

CONGELAÇÃO LENTA DE TECIDO OVARIANO OVINO UTILIZANDO 1,2-PROPANODIOL (PROH) SEGUIDA DE INCUBAÇÃO DE CURTA DURAÇÃO

(Sheep ovarian tissue slow freezing using 1,2-propanediol (PROH) as cryoprotectant followed by short-term *in vitro* culture)

Raphael Fernando Braga GONÇALVES^{1*}, Franciele Osmarini LUNARDI¹, Anelise Maria Costa Vasconcelos ALVES¹, Valdevane Rocha ARAÚJO¹, José Ricardo de FIGUEIREDO¹, Cláudio Cabral CAMPELLO¹, Ana Paula Ribeiro RODRIGUES¹

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

RESUMO

A criopreservação de tecido ovariano tem como principal objetivo, a manutenção deste tecido para sua posterior utilização, garantindo a preservação do material biológico de fêmeas de animais de alto valor genético. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos definir protocolo ótimo para criopreservação de tecido ovariano ovino utilizando PROH como agente crioprotetor e avaliar a resposta do tecido criopreservado incubado *in vitro* por curtos períodos. Para tanto, o tecido ovariano foi exposto (5, 10 ou 20 minutos) e/ou congelado utilizando PROH em duas diferentes concentrações (1,0 ou 1,5M). Em seguida, após a definição do protocolo mais adequado, realizou-se a incubação deste tecido por 2 ou 4 horas. Em ambas as etapas, o tecido ovariano foi avaliado por Histologia Clássica ou viabilidade por inclusão em Azul de Tripán. Verificou-se que a exposição por 5 minutos seguida de criopreservação do tecido em solução de 1,5 M de PROH garantiu percentual de folículos viáveis significativamente semelhantes ao tecido fresco ($P < 0,05$). Em seguida, o tecido congelado nessas condições foi cultivado por 2 ou 4 horas. Tal procedimento demonstrou que, com o decorrer do cultivo, os folículos sofrem perda gradual de sua normalidade morfológica em comparação ao tecido fresco, o que foi confirmado pela análise de viabilidade ($P < 0,05$). Assim, o presente trabalho conclui que é possível congelar eficientemente o tecido ovariano ovino utilizando 1,5 M de PROH e exposição por 5 minutos e, que ocorre uma redução gradual na qualidade folicular do tecido criopreservado e submetido a curtos períodos de incubação.

Palavras-chave: Criopreservação, Cultivo *in vitro*, PROH, Tecido ovariano, Ovinos

ABSTRACT

Ovarian tissue cryopreservation aims to maintain the tissue for later use, ensuring the preservation of biologic material from women and high genetic valuable animals. In this context, this work aimed to define an optimum sheep ovarian tissue cryopreservation protocol using PROH as cryoprotectant and to evaluate the responsiveness of cryopreserved tissue to a short-term *in vitro* culture. Then, the ovarian tissue was exposed (5, 10 or 30 minutes) and/or cryopreserved using PROH (1,0 or 1,5M). After the definition of the most appropriate protocol, the tissue was cultured

* Endereço para correspondência:

Endereço: Rua Central, nº 322, Cajazeiras, Fortaleza-Ce, Telefones: (85) 9199-2348

raphaelfbg@gmail.com

for 2 or 4 hours. In both stages, ovarian tissue was evaluated by Classic Histology and viability using Trypan blue staining. We observed that the exposure for 5 minutes followed by cryopreservation in 1,5M PROH maintained similar percentages of viable follicles than fresh tissue ($P<0,05$). Thereafter, cryopreserved tissue was cultured for 2 or 4 hours. This procedure showed that, as *in vitro* culture goes on, follicles suffer gradual loss in their morphology, what was confirmed by viability analysis ($P<0,05$). Thus, this work concludes that is possible to properly cryopreserve sheep ovarian tissue using 1,5M PROH and 5 minutes exposure. Moreover, it occurs a gradual quality reduction of follicles obtained from short-term cultured tissue after cryopreservation procedure.

KEYWORDS: CRYOPRESERVATION, IN VITRO CULTURE, PROH, OVARIAN TISSUE, OVINE

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de maximizar o potencial reprodutivo de machos e fêmeas, empregando técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial, fecundação *in vitro* (FIV), a transferência de embriões e, em caráter mais experimental, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos (MOIFOPA). A MOIFOPA consiste em retirar os folículos ovarianos pré-antrais do ambiente fisiológico da fêmea, com a finalidade de cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Essa técnica também envolve a criopreservação dos folículos ovarianos, objetivando assim conservar e difundir o material genético de fêmeas de alto valor zootécnico ou econômico que possam vir a óbito inesperadamente em plena fase reprodutiva. Além disso, pode ainda, restaurar a capacidade reprodutiva de mulheres jovens submetidas à quimio/radioterapia (CHOI *et al.*, 2008).

A criopreservação do tecido ovariano pode ser realizada tanto pelo método de congelamento lento ou convencional, como pelo método de vitrificação. Especificamente, no que concerne à técnica de congelamento lento, esta tem sido amplamente aplicada, garantindo a preservação eficiente de folículos pré-antrais de

fêmeas suínas (BORGES *et al.*, 2009), caprinas (RODRIGUES *et al.*, 2004a,b), ovinas (SANTOS *et al.*, 2006a,b), bovinas (CELESTINO *et al.*, 2008) e humanas (ISACHENKO *et al.*, 2009). No entanto, a congelamento lento pode levar a danos letais e irreversíveis às células, causados pelos fenômenos da formação de cristais de gelo intracelulares e/ou efeito solução e choque osmótico (STACHEKI & COHEN, 2004).

Com a finalidade de reduzir as injúrias causadas por esses fenômenos, muitos estudos têm sido realizados para aperfeiçoar os protocolos de criopreservação de tecido ovariano. Nesses estudos, aspectos como a concentração e tempo de exposição para a perfusão de crioprotetores (AMORIM, *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004 a,b; SANTOS *et al.*, 2006, 2007; CELESTINO *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2008; LUZ *et al.*, 2009) têm sido analisados no tocante à sua influência sobre a morfologia e viabilidade de folículos ovarianos após a descongelamento ou aquecimento do tecido ovariano.

A escolha do agente crioprotetor intracelular, bem como de sua concentração e tempo de exposição, consiste em ponto inicial para desenvolvimento de um protocolo eficaz para criopreservação de tecidos. Dentre os crioprotetores intracelulares, o 1,2-propanodiol (PROH) é considerado de baixa toxicidade, tendo

capacidade de proteger a célula contra a desidratação que ocorre durante a congelação (WUSTEMAN *et al.*, 2008) e sendo, portanto, um dos agentes crioprotetores mais utilizados para criopreservação de oócitos humanos (KÜÇÜK & BASER, 2007). Embora extensamente estudado em diversas espécies, ainda não se estabeleceu um protocolo definido para sua utilização em ovinos, envolvendo a concentração e o tempo de exposição mais adequados para a criopreservação do tecido ovariano ovino.

Dentre as alterações observadas em folículos pré-antrais isolados logo após a descongelação ou aquecimento do tecido ovariano, destacam-se a baixa densidade folicular na suspensão e a visualização de folículos extremamente retraídos. Neste contexto, Paynter *et al.* (1999) testaram diferentes tempos de cultivo após a descongelação e verificaram uma melhora no percentual de folículos normais obtidos quando o tecido era incubado por até quatro horas. Posteriormente, Borges *et al.* (2009), após realizarem a criopreservação de tecido ovariano suíno, submeteram este material a um breve cultivo de 120 minutos após a descongelação, verificando, após o procedimento, melhores percentuais de folículos viáveis. No entanto, ainda não existem estudos abordando a resposta do tecido ovariano ovino criopreservado a este tipo de cultivo *in vitro* de curta duração, o que poderia servir também como um indicativo do sucesso e adequação deste protocolo de cultivo à realidade do tecido criopreservado.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de definir um protocolo eficiente para a criopreservação do tecido ovariano ovino usando o PROH como agente crioprotetor e, avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais após congelação seguida de cultivo *in vitro* de curta duração.

2. METODOLOGIA

2.1. Experimento I: Determinação do tempo de exposição e concentração do PROH para a congelação de folículos pré-antrais ovinos

2.1.1. Origem, coleta e transporte dos ovários

Ovários (n=10) de ovelhas sem raça definida (SRD) foram obtidos em abatedouros locais. Imediatamente após a coleta, os ovários foram lavados uma vez em álcool 70%, seguida por duas lavagens em Meio Essencial Mínimo (MEM) tamponado com HEPES (Sigma). Após a lavagem, os ovários foram transportados ao laboratório em tubos contendo 15 mL de MEM, em recipientes térmicos à temperatura de 4 °C, por até 4 h, como definido previamente em experimento realizado pela nossa equipe (Chaves *et al.* 2008).

2.1.2. Exposição e congelação lenta do tecido ovariano na presença de PROH

Nesta etapa do estudo foram utilizados 5 (cinco) pares de ovários. Um total de 13 fragmentos (3x3x1 mm) foram obtidos a partir de cada par ovariano, sendo um destes imediatamente fixado em Carnoy por 12 horas (controle fresco). Os demais fragmentos (n=12) foram então colocados em macrotubos (MiniTube) de 2mL e expostos a um volume de 1,8 mL de solução composta por MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), constituindo o MEM+, adicionado de PROH (1,2-propanodiol; 76 kDa) nas concentrações de 1,0 ou 1,5 M. Os fragmentos ovarianos foram então mantidos a 20°C por 5, 10 ou 20 minutos a fim de se avaliar possíveis efeitos tóxicos da solução de criopreservação sobre a morfologia folicular. Após o término do período de exposição, um fragmento de cada tratamento (condição de exposição ao PROH) foi submetido à remoção do crioprotetor, enquanto o outro foi submetido à congelação lenta.

Os fragmentos destinados à congelação foram transferidos para um freezer biológico

programável (Freeze control, Cryobiologic Pty. Ltd., Warverley, Austrália), previamente estabilizado a uma temperatura de 20°C, e resfriados a uma taxa de 2 °C/min até -7 °C. Nesta temperatura, a formação de cristais de gelo (*seeding*) foi induzida utilizando-se uma pinça pré-resfriada em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram resfriadas a uma taxa de 0,3°C/min até -40°C e depois a 10°C/min até atingir -70°C quando então, os macrotubos foram removidos do freezer e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido (-196°C).

2.1.3. Descongelamento e remoção do agente crioprotetor

Após um período mínimo de uma semana de armazenamento, os macrotubos contendo os fragmentos de ovário foram retirados do nitrogênio líquido e expostos à temperatura ambiente por 1 min., sendo, posteriormente, imersos em banho-maria a 37°C até a completa descongelamento da solução crioprotetora. Em seguida, foi realizada a remoção do crioprotetor. Para tanto, todos os fragmentos foram retirados de seus respectivos macrotubos e lavados em 3 soluções compostas por MEM+ contendo concentrações decrescentes (0,5, 0,25 e 0,0 M) de Sacarose (Sigma) por 5 minutos cada.

Após a remoção do agente crioprotetor, os fragmentos de todos os grupos foram destinados para à análise por histologia clássica, como será descrito a seguir.

2.1.4. Histologia clássica (HC)

Após a fixação por 12 horas em Carnoy, os fragmentos ovarianos foram desidratados em série gradualmente mais concentrada de etanol, diafanizados em xilol, e incluídos em blocos de parafina para confecção de secções seriadas com espessura de 7 µm. Os cortes obtidos foram montados em lâminas e corados pelo método do Ácido Periódico de Schiff (PAS) – Hematoxilina. Para análise das lâminas, utilizou-se um microscópio óptico (Nikon), e contados 150

folículos pré-antrais por tratamento. Quanto ao aspecto morfológico os folículos, foram avaliados com base na integridade do oócito, das células da granulosa e da membrana basal. Neste sentido, os folículos foram classificados como morfológicamente normais (aqueles contendo oócito e células da granulosa intactos) e degenerados (folículos com retração citoplasmática e/ou núcleo do oócito picnótico, podendo ainda apresentar ou não desorganização das células da granulosa, bem como destacamento da membrana basal). Para evitar a contagem de um mesmo folículo foram analisados somente aqueles folículos que apresentavam o núcleo do oócito visível na secção observada.

Os tratamentos que apresentaram maiores percentuais de folículos pré-antrais morfológicamente normais foram repetidos e, a análise da viabilidade folicular foi realizada.

2.1.5 Viabilidade folicular por coloração com Azul de Tripán (AT)

Para esta análise foram utilizados 5 (cinco) pares de ovários. Cada par ovariano foi fragmentado em 20 porções de tamanhos (3x3x1 mm) aproximadamente iguais, dos quais 5 foram destinadas ao isolamento dos folículos não criopreservados (controle fresco). Os demais fragmentos foram submetidos à congelamento lenta após exposição por 5 (n=5), 10 (n=5) ou 20 (n=5) minutos em solução contendo 1,5M de PROH. Após um período mínimo de 7 dias de armazenamento, os fragmentos foram destinados à descongelamento, remoção do crioprotetor e finalmente, isolamento folicular para a análise da viabilidade após o procedimento de congelamento lenta. Para a análise de viabilidade, todos os fragmentos oriundos das cinco repetições em cada tratamento foram colocados em um *pool* e submetidos ao isolamento folicular utilizando o procedimento mecânico descrito previamente para FOPA ovinos (AMORIM *et al.*,

2000). De cada *pool* de tecido ovariano, os folículos foram isolados com o auxílio de um tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering CO, Gomshal, Surrey, England), regulado para a realização de cortes seriados a intervalos 87,5 μm . Em seguida, a suspensão obtida foi transferida para tubos de 50 mL, contendo 2mL de MEM-HEPES adicionado de 3mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), e submetida à dissociação mecânica com o auxílio de pipetas Pasteur de 1600 e 600 μm de diâmetro, nessa ordem. A suspensão resultante contendo os folículos pré-antrais isolados em cada *pool* foi então filtrada em malhas de nylon de 500 e 100 μm . Os FOPA isolados foram analisados imediatamente após o término do procedimento de isolamento. Para análise utilizando o corante vital AT, cada 100 μl de meio contendo FOPA foi adicionado de 5 μl do corante, diluído a 0,4% os folículos classificados em viáveis ou não-viáveis quando não corados ou corados em azul, respectivamente.

2.2. Experimento II: Avaliação folicular após congelação, seguida de curto período de incubação

2.2.1. Protocolo experimental

Para este experimento, a melhor concentração de PROH, associada ao melhor tempo de exposição definido no experimento I, foi empregada como protocolo de congelação lenta do tecido ovariano ovino. Desta forma, foram utilizados 5 (cinco) pares de ovários obtidos em abatedouro local e transportados ao laboratório como descrito previamente. De cada par ovariano foram obtidos 20 fragmentos (3x3x1 mm), dos quais 2 (dois) foram fixados imediatamente em Carnoy para análise por HC (controle fresco - morfologia) e 3 (três) foram destinados ao isolamento folicular e análise de viabilidade por AT (controle fresco - viabilidade). Os demais foram divididos em três grupos: controle criopreservado (tecido congelado e folículos

analisados imediatamente após a descongelação e remoção do crioprotetor); incubação por 2 (INC 2) ou 4 horas (INC 4), correspondendo, respectivamente, ao tecido congelado/descongelado seguido por incubação em estufa por um período de 2 horas e 4 horas antes da avaliação morfológica e de viabilidade.

2.2.2. Incubação do tecido ovariano ovino após a criopreservação

Após a descongelação e remoção do crioprotetor, os fragmentos ovarianos foram então transferidos para 1 ml de meio de cultivo em placas de 24 poços, sendo um fragmento por poço, e mantidos em estufa a 38,5 °C em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar durante duas (BORGES *et al.*, 2009) ou quatro (PAYNTER *et al.*, 1999) horas. O meio de cultivo utilizado foi o meio controle normalmente empregado para o cultivo de folículos pré-antrais em estudos anteriores (ROSSETTO *et al.*, 2009), sendo composto por α -MEM (pH 7.2 - 7.4) adicionado de 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), ITS (10 $\mu\text{g/mL}$ de insulina, 5,5 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina e 5 ng/mL de selênio), 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico, 2mM de glutamina e 2mM de hipoxantina.

2.3. Análise estatística

Os dados relativos ao percentual de folículos morfológicamente normais avaliados por HC em ambos os experimentos foram submetidos inicialmente aos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Bartlett* para confirmar a distribuição normal e homocedasticidade dos dados, respectivamente. Para o primeiro experimento foi realizada ANOVA utilizando procedimento GLM do SAS (2002) seguido de teste *t* de *Student* para identificar diferenças entre os grupos testados. No segundo experimento após ANOVA, as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste SNK. No tocante à análise de viabilidade, em ambos os experimentos foi utilizado teste de Qui-Quadrado

para avaliar a dispersão das frequências. Os dados referentes à HC foram expressos como percentual médio de folículos morfologicamente normais \pm DP, enquanto os dados de viabilidade por AT foram expressos como percentual de folículos viáveis dentro de cada grupo testado, com os resultados considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento I: Determinação do tempo de exposição e concentração do PROH para a congelação de folículos pré-antrais ovinos

3.1.1. Morfologia folicular

Um total de 1.950 folículos foram analisados após exposição e/ou congelação lenta dos fragmentos de tecido ovariano ovino (150 folículos por tratamento). Com base na análise morfológica, pôde-se verificar (Tab. 1) que todos os grupos testados apresentaram percentuais de folículos pré-antrais morfologicamente normais significativamente inferiores ao controle (88,00%), com exceção dos fragmentos somente expostos a 1,5 M de PROH por 5 min e a 1,0 M por 10 min. Quando comparado os diferentes

tempos de exposição (5, 10 ou 20 min) entre si dentro de cada concentração testada (1,0 ou 1,5 M) e cada procedimento aplicado (exposição e/ou congelação), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Ao comparar as diferentes concentrações, dentro de cada tempo de exposição, não houve diferença significativa quando os fragmentos foram somente expostos ao PROH. Entretanto, quando foi realizada a congelação lenta, pôde-se verificar que, em todos os tempos de exposição, a concentração de 1,0 M de PROH apresentou percentuais de folículos pré-antrais morfologicamente normais inferiores aos observados na concentração de 1,5M.

Finalmente, quando comparados os diferentes procedimentos (exposição e congelação) dentro do mesmo tempo de exposição e concentração de PROH, verificou-se que apenas o tratamento 1,5 M por 5 min foi capaz de manter o percentual de folículos morfologicamente normais após a congelação semelhante aquele encontrado nos fragmentos somente expostos ao crioprotetor. Esses achados permitiram a escolha da concentração de 1,5 M

Tabela 1. Percentual médio de folículos pré-antrais normais após exposição por 5, 10 ou 20 minutos em solução contendo 1,0 ou 1,5M de propanodiol seguida, ou não, de congelação lenta do tecido ovariano ovino.

Tratamentos	Tempo (min)		
	5	10	20
Controle	88,00 \pm 5,77		
Expo 1,0M	70,80 \pm 8,87* Aaa	77,50 \pm 9,15Aaa	77,33 \pm 5,12* Aaa
Expo 1,5M	81,75 \pm 3,50Aaa	73,50 \pm 6,03* Aaa	77,33 \pm 6,83* Aaa
Crio 1,0M	46,67 \pm 3,51* Ab β	33,25 \pm 9,43* Ab β	44,33 \pm 5,13* Ab β
Crio 1,5M	71,40 \pm 8,29* Aaa	60,50 \pm 4,59* Aa β	60,00 \pm 7,26* Aa β

* – Difere do controle ($P < 0,05$). Letras Maiúsculas: Diferença entre os tempos de cada procedimento e concentração ($P < 0,05$); letras Minúsculas: Diferença entre as concentrações dentro do mesmo procedimento ($P < 0,05$); α , β : Diferença entre exposição e congelação dentro do mesmo tempo ($P < 0,05$)

Tabela 2. Percentagem de folículos viáveis após exposição por 5, 10 ou 20 minutos e congelação lenta de tecido ovariano ovino utilizando 1,5M de propanodiol.

Tratamentos	% de folículos viáveis (não corados)
Controle	77,78 (84/108) a
Tempo 5 minutos	80,00 (24/30) a
Tempo 10 minutos	50,00 (15/30) b
Tempo 20 minutos	40,00 (12/30) b

Letras diferentes: Diferem significativamente ($P < 0,05$)

como a mais adequada para a sequência dos experimentos realizados.

3.1.2. Viabilidade por Azul de Tripán

Nesta etapa, foi avaliado um total de 198 folículos pré-antrais oriundos de tecido ovariano fresco ou congelados após exposição por 5, 10 ou 20 minutos em solução de criopreservação contendo 1,5 M de PROH. Observou-se que, no grupo controle, 77,78% dos folículos avaliados não apresentavam marcação com o AT. Percentual semelhante ($P < 0,05$) foi observado no grupo exposto por 5 minutos a 1,5M de PROH, que apresentou 80% de folículos viáveis. Tais resultados foram significativamente superiores aos demais grupos testados (Tab. 2). Este dado, em conjunto com os dados da HC, nos permitiu definir o tempo de 5 minutos como

o mais adequado para a exposição ao PROH na concentração de 1,5M.

3.2. Experimento II: Avaliação folicular após congelação, seguida de um curto período de incubação

Para a análise através da HC, foram avaliados 600 folículos, distribuídos de forma semelhante entre os quatro grupos testados (Controle fresco, controle criopreservado, INC 2 e INC 4). Com base na análise morfológica, pôde-se observar que após a criopreservação ocorreu uma redução significativa no percentual de folículos normais após o procedimento de criopreservação comparado ao grupo controle fresco (85,33%). Quando comparado o efeito de diferentes períodos de incubação sobre a morfologia de folículos ovarianos ovinos

Tabela 3. Percentagens de folículos morfológicamente normais e viáveis após criopreservação de tecido ovariano ovino incubado ou não por 2 ou 4 horas.

Tratamentos	% de folículos morfológicamente normais	% de folículos viáveis
Controle	85,33±12,62 a	74,42 (128/172) a
Controle Criopreservado	71,33±10,95 b	70,00 (21/30) ab
INC 2	64,67±6,91 bc	46,67 (14/30) b
INC 4	51,33±9,01 c	46,67 (14/30) b

Letras diferentes: resultados diferem significativamente dentro da mesma coluna ($P < 0,05$)

congelados, observou-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle criopreservado (71,37%) e o grupo incubado por 2 horas (INC 2; 64,67%). No entanto, com a progressão do período de incubação para 4 horas, verificou-se uma redução significativa no percentual de folículos morfologicamente normais (INC 4; 51,33%) em comparação com o grupo controle criopreservado (Tab. 3).

Para avaliação da viabilidade folicular foram analisados um total de 232 folículos (frescos ou congelados seguidos, ou não, de incubação por 2 ou 4 horas). Corroborando com os resultados obtidos na primeira etapa, a criopreservação não reduziu significativamente o percentual de folículos viáveis em comparação ao controle (70,0%). No entanto, verificou-se que, tanto no grupo INC 2 quanto no grupo INC

4, o percentual de folículos viáveis caiu drasticamente em relação ao controle, diferindo significativamente deste (46,67% em ambos os grupos) (Tab. 3).

Finalmente, vale ressaltar que em todos os grupos testados foi possível encontrar folículos bem caracterizados tanto na análise morfológica quanto na análise de viabilidade, como pode ser observado nas Fig. 1 a 3 a seguir.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisados os efeitos de diferentes tempos de exposição e concentrações de PROH e de curtos períodos de incubação sobre a morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais ovinos.

Estudos realizados anteriormente mostraram que a concentração de 1,5 M PROH

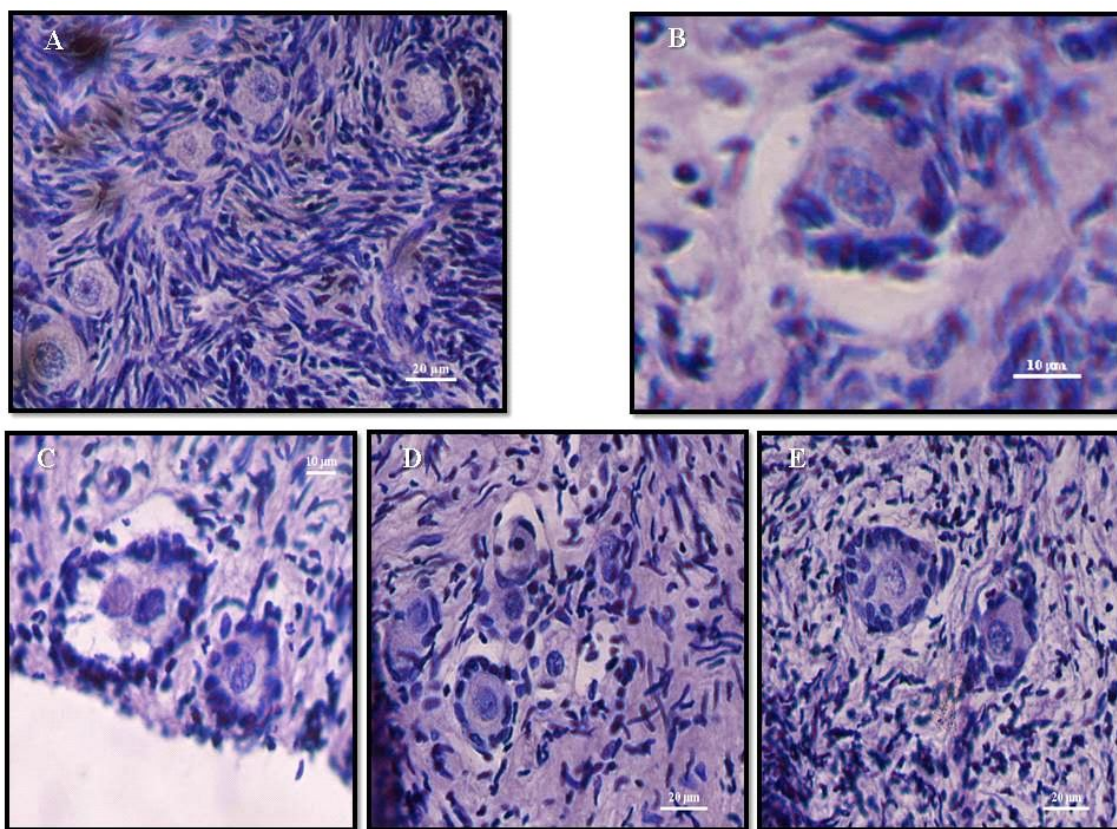


Figura 1. Secções histológicas de tecido ovariano ovino. A e B evidenciam, respectivamente, folículos pré-antrais normais e degenerados do grupo controle fresco; C, D e E apresentam, respectivamente, folículos normais e degenerados dos grupos controle criopreservado, INC 2 e INC 4.

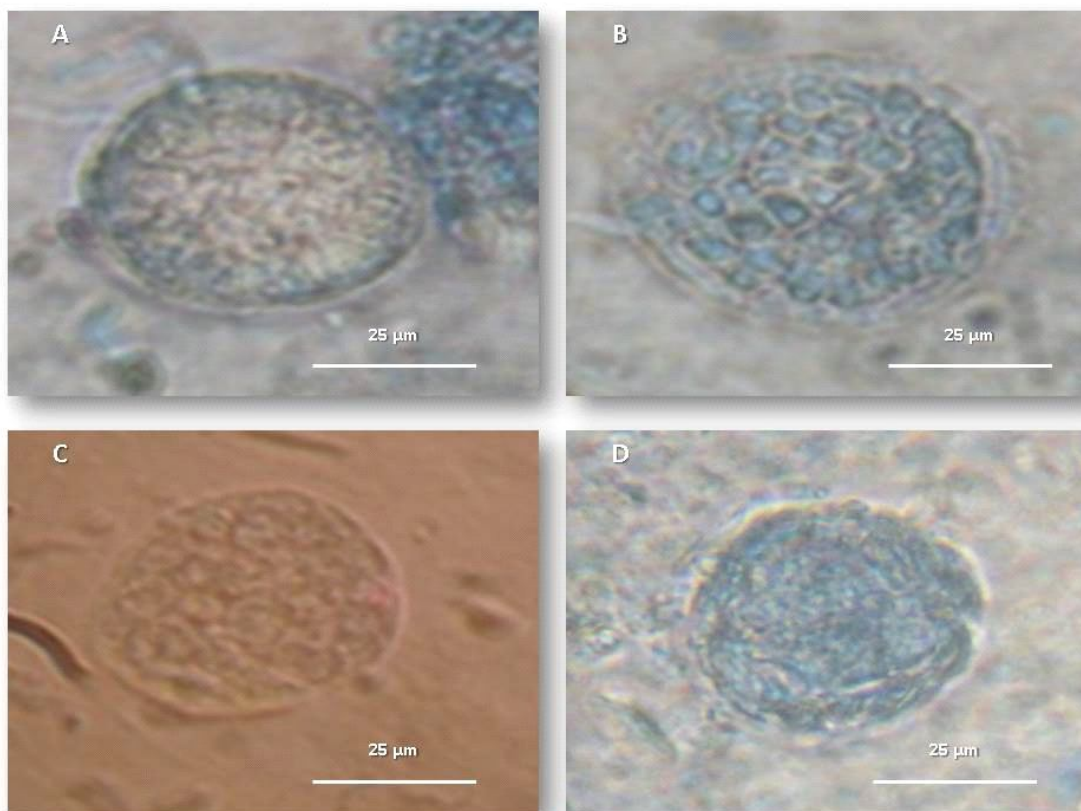


Figura 2. Fotomicrografia de folículos pré-antrais marcados ou não por Azul de Tripán nos grupos controle fresco (A e B) e controle criopreservado (C e D). Estruturas não marcadas (imagens à esquerda) e marcadas (Imagens à direita) representam, respectivamente, folículos viáveis e não-viáveis. Imagens obtidas em microscópio invertido, com aumento de 160x

apresentou melhores resultados para a criopreservação de tecido ovariano de caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004a,b) e ovinos (SANTOS *et al.*, 2006a) em relação à 3,0 M. Além disso, após utilização de diferentes crioprotetores para congelação de tecido ovariano bovino, o PROH à 1,5 M por 20 min mostrou-se eficiente para preservação das células somáticas e reprodutivas (LUCCI *et al.*, 2004). HOVATTA *et al.* (1996) demonstraram também que a criopreservação de tecido ovariano humano com 1,5 M de PROH acrescido de 0,1 M de sacarose por 10 min, não apresentou diferenças morfológicas em relação ao controle, não sendo observada necrose após esse procedimento. Desta forma, para melhorar o protocolo de criopreservação no tecido ovariano ovino, foram testadas as concentrações de 1,5 M, que se

destacou em diversos trabalhos, e uma concentração mais baixa, no caso 1,0 M. Como curtos períodos de exposição (10 e 20 min) foram capazes de garantir bons resultados em estudos anteriores com outras espécies, realizou-se, portanto, a exposição à solução durante 5, 10 ou 20 minutos, no intuito de verificar se menores tempos de exposição são capazes de garantir a criopreservação adequada dos folículos.

Na primeira etapa, verificou-se que, após a exposição do tecido ovariano ovino a diferentes concentrações de PROH (1,0 e 1,5 M) por diferentes períodos (5, 10 ou 20 minutos), todos os tratamentos mantiveram elevados percentuais de folículos morfolologicamente normais, embora apenas os tratamentos 1,5M por 5 minutos e 1,0 M por 10 minutos tenham mantido percentual semelhante ao grupo controle. Esse dado

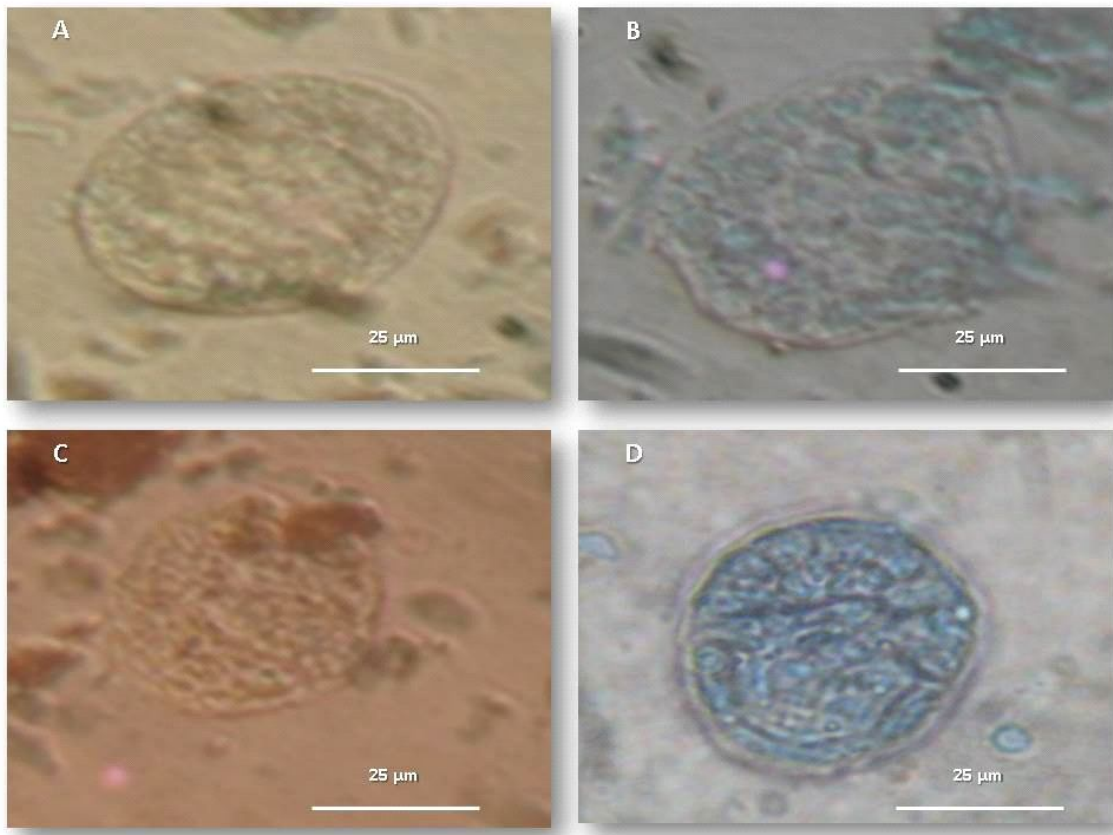


Figura 3. Fotomicrografia de folículos pré-antrais marcados ou não por Azul de Tripán nos grupos incubados por 2 (A e B) ou 4 horas (C e D). Estruturas não marcadas (imagens à esquerda) e marcadas (Imagens à direita) representam, respectivamente, folículos viáveis e não-viáveis. Imagens obtidas em microscópio invertido, com aumento de 160x

corroborar com Wusteman *et al.* (2008) que afirmaram que o PROH é um crioprotetor de baixa toxicidade. Além disso, embora a literatura indique que o tempo de exposição utilizado para o PROH seja normalmente de 20 minutos (SANTOS *et al.*, 2006a; CELESTINO *et al.*, 2008), os resultados obtidos neste trabalho indicaram percentuais de folículos morfologicamente normais elevados já em períodos mais curtos, sugerindo que o PROH não necessita de um longo tempo de exposição para penetrar de maneira satisfatória no tecido, protegendo a célula dos danos causados pelo processo de congelamento lento.

Quando apenas expostos ao PROH, os folículos pré-antrais ovinos foram capazes de manter boa configuração morfológica independente da concentração de crioprotetor

utilizada. Entretanto, após a congelamento foi possível verificar que, independente do tempo de exposição empregado, os fragmentos submetidos à concentração de 1,5 M de PROH apresentaram maiores percentuais de folículos pré-antrais morfologicamente normais em comparação à concentração de 1,0 M. LIM *et al.* (1999) constataram que quando utilizado em concentrações acima de 1,5 M, o PROH apresenta intensa ação citotóxica, sendo portanto esta a concentração ótima para evitar toxicidade celular e conferir proteção aos folículos criopreservados. O resultado obtido no presente trabalho corrobora com aqueles obtidos por diversos autores, os quais realizaram a criopreservação do tecido ovariano de diversas espécies com relativo sucesso utilizando a concentração de 1,5 M de PROH (caprinos:

RODRIGUES *et al.*, 2004a,b; ovinos: SANTOS *et al.*, 2006a; bovinos: LUCCI *et al.*, 2004; humanos: HOVATTA *et al.*, 1996; camundongos: CANDY *et al.*, 1997). Além disso, essa mesma concentração foi utilizada com sucesso na criopreservação de oócitos (GUALTIERI *et al.*, 2009; MAGLI *et al.*, 2009) e embriões (EMILIANI *et al.*, 2000) humanos.

Com o intuito de definir o tempo de exposição mais adequado à 1,5 M de PROH, concentração que, nas condições testadas no presente trabalho, conferiu melhor preservação à morfologia folicular, foi realizada a análise da viabilidade dos folículos criopreservados com esta concentração após exposição por 5, 10 ou 20 minutos, utilizando a técnica de AT. Foi observado que, no menor tempo de exposição testado, foi possível a obtenção de percentual de folículos viáveis semelhantes ao controle fresco, o que não se repetiu nos períodos mais longos de exposição. Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, Luz *et al.* (2010) e Castro *et al.* (dados não publicados) demonstraram que, para o tecido ovariano caprino, o PROH pode ser exposto ao tecido por curtos períodos sem prejuízo para a qualidade folicular após a criopreservação. Assim, além de corroborar com resultados prévios do próprio laboratório, esse dado, em conjunto com aqueles obtidos na HC, nos permitiu definir um protocolo adequado para a criopreservação de tecido ovariano ovino.

A segunda etapa deste experimento se propôs a avaliar a resposta do tecido ovariano ovino criopreservado a um curto período de cultivo *in vitro* (2 ou 4 horas). Segundo Paynter *et al.* (1999), o alvo dessa “incubação pós-descongelamento” seria apenas permitir que o tecido retornasse à sua normalidade térmica e metabólica, sem intenção de promover crescimento, possibilitando que as células expressassem morfologicamente o dano

molecular que possa ocorrer durante a criopreservação.

Verificou-se que ambos os períodos de incubação testados após a criopreservação afetaram negativamente a viabilidade e morfologia dos folículos ovarianos congelados em comparação ao controle fresco. Paralelamente, pôde-se observar que, com o decorrer do período de incubação, existe uma redução significativa no percentual de folículos morfologicamente normais. Embora a incubação tenha cumprido o papel de evidenciar possíveis alterações foliculares, a redução gradual no percentual de folículos normais mostra que, malgrado o sistema de cultivo empregado tenha vislumbrado a mimetização de condições adequadas, este não foi apropriado para tanto. Em trabalho realizado anteriormente por nossa equipe, Faustino *et al.* (2010) também não obtiveram resultados satisfatórios utilizando condições semelhantes de cultivo *in vitro* por 7 dias para tecido ovariano previamente submetido à congelamento lento, embora tenham mostrado que tais folículos não perdem a capacidade de desenvolvimento em relação ao tecido não criopreservado. Especificamente, para a espécie ovina, Bordes *et al.* (2005) obtiveram, após transplante de tecido ovariano vitrificado, o nascimento de crias saudáveis. Desta forma, embora saibamos que o tecido ovariano é plenamente capaz de recuperar sua normalidade funcional e metabólica após procedimentos de criopreservação, acreditamos que as exigências deste tecido são diferentes das necessárias para o cultivo *in vitro* de tecido fresco. No ambiente *in vivo*, essas exigências seriam desconsideráveis, uma vez que o organismo apresentaria condições adequadas ao desenvolvimento celular, mascarando os efeitos deletérios da criopreservação. Assim, podemos sugerir que é necessário um sistema de cultivo bastante particular para assegurar o

desenvolvimento do tecido ovariano criopreservado, de modo que seja possível o pleno aproveitamento do material biológico após criopreservação.

5. CONCLUSÃO

Desta forma, o presente trabalho concluiu que é possível realizar a criopreservação eficiente do tecido ovariano após exposição por 5 minutos em solução contendo 1,5 M de PROH, mantendo-se a morfologia e a viabilidade folicular. No entanto, quando este tecido é submetido a curtos períodos de cultivo *in vitro*, já se observa uma significativa redução na qualidade dos folículos presentes, evidenciando a necessidade de um protocolo de cultivo mais adequado para o material criopreservado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, C.A., LUCCI, C.M., RODRIGUES, A.P.R., CARVALHO, F.C.A., FIGUEIREDO, J.R., RONDINA, D., CECCHI, R., GIORGETTI, A., MARTINI, A., GONÇALVES, P.B.D. quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries **Theriogenology**, v. 53, p. 1251-1262, 2000

AMORIM, C.A., RONDINA, D., RODRIGUES, A.P.R., COSTA, S.H.F., GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. **Theriogenology**, v.60, p.735–742, 2003.

BORDES, A., LORNAGE, J., DEMIRCI, B., FRANCK, M., COURBIERE, B., GUERIN, J.F., SALLE, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes **Human Reproduction**, v.20, p.2745-2748, 2005.

BORGES, E.N., SILVA, R.C., FUTINO, D.O., ROCHA JÚNIOR, C.M.C., AMORIM, C.A.,

BAÓ, S.N., LUCCI, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effects of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicles oocytes **Cryobiology**, v. 59, p.195-200, 2009.

CANDY, C.J., WOOD, M.J., WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries **Journals of Reproduction and Fertility** v. 110, p 11-19, 1997.

CELESTINO, J.J.H., SANTOS, R.R., LOPES, C.A.P., MARTINS, F.S., MAOS, M.H.T., MELO, M.A.P., BÁO, S.N., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R.V., FIGUEIREDO, J.R. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 309–318, 2008.

CHAVES, R.N., MARTINS, F.S., SARAIVA, M.V.A., CELESTINO, J.J.H., LOPES, C.A.P., CORREIA, J.C., LIMA VERDE, I.B., MATOS, M.H.T., BÁO, S.N., NAME, K.P.O., CAMPELLO, C.C., SILVA, J.R.V., FIGUEIREDO, J.R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 640–647, 2008

CHOI, J.Y., LEE, B., LEE, E., YOON, B., BAE, D., CHOI, D. Cryopreservation of ovarian tissue temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. **Cryobiology**, v. 56, p. 36–42, 2008.

EMILIANI, S., VAN DEN BERGH, M., VANNIN, A.S., BIRAMANE, J., ENGLERT, Y. Comparison of ethyle glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts **Human Reproduction** v.15, n. 4, p. 905-910, 2000.

FAUSTINO, L.R., SANTOS, R.R., SILVA, C.M.G., PINTO, L.C., CELESTINO, J.J.H., CAMPELLO, C.C., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R. Goat and sheep ovarian

- tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 90-97, 2010
- FIGUEIREDO, J.R., CELESTINO J.J.H, RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.143-152, 2007.
- GUALTIERI, R., IACCARINO, M., MOLLO, V., PRISCO, M., IACCARINO, S., TALEVI, R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. **Fertility and Sterility** v. 91, No. 4, p 1023-1034, 2009.
- GUNASENA, K.T., VILLINES, P.M., CRITSER, E.S., CRITSE, J.K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 12, p. 101-106, 1997.
- HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, p. 729-734, 2005.
- ISACHENKO, V., LAPIDUS, I., ISACHENKO, E., KRIVOKHARCHENKO, A., KREIENBERG, R., WORIEDH, M., BADER, M., WEISS, J.M. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, v. 138, p. 319-327, 2009.
- JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.D.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.39-47, 1998.
- KÜÇÜK, T.; BASER, I. Cryopreservation of female fertility: A review on the basics of cryobiology for obstetrics and gynecology residents. **European Clinics in Obstetrics and Gynaecology**, v. 3, p. 97-102, 2007. Review.
- LUCCI, C., KACINSKIS, M.A., RUMPF, R., BAO, S.N. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 61, p. 461-472, 2004.
- LUZ, H.K.M. Determinação de uma solução para congelamento lento de tecido ovariano caprino: utilização de propanodiol e agentes antioxidantes. 2010, 115p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
- LUZ, V.B.; SANTOS, R.R.; PINTO, L.C. ; SOARES, A.A.X. ; CELESTINO, J.J.H. ; MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Dimethyl sulfoxide perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 1513-1515, 2009.
- MAGLI, C., LAPPI, M., FERRARETTI, A.P., CAPOTI, A., RUBERTI, A., GIANAROLI, L. Impact of oocyte cryopreservation on embryo development **Fertility and sterility**, v. 93(2) , p.510-516, 2010.
- PAYNTER, S.J., COOPER, A., FULLER, B.J., SHAW, R.W. Cryopreservation of Bovine Ovarian Tissue: Structural Normality of Follicles after Thawing and Culture in Vitro **Cryobiology**, v. 38, p. 301-309, 1999.
- PINTO, L.C., SANTOS, R.R., FAUSTINO, L.R., DA SILVA, C.M.G., LUZ, V.B., MAIA JÚNIOR, J.E., SOARES, A.A.X., CELESTINO, J.J.H., MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C.C., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R. . Quantification of Dimethyl Sulfoxide Perfusion in Sheep Ovarian Tissue: A Predictive Parameter for Follicular Survival to Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 6, p. 269-276, 2008.
- RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A., COSTA, S.H.F, MATOS, M.H.T., SANTOS, R.R., LUCCI, C.M., BÁO, S.N., OHASHI, O.M., FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 61, p. 1009-1024, 2004a.
- RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A., COSTA, S.H.F, MATOS, M.H.T., SANTOS, R.R., LUCCI, C.M., BÁO, S.N., OHASHI, O.M., FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of

- caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 211-227, 2004b.
- ROSSETTO, R., LIMA-VERDE, I.B., MATOS, M.H.T., SARAIVA, M.V.A., MARTINS, F.S., FAUSTINO, L.R., ARAÚJO, V.R., SILVA, C.M.G., NAME, K.P.O., BÁO, S.N., CAMPELLO, C.C., FIGUEIREDO, J.R., BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112–123, 2009
- SANTOS, R.R., RODRIGUES A.P.R., COSTA S.H.F., MATOS M.H.T., BAO S.N., LUCCI C.M., VAN DEN HURK R., FIGUEIREDO J.R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249-263, 2006a.
- SANTOS, R.R., THARASANIT, T., FIGUEIREDO, J.R., VAN HAEFTEN, T., VAN DEN HURK, R. Preservation of caprine perantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell Tissue Research**, v. 325, p. 523-531, 2006b.
- SANTOS, R.R., VAN DEN HURK, R., RODRIGUES, A.P.R., COSTA, S.H.F., MARTINS, F.S., MATOS, M.H.T., CELESTINO, J.J.H., FIGUEIREDO, J.R. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.53-64, 2007.
- WUSTEMAN, M., RAUEN, U., SIMMONDS, J., HUNDS, N., PEGG, D.E. Reduction of cryoprotectant toxicity in cells in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**, v. 56, p. 72–79, 2008.