.* (2001), mitocôndria e retículo endoplasmático com aumento de volume são sinais iniciais de degeneração. Sinais de degeneração avançada não foram observados no presente estudo.

Em contrapartida, apesar das alterações que foram observadas em ovócitos de folículos criopreservados, as células da granulosa apresentaram sempre uma aparência normal. Esse dado já era previsto, já que os ovócitos dos folículos pré-antrais são mais sensíveis a degeneração do que as células da granulosa (Braw-Tall & Yossefi, 1997).

Quando comparamos os resultados do presente trabalho utilizando folículo pré-antral com os de trabalhos anteriores utilizando ovócitos suínos de folículos antrais, percebemos que os ovócitos são muito mais sensíveis à baixa temperatura. Essa sensibilidade é observada a partir de 15°C onde a sobrevivência dos ovócitos já está comprometida (Didion *et al.*, 1990). A criopreservação de ovócitos suínos de folículos antrais apresenta resultados bastante limitados. A presença da grande quantidade de lipídios citoplasmáticos foi considerada um obstáculo ao congelamento de ovócitos (Nagashima *et al.*, 1994). Para contornar esse problema foi realizada a delipidação, porém, observou-se que ela compromete o desenvolvimento embrionário posterior (Nagashima *et al.*, 1994). A vitrificação também foi utilizada como uma alternativa para diminuir os danos causados pelo frio e a formação de cristais de gelo, entretanto, também foram obtidos resultados insatisfatórios em ovócitos suínos (Gupta *et al.*, 2007; Somfai *et al.*, 2007). A utilização de folículo pré-antral suíno devido a sua baixa quantidade de lipídio e a maior resistência ao frio como mostrada nesse trabalho seria, portanto, uma alternativa para a preservação de gametas femininos nessa espécie.

Apesar da análise morfológica ser muito útil para se avaliar a extensão do dano das células submetidas a protocolos de criopreservação (Matos *et al.* 2007), ela não está sempre correlacionada com a viabilidade ou a competência no desenvolvimento de folículos (Van den Hurk *et al.* 1998). Dessa maneira, outras formas de avaliação dos danos causados pelo frio devem ser feitas utilizando outras ferramentas (Cappachietti *et al.* 2004), como testes de viabilidade ou cultivo de longo período para acompanhar o desenvolvimento e crescimento dos folículos.

## **8. CONCLUSÕES**

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a criopreservação de folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano suíno obteve melhores resultados quando DMSO ou EG foram utilizados como crioprotetor, quando comparados ao PROH ou GLY.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Agca Y** 2000 Cryopreservation of Oocyte and ovarian Tissue. *Ilar Journal*, **41**, 207-220.

**Amorim CA, Gonçalves PBD & Figueiredo JR** 2003 Cryopreservation of oocytes from pré-antral follicles. *Human Reproduction Update*, **9**, 1-11.

**Amorim CA, Rondina D, Lucci CML, Gonçalves PBG, Figueiredo JR & Giorgetti A** 2006 Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. *Fertility and Sterility* **85**, 1077-1081.

**Amorim CA, Rondina D, Lucci CM, Giorgetti A, Figueiredo JR & Gonçalves PBD** 2007 Cryopreservation of sheep primordial follicles. *Reproduction Domestic Animals* **44**, 53-57.

**Braw-Tal R & Yossefi S** 1997 Studies in vivo and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal Reproduction Fertility* **109**, 165–171

**Cabodevila J & Teruel M** 2001 Criopreservación de embriones bovinos. In: Palma, G. A.; *Bioteconología de la Reproducción*. Argentina: *Intituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 149- 167.

**Cain L, Chatterjee S & Collins TJ**.1995 *In vitro* folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology* **136**, 3369-3377.

**Cappachietti G, Cecconi S, Gioia L & Turriani M** 2004 Effect of Cryoprotectant Agents on the Potential Development of Sheep Preantral Follicles. *Veterinary Research Communications* **28**, 173–176.

**Carroll J, Whitingham DG, Wood MJ, Telfer E & Gosden RG** 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal Reproduction Fertility* **90**, 321-327.

**Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, Bao SN & Figueiredo JR** 2001 Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Animal Reproduction Science*, **66**, 195-208.

**Cecconi S, Capacchietti G, Russo V, Berardinelli P, Mattioli M & Barboni B** 2004 *In vitro* Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian tissue. *Biology of Reproduction* **70**, 12–17.

**Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Martins FS, Matos MHT, Melo MAP, Bao SN, Rodrigues APR, Silva JRV & Figueiredo JR** 2008 Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science* **108**, 309-318.

**Coss RA, Dewey WC & Bamburg JR** 1979 Effects of Hyperthermia (41,5) on Chinese Hamster Ovary Cells Analyzed in Mitosis. *Cancer Research* **39**, 1911-1918.

**Critser JK & Gunasena KT** 1997 Utility of Viable Tissue ex vivo – Banking of Reproductive Cells and tissues. In: Karow AM, Critser JK, Reproductive tissue banking, Scientific principles. *California: Academia press*, 1 –21.

**Curry MR** 2000 Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Journals of Reproduction and fertility*, **5**, 46-52.

**Demirci B, Lornage J, Salle B, Poirel MT, Guerin JF & Franck M** 2003 The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Theriogenology*, **60**, 999-1010.

**Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE & Markert CL** 1990 Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Journal of animal science* **68**, 2803-2810.

**Ding S, Li J & Jin C** 2003 A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. *World Journal Gastroenterology* **9**, 584-589.

**Doyle A, Morris CB & Armitage WJ** 1988 Cryopreservation of animal cells. *Adv Biotechnol Processes* **7**, 1-17.

**England GCW**, 1993 Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal Reproduction Fertility* **47**, 243-255.

**Erickson GF** 1986 Analysis of follicle development and ovum maturation *Seminars in reproductive endocrinology*, 233-254.

**Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T & Boland M** 1997 Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy Embryology* **195**, 327-336.

**Fields MJ, Barros CM, Watkins WB & Fields PA** 1992 Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. *Biology of Reproduction* **46**, 535-545.

**Figueiredo JR, Rodrigues APR & Amorim, CA**, 2002 Manipulação de oócito incluso em folículo ovariano pré-antral. In: Gonçalves PB, Figueiredo JR, Freitas VJF, Biotécnicas aplicadas a reprodução animal. *São Paulo: Varela*, 227-260.

**Gosden RG, Baird DT, Wade JC & Webb R** 1994 Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Human Reproduction* **9**, 597-603.

**Gosden RG** 2000 Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* **163**, 125-129.

**Gupta, MK, Uhm SJ & Lee HT** 2007 Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification *Theriogenology* **67**, 238-248.

**Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I & Webb R** 2000 Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod* **62**, 1322-1328.

**Hafez, ESS**, 2004 Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In:\_\_\_\_\_. Reprodução Animal. *Barueri, SP: Manole*, 435 – 446.

**Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M & Kato S** 1994 *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of reproduction and fertility* **100**, 333-339.

**Hyttel P, Fair T, Callensen H & Greve T** 1997 Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **47**, 23-32

**Isachenko V, Isachenko E, Michelmann HW, Alabart JL, Vazquez I, Bezugly N & Nawroth F** 2001 Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. *Anatomy Histology Embriology* **30**, 333-338.

**Jewgenow K, Penfold LM, Meyer HHD & Wildt DE** 1998 Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility* , **112**, 39-47.

**Kaasik A, Safiulina D, Choubey V, Kuum M, Zharkovsky A & Veksler V** 2007 Mitochondrial Swelling Impairs the Transport of Organelles in Cerebellar Granule Neurons. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 32821–32826.

**Kacinskis MA, Lucci CM, Luque MCA & Bão SN** 2005 Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Animal Reproduction Science* **87**, 45-57.

**Kalashnikova MM** 1979 Physiological and reparative regeneration of the mitochondria. *Biulleten' eksperimental'noĭ biologii i meditsiny* **88** 84-87.

**Kwiatkowska M**, 1981 Changes in ultrastructure of mitochondria during the cell cycle. *Folia histochemica et cytochemica* **19**, 99-105.

**Lee D, Ouhibi N & Battaglia D** 2001 Cryopreservation of ovarian Tissue: Banking Reproductive Potential for the future. *Current Womens health Reports*, **1**, 152-156.

**Lima AKF, Silva AR, Santos RR, Sales DM, Evangelista AF, Figueiredo JR & Silva LDM** 2006 Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology* **66**, 1664–1666.

**Liu RH, Sun QY, Li YH, Jiao LH & Wang WH** 2003 Maturation of porcine oocytes after cooling at the germinal vesicle stage. *Zygote* **11**, 299–305.

**Lucci CM, Amorim CA, Báo SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR & Silva JR, Gonçalves PBD** 1999 Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, **56**, 39-49.

**Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LHR, Rumpf R & Báo SN** 2004a Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* **61**, 1101-1114.

**Lucci CM, Kacinskis MA, Rumpf R & Báo SN** 2004b Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, **61**, 461-472.

**Lucci CM, Schreier LL, Machado GM, Amorim CA, Báo SN & Dobrinsky JR** 2007 Effects of storing pig ovaries at 4 or 20 °C for different periods of time on the

morphology and viability of pre-antral follicles. *Reproduction domestical animal* **42**, 76–82.

**Mc Evoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM & Speake BK** 2000 Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility* **118**, 163-170.

**Matos MHT, Silva JRV, Rodrigues APR & Figueiredo JR** 2007 Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **31**, 433-442.

**Matos MHT, Andrade ER, Lucci CM, Bão SN, Silva JRV, Santos RR, Ferreira MAL, Costa SHF, Celetino JJH & Figueiredo JR** 2004 Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology* **62**, 65-80.

**Mazur P**, 1984 Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Physiological Society* **247**, 125-142.

**Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V & Gosden R** 1996 Low temperatures storage and grafting of humans ovarian tissue. *Human Reproduction* **11**, 487-491.

**Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DE, Faddy MJ & Gosden RG** 1998 Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Human Reproduction* **13**, 376–380.

**Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark R & Nottle MB** 1994 Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology Reproduction* **51**, 618–622.



**Newton H, Picton H & Gosden RG** 1999 *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *Journal Reproduction Fertility* **115**, 141-150.

**Nuttinck F, Mermillod PM & Dessy F** 1993 Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology* **39**, 811-821.

**Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O & Gosden RG** 1988 Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertility. Esteril* **69**, 1-7.

**Paynter SJ, Cooper A, Fuller BJ & Shaw RW** 1999 Cryopreservation of bovine ovarian tissue : structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. *Cryobiology* **38**, 301-309.

**Pegg DE** 2002 The history and Principles of Criopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine* **20**, 5-13.

**Picton HM, Kim SS & Gosden RG** 2000 Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *British Medical Bulletin* **56**, 603-615.

**Reichenbach H, Oliveira MAL, Lima PF, Filho ASS & Andrade JC** 2002 Transferência e criopreservação de embrião bovino. In: Gonçalves PB, Figueiredo JR, Freitas, VJF. *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal, São Paulo: Varela*, 127-178.

**Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM & Figueiredo JR** 2004 Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science* **84**, 211–227

**Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Santos RR, Lucci CM, Nunes JF & Figueiredo JR** 2005 Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Ruminantes Research*, **56**, 103-111.

**Safiulina D, Veksler V, Zharkovsky A & Kaasik A** 2006 Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *Journal of cellular physiology* **206**, 347-353.

**Santos RM, Barreta MH, Frajblat M, Cucco DC, Mezzalira JC, Bunn S, Cruz FB, Vieira AD & Mezzalira A** 2006a Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciência Rural* **36**, 1501-1506.

**Santos RR, Rodrigues APR, Costa SHF, Silva JRV, Matos MHT, Lucci CM, Bão SN, Van den Hurck R & Figueiredo JR** 2006b Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles *Animal Reproduction Science* **91**, 249–263.

**Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Haefen TV & Hurk RVD** 2006c Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cellular Tissue Research* **325**, 523–531.

**Santos RR** 2007 Cryopreservation of caprine ovarian tissue: Recovery of gonadal function after auto transplantation. 144f., Thesis (Doctorat) – Utrecht University, uthecht , The Netherlands.

**Santos RR, Celestino JJH, Lopes CAP, Melo MAP & Rodrigues JR** 2008 Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **32**, 9-15.

**Saumande J** 1981 Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec Méd Vét*, **157**, 29-38.

**Schmidt KLT, Ernst E, Byskov AG, Andersen AV & Andersen CY** 2003 Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation *Human Reproduction* **18**, 2654-2659.

**Shaw JM, Oranratnachai A & Trounson AO.** 2000 Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* **53**, 59-72.

**Silva JRV, Bao SN, Lucci CM, Carvalho FCA, Andrade ER, Ferreira MAL & Figueiredo JR** 2001 Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Animal Reproduction Science* **66**, 209–223.

**Silva, JRV, Ferreira MAL, Costa SHF, Santos RR, Carvalho FCA, Lucci CM, Bao SN & Figueiredo JR** 2002 Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminants Research* **43**,203-209.

**Sobaniec-Lotowska ME & Lebensztejn DZ** 2006 Ultrastructure of Kupffer cells and hepatocytes in the Dubin-Johnson syndrome: A case report. *World Journal of Gastroenterology* **12**, 987-989.

**Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bao SN, Costa SHF, Santos RR & Figueiredo JR** 2000 Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Theriogenology*, **54**, 809-822.

**Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T & Kikushi K** 2007 Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* **55**, 115–126.

**Sztein J, Sweet H, Farley J & Mobraaten L** 1998 Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: New approach in gamete banking. *Biology of reproduction* **58**, 1071-1074.

**Tassel R & Kennedy JP** 1980 Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb-fine structure and histochemistry. *Australian Journal of Biological Sciences* **33**, 675–87.

**Vanhoutte L, Cortvrindt R, Nogueira D & Smitz J** 2004 effects of chilling on Structural aspects of early preantral mouse follicles. *Biology of reproduction* **70**, 1041-1048.

**Vajta G** 2000 Criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* *Arquivos da Faculdade de veterinária UFRGS* **28**, 85-97.

**Van den Hurk R, Bevers MM & Beckers JF**1997 *In vivo* and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* **47**, 73-82.

**Van den Hurk R & Santos R** 2009 Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. *Animal Reproduction* **6**, 72-95.

**Van den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T & Ralph JH** 1998 Schotanus, K.; Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reproduction Update* **4**, 833-841.

**Vega AC & Wilde OR** 1991 Fundamentos biológicos de la criopreservacion. *Revista Argentina de Producción Animal* **11**, 151-165.

**Woods EJ, Benson JD, Agca Y & Critser JK** 2004 Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* **48**, 146-156.