

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VALESCA BARRETO LUZ**

**PERFUSÃO DO DIMETILSULFÓXIDO EM TECIDO OVARIANO  
CAPRINO**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VALESCA BARRETO LUZ**

**PERFUSÃO DO DIMETILSULFÓXIDO EM TECIDO OVARIANO  
CAPRINO**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**VALESCA BARRETO LUZ**

**PERFUSÃO DO DIMETILSULFÓXIDO EM TECIDO OVARIANO  
CAPRINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e Sanidade de pequenos ruminantes

**Orientador:** Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

**FORTALEZA-CE  
2008**

L979p Luz, Valesca Barreto  
Perfusão do dimetilsulfóxido em tecido ovariano caprino / Valesca Barreto Luz. - Fortaleza, 2008.  
53p.  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) –  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.  
1. Exposição. 2. Criopreservação. 3. Dimetilsulfóxido. 4. Tecido ovariano. 5. Caprino. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.39

PERFUSÃO DO DIMETILSULFÓXIDO EM TECIDO OVARIANO CAPRINO

VALESCA BARRETO LUZ

Aprovada em: 15/ 08/ 2008

Conceito: Satisfatório

Nota: 9,0

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Presidente da banca /Co-orientador)  
Universidade Estadual do Ceará

---

Prof. Dr. Jair Mafezoli (Examinador)  
Universidade de Fortaleza

---

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi (Examinador)  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello (Examinador)  
Universidade Estadual do Ceará

*À minha tia Marlene Barreto, minha avó Amélia  
Barreto, minha mãe Maria Barreto, minha  
querida Maria Pequena e minha família  
Shekiná,  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pelo acolhimento em seu elenco de estudantes bem como pela capacitação profissional que me proporcionou e à Universidade de Fortaleza (UNIFOR) pelo suporte técnico. Agradecimento sincero ao CNPq pelo auxílio financeiro e incentivo concedido na forma de bolsa de estudo.

Agradeço à Santíssima Trindade pelas mãos de Maria Santíssima pela graça concedida em cada ato.

À minha tia Marlene Barreto por nunca ter deixado faltar às condições para realização de todos os meus sonhos, inclusive este. À minha mãe Maria Barreto por ter me concedido o maior dom: A VIDA. À minha avó Amélia Barreto por há 101 anos ser exemplo de pessoa batalhadora e um ícone de verdadeira mulher para todos. À minha querida Maria Pequena por mover céus e terras quando se trata de ajudar nos meus estudos.

Ao Meu primo-irmão Sergio Barreto e minha cunhada Carla por partilharem comigo do pouco que possuem, e minha sobrinha linda Anny Karine tesouro precioso na minha vida. Também à minha Tia Marlete Barreto e minha prima Elma Monte por todo apoio, incentivo e crença em mim.

À minha família Comunidade Católica Shekiná pelo alimento espiritual de cada dia. Em especial à Minha mãe Roseana Almeida e minhas irmãs Luíza Regina, Taniamar Lopes, Sandra Sayonara e Mírian Oliveira por estarem sempre comigo: na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, numa perfeita comunhão onde a distância física não exerce influência.

À minha orientadora Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues pelo meu acolhimento em sua equipe, orientação e amizade, e por ser exemplo de uma mulher dinâmica e responsável.

Ao meu co-orientador, Dr. José Ricardo de Figueiredo, por sua maior virtude a de escutar. Também por ser exemplo de um homem íntegro, ético, profissional, que reúne em si inúmeras qualidades sem perder a humildade.

Aos meus co-orientadores, Dra. Regiane Rodrigues dos Santos e Dr. Jair Mafezzoli pelos valiosos ensinamentos na área de criopreservação e cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente, bem como pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

Ao Dr. Otávio Ohashi e Dr. Cláudio Cabral Campello, pela disposição em analisar este trabalho em especial ao Prof. Cláudio Cabral por sua gentileza e disponibilidade em ajudar sempre.

À grande equipe do LAMOFOPA, à Dra. Maria Helena Matos pelo excelente trabalho que vem realizando na organização do mesmo, mas em especial por seu alto-astrol e simpatia tornando o ambiente de trabalho mais leve. À professora Líliam Mara por seu companheirismo e amizade. À Juliana Jales Celestino e José Erisvaldo Maia Júnior que são pessoas maravilhosas e muito me ensinaram sobre criopreservação. Ao Dr. José Roberto Viana e aos Doutorandos Cláudio Afonso, Fabrício Souza, Anderson Almeida, Isabel Lima-Verde, Jamily Bruno, Márcia Viviane, Roberta Chaves, Janduí Nóbrega, Ana Beatriz, por todo conhecimento compartilhado e convívio. Aos mestrandos Deborah Magalhães, Valdevane Rocha, Luciana Faustino, Giovanna Quintino, Cleidson Manoel, Rafael Rosseto e Florisvaldo Ramos, por toda ajuda no trabalho diário e acima de tudo pelo carinho compartilhado. Aos ex-alunos de Iniciação Científica (IC) nas pessoas de Janaína Costa e Sarah Honório e Mônica Aline recebam a minha gratidão por toda ajuda. Aos atuais ICs Rebeca Magalhães, Laritza Lima, Priscilla Gillian, Anelise Costa, Diego Fernandes, Rafael Fernando, Marcio Breno, por sempre estarem dispostos a ajudar, em especial ao meu filho amado Alison André com o qual eu aprendo e ensino todos os dias e à minha amiga querida Gerlane Modesto. Agradeço também aos técnicos Leandro Silva, Patrícia Magalhães e ao funcionário Zandor Camelo que desde o ingresso de ambos na equipe vêm somando muitas experiências.

Ao meu irmãozinho do coração Leonardo Correia Pinto, um anjo da guarda para mim, por toda lealdade, fidelidade e bondade, sem dúvidas a melhor amizade que conquistei nessa etapa.

À minha prima Elizabeth Barbalho por me acolher em sua residência, compartilhando sua amizade, família e lar. E por todo conforto que me tem proporcionado.

Aos professores do PPGCV na pessoa do coordenador Marcos Fábio Gadelha pela capacitação profissional e pessoal que me concederam. Também a todos os funcionários do PPGCV e colegas de mestrado e/ou disciplinas o meu reconhecimento e gratidão.

Às minhas amigas Karlliely Castro, Suely Avelar, Marcela Melo, Èrica Bezerra, Darlete Matos, Iara Gonçalves, Nadja Vila Nova, Gorete Salles e demais amigades que conquistei aqui, por todos os gestos no sentido de minimizar a saudade e por terem me proporcionando momentos maravilhosos nessa cidade.

Ao meu amigo Faviano Ricelle por sua participação essencial no meu ingresso no mestrado, por todo incentivo, ajuda e recomendação, também ao professor Ricardo Toniolli por toda confiança e apoio.

Enfim, aos animais razão da minha profissão e motivação para o meu aperfeiçoamento, em especial os que participaram dessa pesquisa.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACP(s)	: Agente(s) Crioprotetor(es)
ANOVA	: Análise de Variância
BGA	: Banco de germoplasma animal
°C	: Graus Celsius
CGI	: Cristais de Gelo Intracelular
CGP	: Células Germinativas Primordiais
CLAE	: Cromatografia Líquida de Alta Performance
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
EG	: Etilenoglicol
e.g.	: <i>exempli gratia</i>
Fig.	: Figura
FBS	: Fetal Bovine Serum
FOPA	: Folículos Ovarianos Pré-Antrais
GLI	: Glicerol
h	: Horas
HC	: Histologia Clássica
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HM	: Holding Medium
HM <sup>+</sup>	: Holding Medium + 10% FBS
IC	: Iniciação Científica
LAMOFOPA	: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré- Antrais
M	: Molar
MEM	: Meio Essencial Mínimo
MEM <sup>+</sup>	: Meio Essencial Mínimo + HEPES
MET	: Microscopia Eletrônica de Transmissão
min.	: Minuto
mL	: Mililitro

mm	: Milímetro
MOIFOPA	: Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
n	: Número
Pág	: Página
PAS	: Ácido periódico de Schiff
pH	: Potencial Hidrogeniônico
PROH	: Propanodiol
P<0,05	: Probabilidade de erro menor do que 5%
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
SRD	: Sem Raça Definida
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
UNIFOR	: Universidade de Fortaleza
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling
μL	: Microlitro
μm	: Micrômetro
%	: Percentagem
~	: Aproximadamente
400x	: Aumento de 400 vezes

## LISTA DE FIGURA

Figura 1. Percentagens (Média  $\pm$  DP) de folículos pré-antrais morfologicamente normais após exposição ao DMSO (A), perfusão do DMSO (mg) no tecido ovariano após exposição (B), e viabilidade folicular após criopreservação (C) .....Pág. 40

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar tempos e concentrações ideais para a perfusão do dimetilsulfóxido (DMSO) para criopreservação de tecido ovariano caprino. Para tanto o córtex ovariano foi dividido em 25 fragmentos e um fragmento aleatoriamente escolhido foi imediatamente fixado (controle), enquanto os fragmentos restantes foram expostos a 20°C ao DMSO nas concentrações de 1,0 M, 1,5 M e 2,0 M por 10, 20, 30 e 40 minutos. A partir dos melhores resultados da exposição foi realizada a congelamento lenta e posteriormente avaliada a viabilidade folicular. Para a análise do efeito da concentração e do tempo de exposição sobre a morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais (FOPA), foi utilizada ANOVA seguida de teste *t*. Os valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Os resultados mostraram que a percentagem de folículos pré-antrais normais foi similar ao controle em todos os tratamentos, exceto quando o tecido ovariano foi exposto a 2,0 M por 30 e 40 minutos. Através da cromatografia líquida de alta eficiência foi observado que o tempo de exposição não exerceu influência nos níveis teciduais do DMSO. Entretanto, em geral maiores níveis teciduais de DMSO foram obtidos na concentração de 2,0 M. Após criopreservação o percentual de FOPA viáveis foi semelhante ao controle nos fragmentos exposto por 10 minutos a 1,0 M e 1,5 M de DMSO. Em conclusão, este trabalho demonstrou que a exposição do tecido ovariano caprino a 1,0 M ou 1,5 M de DMSO por 10 minutos foi eficiente, preservando a viabilidade dos FOPA após a congelamento.

**Palavras-chave:** exposição, criopreservação, dimetilsulfóxido, tecido ovariano, caprinos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the optimal time and concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) perfusion for the cryopreservation of caprine ovarian tissue. For this, the caprine ovarian cortex was divided in 25 small fragments (3x3x1 mm), one fragment being randomly removed and fixed immediately (control). The remaining fragments were exposed to 1.0, 1.5 or 2.0 M DMSO at 20°C for 10, 20, 30 or 40 minutes. According to the best results obtained after exposure, cryopreservation by slow cooling was performed. Subsequently, follicular viability was evaluated. The effect of the cryoprotectant concentration and exposure time on the morphology and viability of the preantral follicles, was evaluated by using ANOVA and t test. The values were considered significant when  $P < 0.05$ . The percentage of normal preantral follicles was similar to control values in all treatments, except when the ovarian tissue was exposed to 2.0M DMSO for 30 and 40 minutes. The HPLC method allowed us to observe that the exposure time did not exerts influence on the tissue levels of DMSO. Therefore, the highest perfusion of DMSO was observed at the concentration of 2.0 M. After cryopreservation, the percentages of viable follicles was similar to control when ovarian tissue was exposed to 1.0 or 1.5 M DMSO for 10 minutes. In conclusion, this study shows that exposure of caprine ovarian tissue to 1.0 M or 1.5 M DMSO for 10 minutes was efficient to preserve follicular viability after cryopreservation.

**Key words:** exposure, cryopreservation, dimethyl sulfoxide, ovarian tissue, caprine.

## SUMÁRIO

	<b>P.</b>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	09
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Ovário mamífero	16
2.2 Oogênese e Foliculogênese	16
2.3 Folículo ovariano	17
2.4 População folicular pré- antral e atresia folicular	18
2.5 Importância da criopreservação para a conservação de folículos pré- antrais	18
2.6 Princípios básicos da criobiologia	19
2.6.1 Os agentes crioprotetores	19
2.7 Etapas da criopreservação	21
2.8 Avaliação dos protocolos de criopreservação	23
2.9 Principais resultados obtidos com a criopreservação de tecido ovariano	23
3 JUSTIFICATIVA	26
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	28
5 OBJETIVOS	29
5.1 Geral	29
5.2 Específicos	29
6 CAPÍTULO	30
7 CONCLUSÕES GERAIS	41
8 PERSPECTIVAS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO	55

## 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação pode ser uma alternativa para o sucesso da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), que tem como objetivo isolar e cultivar *in vitro* os folículos até a sua maturação completa, evitando assim a morte folicular que ocorre naturalmente *in vivo*. Devido à ineficiência dos meios de cultivo em manter a viabilidade e o crescimento folicular *in vitro* a criopreservação de tecido ovariano permite a sua preservação, até que sejam desenvolvidos protocolos eficientes para o desenvolvimento completo desses folículos *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2007).

Embora inúmeros protocolos de criopreservação de tecido ovariano já tenham sido desenvolvidos para muitas espécies como os ovinos (GOSDEN *et al.*, 1994), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004a), bovinos (PAYNTER *et al.*, 1999) e humanos (HOVATTA *et al.*, 1996), o sucesso deste procedimento ainda permanece limitado. Diante disto, muitos pesquisadores têm trabalhado no sentido de desenvolver um protocolo ideal, de modo que a viabilidade folicular seja mantida após a descongelação.

O primeiro passo para uma eficiente preservação em baixas temperaturas, consiste na penetrabilidade do agente crioprotetor (ACP) nas células (ELMOAZZEN *et al.*, 2005) e/ou tecidos. Neste sentido, o tecido ovariano de várias espécies, dentre elas, os de cabras (RODRIGUES *et al.*, 2004a,b), ovelhas (AMORIM *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2006) e vacas (LUCCI *et al.*, 2004) tem sido criopreservado na presença de diferentes ACPs, os quais têm por finalidade proteger as células contra as crioinjúrias. Entretanto, estes agentes podem, em função de fatores como a concentração, temperatura e período de exposição, ser tóxicos aos folículos ovarianos. Portanto, dados sobre a cinética e o influxo de crioprotetores para o tecido são essenciais para assegurar o equilíbrio termodinâmico e otimizar os procedimentos de criopreservação (TAYLOR e BUSZA, 1992). Nesse contexto, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode servir como uma ferramenta valiosa para se obter os níveis ideais de um determinado ACP no tecido (ELMOAZZEN *et al.*, 2005).

Visando uma melhor compreensão do presente trabalho, os aspectos relacionados ao ovário mamífero, oogênese e foliculogênese, folículo ovariano, população folicular pré-antral e atresia folicular, importância da criopreservação para a conservação de folículos pré-antrais, princípios básicos da criobiologia, etapas da criopreservação, avaliação dos protocolos de

criopreservação bem como os principais resultados obtidos com a criopreservação de tecido ovariano serão destacados na revisão de literatura apresentada a seguir.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O ovário mamífero

O ovário mamífero é constituído por duas regiões diferenciadas, isto é, as regiões medular e cortical. Com exceção dos equídeos, a região medular é localizada na porção mais interna do ovário, sendo constituída por tecido conjuntivo, nervos e sistemas vasculares responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário. A região cortical contém folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos (HAFEZ, 1996). A gônada feminina desempenha uma função endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos), e uma função exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos), a qual é exercida pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991).

### 2.2 Oogênese e Foliculogênese

Em mamíferos, os estádios iniciais do desenvolvimento ovariano são desencadeados pela migração das células germinativas primordiais (CGP) a partir do saco vitelínico para a gônada primitiva e sua posterior colonização (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Imediatamente após a diferenciação das gônadas, ocorre a transformação das CGP em oogônias meioticamente ativas, e então em oócitos primários, os quais sofrem uma parada no seu desenvolvimento (SUH *et al.*, 2002) no estágio de prófase I. Os oócitos primários são circundados por uma camada de 4 - 8 células da pré-granulosa de formato pavimentoso e/ou cúbico, originando assim os primeiros folículos ovarianos, ou seja, os folículos primordiais (FAIR, 2003). Os folículos passam a ser chamados de primários quando todas as células da pré-granulosa que circundam o oócito tornam-se cubóides. Na espécie caprina, por exemplo, em geral, o diâmetro folicular é de 49,8  $\mu\text{m}$ . Quando duas ou mais camadas de células da granulosa estão circundando o oócito e as células da teca estão formadas, os folículos são considerados secundários, podendo ainda serem classificados em pequenos e grandes. Os pequenos folículos secundários possuem uma ultra-estrutura similar à observada nos folículos

primários. Nesse estágio folicular, a zona pelúcida que circunda o oócito, começa a ser melhor visualizada. Já os folículos secundários grandes apresentam pequenos microvilos, e várias projeções das células da granulosa que podem ser vistas passando os limites da zona pelúcida e projetando-se no oócito, onde junções *gap* são formadas. Neste estágio folicular, pequenos aglomerados de grânulos da cortical já podem ser observados (KACINSKIS *et al.*, 2005). Os folículos primordiais são formados nos ovários fetais caprinos no 62º dia de gestação, já os folículos primários e secundários são observados a partir do 73º dia desta (BEZERRA *et al.*, 1998). Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados antrais (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

### 2.3 Foliculo ovariano

O foliculo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais) (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Sua função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (GORDON, 1994, CORTVRINDT e SMITZ, 2001). De acordo com a presença ou não de antro, os folículos ovarianos são classificados como: a) *folículos pré-antrais*, os quais não possuem antro ou cavidade antral e, b) *folículos antrais*, que possuem a cavidade antral no seu interior, repleta de líquido folicular (FIGUEIREDO, 1995).

Os folículos pré-antrais, por sua vez são classificados em primordiais, primários e secundários de acordo com o estágio de desenvolvimento. Os folículos primordiais encontram-se em um estágio de quiescência (CORTVRINDT e SMITZ, 2001), e são considerados reservatórios de gametas durante toda a vida reprodutiva da fêmea mamífera (QU *et al.* 2000). Ao contrário dos folículos primordiais, os primários e secundários são considerados folículos em estágio inicial de crescimento (SILVA *et al.*, 2004).

A categoria de folículos antrais compreende os folículos terciários e de De Graaf ou pré-ovulatórios. Os folículos terciários são constituídos por um oócito, circundado pela zona pelúcida, células foliculares, uma cavidade contendo líquido folicular, uma membrana basal e duas camadas de células tecais (interna e externa). Os folículos pré-ovulatórios apresentam

um oócito secundário (metáfase II) e todos os componentes presentes nos folículos terciários, e representam o estágio final do desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO, 1995).

#### **2.4 População folicular pré-antral e atresia folicular**

Os folículos pré-antrais, representam 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e constituem o estoque de gametas femininos durante a vida reprodutiva do animal (LIU *et al.*, 2001). O número total de folículos pré-antrais por ovário varia entre espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW *et al.*, 2000); 33.000 na ovelha (AMORIM *et al.*, 2000); 35.000 na cabra (LUCCI *et al.*, 1999) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). No entanto, apesar da grande população de FOPA presentes no ovário mamífero, cerca de 99,9% destes folículos não ovulam, mas sofrem um processo natural conhecido como atresia, que causa a morte do folículo, por necrose (BRAS *et al.*, 2005) e/ou apoptose (MIKKELSEN *et al.*, 2001).

Tendo em vista a grande perda folicular e, conseqüentemente, dos oócitos neles contidos, que ocorre naturalmente *in vivo*, vários pesquisadores têm tentado desenvolver protocolos de criopreservação do tecido ovariano com o intuito de preservar os folículos pré-antrais não atrésicos (COX *et al.*, 1996; SUGIMOTO *et al.*, 1996; HOVATTA *et al.* 1996, CANDY *et al.*, 1997; GOSDEN *et al.*, 1994; PAYNTER *et al.*, 1999), visando à maximização do potencial oocitário de fêmeas mamíferas em protocolos de cultivo *in vitro* ou enxerto do tecido ovariano.

#### **2.5 Importância da criopreservação para a conservação de folículos pré-antrais**

Atualmente, a criopreservação do córtex ovariano tem se tornado uma alternativa promissora para a preservação da fertilidade humana (OKTAY *et al.*, 1998, NEWTON *et al.*, 1998). Além da perda natural (atresia) de folículos pré-antrais que ocorre *in vivo*, em humanos são muito comuns os problemas de infertilidade prematura resultantes do tratamento de certos cânceres, nos quais as pacientes recebem altas doses quimioterápicas e irradiação abdominal (NUGENT *et al.*, 1997). Na medicina veterinária, o objetivo principal da criopreservação é aumentar a performance\_reprodutiva de animais de alto valor genético, ou mesmo a

preservação de espécies raras ameaçadas de extinção, as quais podem ser utilizadas para propagar e proteger a biodiversidade (HOLT, 2001). A criopreservação também é de grande importância prática, pois visa à constituição de bancos de germoplasma animal (BGA), o que poderá flexibilizar a realização de biotécnicas como a fecundação *in vitro*, clonagem, transgenia e MOIFOPA. Para a MOIFOPA, por exemplo, milhares de oócitos saudáveis oriundos de folículos pré-antrais obtidos após a coleta de ovários poderão ser mantidos em BGAs e poderão ser utilizados posteriormente, à medida que se deseje ou julgue necessário.

## 2.6 Princípios básicos da Criobiologia

A criobiologia como uma ciência descreve os efeitos das temperaturas abaixo de zero sobre os organismos vivos. A complexidade da criobiologia está profundamente enraizada no comportamento dos sistemas celulares vivos e suas respostas às massivas mudanças de temperatura (PETRUNKINA, 2007). Para manter a viabilidade celular após longo período de estocagem em baixas temperaturas, células vivas são submetidas a um estado de redução do metabolismo no qual podem permanecer por um período de tempo indefinido e, serem resgatadas viáveis no futuro (MAZUR, 1980). Entretanto, para que isso seja possível, vários fatores essenciais para a sobrevivência celular devem ser considerados. Dentre esses fatores podem ser citados o tipo e concentração dos agentes crioprotetores (ACPs), a taxa de redução da temperatura durante a congelação; a manutenção da temperatura de estocagem; o procedimento de descongelação e as técnicas utilizadas para a remoção do crioprotetor após a descongelação do material biológico (GORDON, 1994).

### 2.6.1 Os agentes crioprotetores

Os ACPs são solventes orgânicos utilizados nas soluções crioprotetoras e são compostos muito hidrófilos. Os ACPs estão divididos em três classes: (1) penetrantes ou intracelulares – crioprotetores de baixo peso molecular como o dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol (PROH), etilenoglicol (EG), glicerol (GLI), metanol e butanodiol; (2) Não-penetrantes ou extracelulares de baixo peso molecular (galactose, glicose, sacarose e trealose)

e (3) Não-penetrantes ou extracelulares de elevado peso molecular (polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, hialuronato de sódio e albumina sérica bovina (GUYADER-JOLY, 1998).

A utilização destas substâncias em protocolos de criopreservação é necessária para garantir a sobrevivência de células e tecidos criopreservados, bem como, moderar os efeitos letais normais da concentração de soluto extracelular, gelo intracelular e gelo na matriz dos tecidos (ELMOAZZEN *et al.*, 2005). Entretanto, para que a utilização de um ACP proporcione resultados satisfatórios, é necessário que o mesmo apresente características desejáveis, como alta solubilidade em soluções salinas aquosas, baixo peso molecular para proporcionar uma rápida e completa penetração na célula ou tecido; baixa toxicidade (PEGG *et al.* 1974) e alta estabilidade em temperaturas reduzidas (De La VEGA e WILDE, 1991).

No que se refere ao mecanismo de ação dos ACPs intracelulares, de acordo com RALL *et al.* (1987), estes podem atuar por diferentes maneiras: 1) interagem com as modificações da membrana que ocorrem durante o processo de criopreservação. Neste caso, os ACPs penetram na membrana celular e, acredita-se que essas substâncias estabilizam as proteínas intracelulares evitando conseqüentemente, o rompimento da membrana celular durante a congelação (MASSIP *et al.*, 1987); 2) baixam o ponto de congelação da solução, situação em que as células sofrem formação letal de gelo intracelular e 3) aliviam o efeito das altas concentrações de solutos (eletrólitos), intra e extracelular (MAZUR, 1963). Além disso, os ACPs (não penetrantes) podem ainda atuar como um tampão hiperosmótico, diminuindo os efeitos de altas concentrações de moléculas nas células desidratadas (MASSIP *et al.*, 1987).

Dentre os crioprotetores intracelulares destaca-se o DMSO, o qual é um composto orgânico de fórmula molecular  $C_2H_6SO$  e massa molar 78,13 g/mol (CARPENTER, 1994). Este composto possui uma elevada capacidade higroscópica que é decorrente de sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. (BRAYTON, 1986; BLYTHE *et al.*, 1986; ROSE e HODGSON, 1993; RAND-LUBY *et al.*, 1996).

O DMSO vem sendo utilizado com bastante sucesso como ACP para a criopreservação de embriões (BALMACEDA *et al.*, 1986), oócitos maduros (WHITTINGHAM, 1977) e FOPA inclusos no tecido ovariano (SANTOS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2004b) ou isolados (RODRIGUES *et al.*, 2005), em diferentes espécies. Especificamente em pequenos ruminantes, diversos autores demonstraram que o DMSO tem

apresentado bons resultados no que se refere à criopreservação de tecido ovariano (AMORIM *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004b; SANTOS *et al.*, 2005). Em humanos, a primeira gestação obtida a partir de oócitos congelados/descongelados foi observada quando a técnica de congelação lenta foi empregada e o DMSO utilizado como crioprotetor (CHEN, 1986).

## 2.7 Etapas da criopreservação

O processo de criopreservação envolve basicamente as seguintes etapas: (A) adição de ACPs (perfusão do ACP ou período de equilíbrio); (B) resfriamento e indução da formação de gelo e congelação; (C) estocagem em nitrogênio líquido; (D) descongelação e (E) remoção ou diluição do ACP (FAHNING e GARCIA, 1992).

(A) - Adição de ACPs: O primeiro passo para uma eficiente preservação utilizando baixas temperaturas consiste na penetração do ACP nas células (ELMOAZZEN *et al.*, 2005) e/ou tecidos. Para isso, o período de exposição é uma etapa extremamente importante no processo de criopreservação, pois permite que a célula ou tecido atinja um estado no qual as concentrações de ACP extra e intracelulares, entrem em equilíbrio (GUNASENA *et al.*, 1997). Dessa forma, dados sobre a cinética e o influxo de crioprotetores para o tecido são essenciais para assegurar o equilíbrio e otimizar os procedimentos de criopreservação (TAYLOR e BUSZA, 1992). Para a determinação da concentração final de um determinado crioprotetor no tecido, pode ser utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, a qual já foi utilizada para determinar a concentração de DMSO em miocárdio de suíno (ELMOAZZAN *et al.*, 2005).

(B) - Resfriamento, indução da formação de gelo e congelação: Durante o resfriamento, à medida que a temperatura decresce da fisiológica 39°C (como, por exemplo, na espécie caprina) para 0 °C, a célula atinge um estado de super-resfriamento, ocorrendo, a 0°C, formação de gelo no meio extracelular. Os eventos físicos subsequentes irão depender da velocidade de congelação. Se a congelação ocorre lentamente, a célula super-resfriada perde água porque a pressão de vapor da água na célula excede àquela do exterior celular congelado e, com a progressiva redução da temperatura, a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície das células (SANTOS, 2000). Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula pode sofrer choque osmótico.

Este fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelação. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se àquele do gelo extracelular, um equilíbrio é estabelecido e uma desidratação adicional não ocorrerá, contanto que a temperatura permaneça constante. Por outro lado, se a célula for congelada muito rapidamente, a desidratação por congelação não ocorre, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e eventualmente a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo intracelulares – CGI (STEPONKUS e WEBB, 1992). No caso de utilização do método de congelação lenta, com a finalidade de reduzir a formação dos CGI durante esta fase, deve-se induzir a formação extracelular de gelo ou *seeding*, evitando o super-resfriamento (OKTAY *et al.*, 2001). O *seeding* pode ser realizado manualmente, tocando a parede dos criotubos ou palhetas, utilizando um objeto de metal resfriado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (FABBRI *et al.*, 2000). A desidratação celular continua durante o processo de resfriamento até sua congelação na temperatura de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (STACHECKI e COHEN, 2004).

(C) - Estocagem em nitrogênio líquido: Terminado o processo de congelação, o material deve ser armazenado em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou no vapor de nitrogênio ( $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sendo o primeiro mais comumente utilizado. A congelação e descongelação, e não o tempo de estocagem, exerce os principais efeitos deletérios sobre as células criopreservadas (SMITH *et al.*, 2001).

(D) - Descongelação: A taxa de aquecimento utilizada para a descongelação é também um ponto crítico para o sucesso dos procedimentos de criopreservação. O problema que pode ocorrer durante a descongelação é a recristalização com formação de gelo intracelular, que pode reduzir a sobrevivência das células congeladas (FABBRI *et al.*, 2000). Objetivando evitar esse fenômeno, a descongelação deverá ocorrer o mais rapidamente possível, a  $275\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sendo normalmente realizada em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir uma dispersão muito rápida dos CGI. Assim, o gelo extracelular derrete e penetra na membrana celular em um estado líquido para reidratar a célula (FRIEDLER *et al.*, 1988).

(E) - Remoção ou diluição do ACP: Quanto à remoção do crioprotetor, esta pode ser realizada submetendo a célula ou tecido a um (uma etapa) ou vários banhos (várias etapas) sucessivos, normalmente de 5 a 15 minutos, utilizando-se meios na ausência ou na presença de ACPs. Após a descongelação celular, o ACP deve ser removido devido à sua toxicidade às

temperaturas elevadas (NEWTON *et al.*, 1998). Quando uma célula descongelada é colocada em um meio na ausência de ACP ou na presença de baixas concentração dessas substâncias, a água entra na célula para diluir o ACP mais rapidamente do que o ACP deixa a célula e, isso causa inchaço ou a célula pode até mesmo romper-se (PEGG, 2002).

Apesar de todos esses cuidados serem tomados durante o procedimento de criopreservação, ainda não existe um protocolo ideal que mantenha a integridade plena do material biológico a ser preservado. No entanto, vários protocolos em diferentes espécies como humanos (NEWTON *et al.*, 1998); bovinos (PAYNTER *et al.*, 1999); ovinos (SANTOS *et al.*, 2007) e caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004a,b) têm sido realizados e avaliados quanto à sua eficiência.

## **2.8 Avaliação dos protocolos de criopreservação**

Para a avaliação da eficiência dos protocolos de congelação, diferentes técnicas podem ser empregadas isoladamente ou em associação, tornando a interpretação da qualidade folicular mais precisa (MATOS *et al.*, 2007). Dentre estas técnicas, destacam-se a histologia clássica (análise morfológica e quantitativa), a utilização de corantes vitais, como o azul de trypan (análise da viabilidade), a microscopia eletrônica de transmissão (análise ultraestrutural) e o teste de TUNEL (detecção de apoptose).

Estudos (SCHOTANUS *et al.*, 1997; MARTINEZ-MADRID *et al.*, 2004) mostraram que a análise morfológica nem sempre está correlacionada com a viabilidade e capacidade de desenvolvimento dos folículos e, como sabido, a criopreservação pode induzir a ruptura da membrana celular. Nesse sentido, a análise histológica pode ser utilizada para identificar sinais de atresia, como picnose nuclear, danos citoplasmáticos, destacamento das células da granulosa e danos na membrana basal (DEMIRCI *et al.*, 2002). Já o corante vital azul de Trypan pode ser utilizado em análises rápidas para detectar integridade da membrana celular (JEWGENOW *et al.*, 1998).

A técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling) emprega uma enzima (transferase deoxynucleotidil terminal) para adicionar nucleotídeos aos fragmentos das fitas de DNA quebradas nas células apoptóticas. Esta técnica é utilizada para avaliar a fragmentação do DNA em secções

histológicas (TILLY e TYLLY, 1995), permitindo a avaliação histológica, bem como a detecção do grau de apoptose (PEDERSEN *et al.*, 2003).

## 2.9 Principais resultados obtidos com a criopreservação de tecido ovariano

Até o presente momento resultados satisfatórios já foram obtidos após criopreservação de tecido ovariano. Estudos realizados em animais de laboratório demonstraram que folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano após a congelação e descongelação apresentam-se morfológicamente normais (HOVATTA *et al.*, 1996; CANDY *et al.*, 1997). Desta forma, o tecido ovariano congelado, contendo os folículos pré-antrais, pode ser utilizado posteriormente para transplantes. Pesquisas com camundongas ovariectomizadas e auto-transplantadas com tecido ovariano fresco ou congelado e descongelado, apresentaram ciclos estrais regulares pós-transplante em 75 e 80% dos animais, respectivamente (HARP *et al.*, 1994). Tecido ovariano de sagüis criopreservado também tem sido transplantado com sucesso sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes. Nos enxertos recuperados 21 a 32 dias depois, observou-se folículos em todos os estágios da foliculogênese, incluindo folículos antrais de 1 a 2 mm de diâmetro (CANDY *et al.*, 1995). Resultados similares também foram obtidos por HOVATTA *et al.* (1996) em humanos, utilizando-se o DMSO e o PROH como crioprotetores. COX *et al.* (1996) demonstraram que ovários fetais congelados e descongelados quando transplantados recuperaram a fertilidade em camundongas, mostrando que 73% a 86% dos animais mostraram-se gestantes. O transplante para um ambiente diferente do *in vivo* pode ser uma alternativa para a constituição de bancos de tecido ovariano congelado (NEWTON *et al.*, 1998). Fragmentos de ovário ovino (GOSDEN *et al.*, 1994) e primata não humano (CANDY *et al.*, 1995) enxertados sob a cápsula renal de camundongos imunodeficientes, demonstrou revascularização e crescimento folicular. Ademais, folículos presentes no tecido ovariano humano cresceram até o estágio antral (mais de 5 mm de diâmetro) após seis semanas de estimulação exógena com FSH (OKTAY *et al.*, 1998). Foram obtidas crias de animais de laboratório a partir de enxerto de tecido ovariano congelado e descongelado em camundongos (CARROLL e GOSDEN, 1993; GUNASENA *et al.*, 1997). Em animais domésticos como os ovinos, a viabilidade folicular também já foi demonstrada através da análise histológica de tecido ovariano congelado e descongelado (SALLE *et al.*,

1999). BAIRD *et al.* (1999) realizaram auto-transplante de tecido ovariano em ovelhas após descongelamento e observaram aumento nos níveis de progesterona quatro semanas após o enxerto. Porém, nesta espécie os primeiros resultados mais encorajadores foram reportados por GOSDEN *et al.* (1994), os quais relataram nascimento após o transplante de tecido ovariano congelado e descongelado. Recentemente, nesta mesma espécie, outros trabalhos (SALLE *et al.*, 2002, SALLE *et al.*, 2003) também relataram o nascimento após a aplicação desta técnica.

Ainda com relação aos principais resultados oriundos da criopreservação de tecido ovariano é importante destacar que na espécie humana já foi obtido formação de antro (GOOK *et al.*, 2001), e nascimentos (DONNEZ *et al.*, 2004), após transplante deste tecido.

### 3 JUSTIFICATIVA

Embora, resultados satisfatórios, inclusive com a produção de crias viáveis (camundongos – GUANASENA *et al.*, 1997; ovinos – GOSDEN *et al.*, 1994 e humanos DONNEZ *et al.*, 2004) tenham sido relatados após a criopreservação de tecido ovariano, fatos como esses ainda não se caracterizam como um acontecimento rotineiro, impedindo, portanto, a sua aplicação prática. Por esta razão, torna-se fundamental o desenvolvimento de protocolos de criopreservação, nos quais os folículos pré-antrais possam ser preservados no interior de pequenos fragmentos de tecido ovariano (*in situ*), visando a sua utilização futura em procedimentos de cultivo *in vitro* (crescimento, maturação e fecundação *in vitro* para a obtenção de embriões viáveis) ou auto-transplante, à medida que se fizer necessário. Ademais, haja vista ainda não existir um procedimento de cultivo *in vitro* que permita o completo crescimento e maturação dos folículos pré-antrais caprinos e ovinos, o desenvolvimento de um protocolo eficiente de criopreservação possibilitaria em curto prazo, a preservação de patrimônio genético de animais de elevado valor zootécnico, bem como aqueles em risco de extinção, para posterior utilização em programas de reprodução assistida.

É importante destacar que o primeiro passo para uma eficiente preservação consiste na penetrabilidade do ACP nas células ou tecidos (ELMOAZZEN *et al.* 2005), visto que os ACPs conferem proteção ao tecido nas etapas seguintes do processo de criopreservação. Portanto é de extrema importância a escolha do tipo, concentração e tempo de exposição ideais ao ACP antes do processo de criopreservação propriamente dito.

Conforme visto na revisão de literatura, o DMSO tem sido utilizado com sucesso para a criopreservação de FOPA de humanos (NEWTON *et al.*, 1998), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004b) e ovinos (SANTOS *et al.*, 2006; 2007). Apesar disso, tem se verificado a ausência de informações a cerca da perfusão deste crioprotetor no tecido ovariano, a qual caracteriza-se em uma excelente estratégia para estabelecer a concentração ideal a ser utilizada. Para isso, pode ser empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é capaz de determinar os níveis teciduais de DMSO após a exposição ao mesmo.

Apesar de conferir proteção ao tecido e células durante os procedimentos de criopreservação, os ACPs também podem causar toxicidade, cuja intensidade varia de acordo a concentração, tempo e temperatura de exposição aos quais o material biológico é submetido

antes de ser congelado ou vitrificado. No entanto, para se conhecer o grau de intensidade dos efeitos tóxicos que um ACP pode causar sobre um tecido, pode-se lançar mão de técnicas como a histologia clássica, o TUNEL, e o corante vital azul de tripan. A histologia clássica permite verificar apenas as alterações morfológicas avançadas das células da granulosa, e do oócito, enquanto que a técnica de TUNEL identifica as alterações características da apoptose (fragmentação do DNA). O corante vital azul de tripan por sua vez, é utilizado para avaliação da integridade da membrana celular.

Embora, as técnicas acima citadas possam revelar as alterações morfológicas dos efeitos tóxicos da exposição do tecido ovariano aos ACPs sobre os folículos pré-antrais, é necessário conhecer a habilidade folicular de sobreviver às temperaturas abaixo de zero durante o processo de criopreservação, com o intuito de serem utilizados posteriormente. As técnicas utilizadas nessa investigação poderão contribuir de forma significativa para a determinação do tempo e concentrações ideais necessários para a perfusão do DMSO no tecido ovariano caprino. Os dados obtidos com a realização deste estudo também poderão ser de grande valia para a criobiologia, podendo oferecer em um futuro próximo, benefícios para otimização da preservação e estocagem de tecido ovariano caprino em larga escala.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O tempo de exposição e a concentração do DMSO influenciam no processo de perfusão e na criopreservação do tecido ovariano caprino

## 5 OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Estudar a influência do tempo de exposição e a concentração do DMSO na perfusão do tecido ovariano caprino

### Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de cabras expostos há diferentes tempos e concentrações de DMSO;
- Verificar os níveis teciduais de DMSO no córtex ovariano após diferentes tempos e concentrações de exposição;
- Avaliar a viabilidade após criopreservação de FOPA caprinos previamente expostos ao DMSO.
- Verificar a presença de apoptose em FOPA expostos e criopreservados em DMSO.

## 6 Capítulo

Perfusão do dimetilsulfóxido no tecido ovariano caprino e avaliação da viabilidade folicular após exposição e criopreservação

Valesca B Luz, Regiane R Santos, Leonardo C Pinto, Alison AX Soares, Juliana JH Celestino, Jair Mafezoli, Cláudio C Campello, José R Figueiredo, Ana PR Rodrigues

### RESUMO

Fragmentos do córtex ovariano (3x3x1 mm) foram expostos em diferentes concentrações de DMSO, para posterior análise da perfusão por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e criopreservação convencional, demonstrando a importância de um simples teste de perfusão para prever a eficiência de um procedimento de criopreservação.

**Palavras-chave:** exposição, criopreservação, dimetilsulfóxido, tecido ovariano, caprinos.

Fertility and Sterility  
(Aceito para publicação)

**Running title:** Cryoprotectant perfusion in ovarian tissue

DMSO perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after  
cryopreservation

Valesca B Luz, D.V.M.<sup>a</sup>, Regiane R Santos, Ph.D.<sup>b\*</sup>, Leonardo C Pinto, D.V.M.<sup>a</sup>, Alison AX  
Soares, D.V.M.<sup>a</sup>, Juliana JH Celestino, M.Sc.<sup>a</sup>, Jair Mafezoli, Ph.D.<sup>c</sup>, Cláudio C Campello,  
Ph.D.<sup>a</sup>, José R Figueiredo, Ph.D.<sup>a</sup>, Ana PR Rodrigues, Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Laboratory of Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles, Faculty of  
Veterinary Medicine, University of Ceará, Fortaleza, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Farm Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University,  
Utrecht, The Netherlands*

<sup>c</sup>*Department of Life Sciences, Fortaleza University, Fortaleza, Brazil*

Author for correspondence: Regiane R. Santos (regianers@hotmail.com)

Yalelaan 104, 3584CM, Utrecht, the Netherlands

Tel: + 31 30 253 1190

Fax: + 31 30 253 4811

**Capsule:** The DMSO perfusion of ovarian tissue from a large mammal, the goat, is evaluated and its relation with follicular viability is described.

**Abstract:** Ovarian cortical fragments (3x3x1 mm) were exposed to DMSO in different concentrations for further analysis of cryoprotectant perfusion by applying High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and conventional cryopreservation. It was demonstrated the importance of this simple perfusion test to predict the efficiency of the cryopreservation procedure.

Despite the encouraging results obtained after cryopreservation of human ovarian tissue (1), several events related to the procedure itself must be properly controlled. The first step before freezing consists in permeate the ovarian tissue with a cryoprotectant agent. Considering that the ovary is a complex tissue, an optimal perfusion can be indicative of a successful freezing procedure. To verify the diffusion of a cryoprotectant into the tissue, some sophisticated procedures have been used, e.g. radioactive tracers (2) and proton nuclear magnetic resonance analysis (3). A simple and inexpensive method named High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has been used successfully to evaluate perfusion of DMSO into liver fragments (4), and has the advantage to be performed rapidly and routinely in any laboratory. To evaluate the HPLC method in ovarian tissue, we have decided use an excellent animal model for human, the goat (5). In the present study, ovarian tissue from goats were submitted to DMSO exposure and submitted to HPLC analysis and cryopreservation. Our aim was to determine the DMSO ovarian tissue levels and its relation with the follicular viability after exposure and cryopreservation.

Two experiments were performed by using ovaries from eight adult mixed breed goats. For each experiment four ovarian pairs were used, which means that each of the experimental conditions were repeated four times. Ovarian pairs were obtained at a local slaughterhouse, washed in 70% alcohol, twice in HEPES-buffered MEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Holding Medium - HM), supplemented with 0.1% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco, Paisley, UK) and then were transported to the laboratory in thermo flasks at 20°C within 1 hour. In a first experiment, from each ovarian pair, 25 cortical fragments (3x3x1 mm) were removed and placed in the HM. One fragment was immediately fixed (control) in paraformaldehyde 4% for routine histological and apoptotic (TUNEL) studies, and early-stage follicles were classified as normal or atretic (6). The remaining 24 fragments were divided as

follow: (i) 12 fragments were exposed, at 20°C, for 10, 20, 30 or 40 min to 1.0, 1.5 or 2.0 M (140.4, 210.6 or 280.8 mg, respectively) of DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) in 1,8 ml of HM added by 10% FBS (HM<sup>+</sup>). For cryoprotectant removal, fragments were washed 3 times (5 min each) in HM<sup>+</sup> and fixed for routine histological and TUNEL analysis; (ii) the other 12 fragments were exposed to DMSO as described above, and immediately submitted to HPLC analysis to evaluate DMSO perfusion into the ovarian fragments. To use this method for ovarian tissue, we have adapted a procedure previously described for liver (4). In a second experiment, 7 cortical fragments (3x3x1 mm) were randomly removed from each pair of ovaries and placed in HM. For viability analysis, one fragment was immediately submitted to follicular isolation (control) and early-stage follicles were classified as viable (not stained) or non-viable (stained) by using trypan blue dye (7). The remaining 6 fragments were exposed to DMSO as described in the first experiment, excluding the exposure times of 30 and 40 min, and submitted to a conventional cryopreservation procedure previously tested by our group (8), where after samples were thawed and DMSO was washed out from the ovarian tissue according to the procedure described in the first experiment. To assess viability, early-stage follicles were isolated from the tissue, followed by trypan blue staining as quality control in ovarian cryopreservation procedures (9). Mean percentages of morphologically normal (exp 1) and viable (exp 2) early-stage follicles in the different treatments were compared using Dunnet test. All data were submitted to ANOVA and compared by using t Test, and Pearson correlation was performed. Values were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

In the first experiment, a total of 1560 early-stage follicles were examined for their morphology and the mean percentages of normal follicles were calculated (Fig 1A). Follicular exposure to DMSO did not significantly reduced ( $P > 0.05$ ) the percentage of normal early-stage follicles when compared to untreated (control) follicles or among the treatments, except

for exposure to 2.0 M DMSO for 30 and 40 min that significantly reduced the percentage of normal follicles when compared to control. To determine DMSO perfusion into the ovarian tissue, HPLC analysis has been performed (Fig. 1B). Except for 1.5 M DMSO exposure for 40 min and 2.0 M DMSO exposure for 30 min, tissue levels were not significantly affected by increase in time and concentration. This was confirmed by the low correlation between follicular morphology and cryoprotectant concentration and time of exposure ( $r^2=-0,36$ ). The mean minimum (0.63 mg) and maximum (1.63 mg) DMSO tissue levels were observed after ovarian tissue exposure to 1.0 M DMSO for 10 min and 2.0 M DMSO for 30 min, respectively. The second experiment followed the results obtained in the experiment 1, and a total of 840 early-stage follicles were examined for their viability by using trypan blue staining. The mean percentages of viable follicles were calculated (Fig 1C). Cryopreservation of ovarian tissue after exposure to 1.0 and 1.5 M DMSO for 10 min did not significantly reduced ( $P>0.05$ ) the percentage of viable early-stage follicles when compared to control. After TUNEL, it was not observed high percentages of apoptotic follicles in any treatment.

Follicular morphology was not negatively affected when ovarian tissue was exposed to 1.0 and 1.5 M DMSO until 40 min, or to 2.0M DMSO for 10 and 20 min. However, follicular survival after cryopreservation was similar to control values when exposure to 1.0 or 1.5 M DMSO was performed for a maximum period of 10 min. Previous experiments had demonstrated that ovarian tissue of large mammals, e.g. caprine and human, can be efficiently cryopreserved in low concentrations of DMSO, such as approximately 1.0 M (10,11) and 1.5 M (3,8). In the studies using goat ovarian tissue, exposure to DMSO has been carried out at 20°C (8,10) as in our present study, but for a longer period (20 min). Differently, exposure in the previously cited human studies (3,11) has been performed for 30 min, but at a lower temperature (4°C). Although the reported success, only the study from Newton and co-

workers (3) had evaluated the permeation rate of the cryoprotectant, as well as in the present study we have obtained viability rates similar to those observed in fresh tissue (control). To assess permeation of cryoprotectant into the ovarian tissue using a simple, inexpensive and rapid procedure, we have performed HPLC analysis. We have showed that a minimum amount of DMSO into the ovarian tissue (0.63 mg) associated with an short and optimal exposure time (10 min), was sufficient to protect the early-stage follicles against chilling injuries. Thus, the toxic effect of the cryoprotectant can be reduced without compromise the freezing success as confirmed by viability analysis and absence of apoptotic cells, which was confirmed by TUNEL. The current study demonstrates the possibility to successfully cryopreserve ovarian tissue after exposure to 1.0 or 1.5 M DMSO for 10 min. Based on this, further studies evaluating other cryoprotectants as well as reducing the cryoprotectant concentration on the freezing medium, will help to develop efficient procedures for isolated early-stage follicles before clinical application.

This work was supported by FUNCAP, Brazil (N<sup>o</sup> 257/06). Valesca Barreto Luz is a recipient of a grant from CNPq, Brazil. The authors thank Fortaleza University (UNIFOR) for the logistical support.

1. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364:1405-10.
2. Clark P, Fahy GM, Karow AM. Factors influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solutions in non frozen rabbit cortical slices. *Cryobiology* 1984; 21:274-84.
3. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13:376-80.

4. Carpenter JF, Dawson PE. Quantitation of dimethylsulfoxide in solutions and tissues by high performance liquid chromatography. *Cryobiology* 1991; 28:210-5.
5. Santos RR, Knijn HM, Vos PLAM, Oei CHY, Van Loon T, Colenbrander B, et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, auto-transplanted caprine ovarian cortex. *Fertil Steril* 2008; epub ahead of print.
6. Silva JR, Tharasanit T, Taverne MA, Van der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, et al. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol* 2006 ; 1889:113-25.
7. Santos RR, Van Haeften T, Roelen BAJ, Knijn HM, Colenbrander B, Gadella BM, et al. Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles. *Cell Tissue Res* 2008 ; epub ahead of print.
8. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Ani Reprod Sci* 2004; 84:211-27.
9. Fauque P, Ben Amor A, joanne C, Agnani G, Bresson JL, Roux C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertil Steril* 2007; 87:1200-7.
10. Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haeften T, Van den Hurk R. Preservation of caprine preantral follicles viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res* 2006; 325:523-31.
11. Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2000; 15:302-10.

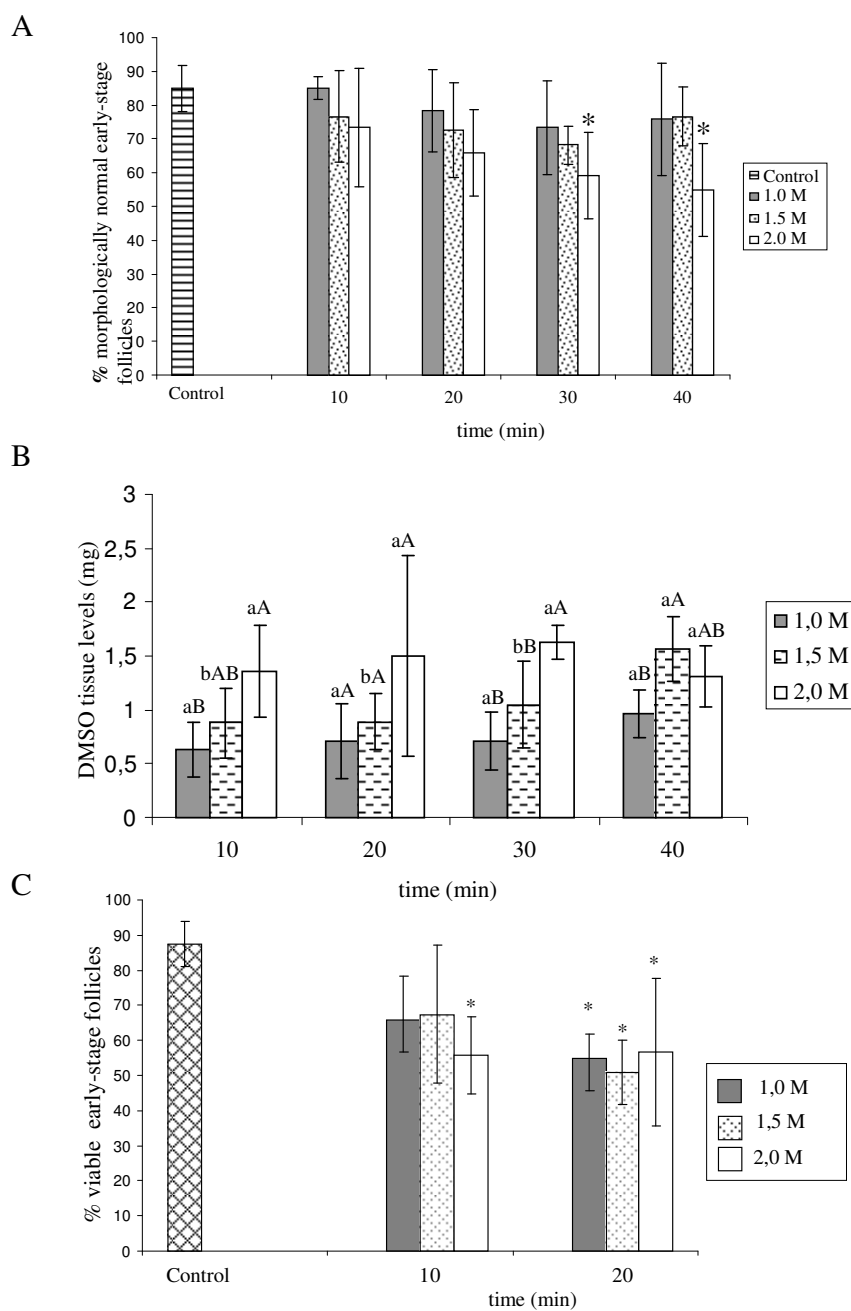
### Legend

Figure 1. Percentages (Mean  $\pm$  SD) of morphologically normal early-stage follicles after exposure to DMSO (A), of the DMSO perfusion (mg) into the ovarian tissue after exposure (B), and of viable follicles after cryopreservation (C).

\* Differs significantly from control

a,b Differs significantly among incubation times (10, 20, 30 and 40 min)

A,B Differs significantly among DMSO concentrations (1.0, 1.5 and 2.0 M)



## 7 CONCLUSÕES GERAIS

- A exposição do tecido ovariano ao DMSO nas concentrações de 1,0 M e 1,5 M por 10 minutos não reduz a percentagem de FOPA morfológicamente normais;
- Uma melhor eficiência na criopreservação de FOPA caprino inclusos no tecido ovariano foi obtida utilizando curto período de exposição e baixas concentrações de DMSO (1,0 M ou 1,5 M).
- A exposição ao DMSO não constituiu fator predisponente à atresia por apoptose em FOPA caprinos.

## 8 PERSPECTIVAS

- O protocolo de criopreservação descrito no presente trabalho poderá ser rotineiramente utilizado, visando à preservação de FOPA caprinos inclusos em tecido ovariano oriundo de animais de alto valor genético, visando à constituição de banco de germoplasma animal. Entretanto, testes mais precisos como a microscopia eletrônica de transmissão e o cultivo *in vitro* poderão ser utilizados visando uma melhor avaliação da eficiência dos protocolos de exposição/congelamento.
- Estudos avaliando outros crioprotetores poderão auxiliar no estabelecimento de um protocolo ideal para a criopreservação de FOPA em várias espécies, inclusive a humana, haja vista a utilização desta técnica na aplicação clínica.

## 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.; RODRIGUES A.P.; RONDINA D.; GONCALVES P.B.; DE FIGUEIREDO J.R.; GIORGETTI A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and Sterility**, v.79, p. 682-686, 2003.

BAIRD, D.T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B.K.; HARKNESS, L.M.; GOSDEN, R.G. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 °C. **Endocrinology**, v. 140, p. 462-471, 1999.

BALMACEDA, J.P.; HEITMAN, T.O.; GARCIA, M.R.; PAUERSTEIN, C.J.; POLL, T.B. Embryo cryopreservation in cynomolgus monkeys. **Fertility and Sterility**, v. 45, p. 403-406, 1986.

BEZZERA, M.B.; RONDINA, D.; LIMA, A.K.S.; FIGUEIREDO, J.R. Aspecto quantitativos e qualitativos de foliculogênese na fase pré-antral na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, p. 47-56, 1998.

BLYTHE, L.L.; CRAIG, A.M.; CHRISTENSEN, J.M.; APPELL, L.H.; SLIZESKI, M.L. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 1739-1743, 1986.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, p. 231-239, 2005.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary**, v.76, p. 61-90, 1986.

BRISTOL-GOULD, S. e WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

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

CANDY, C.J., WOOD, M.J., WHITTINGHAM, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v. 9, p. 2334-2338, 1995.

CARPENTER, J. F.; DAWSON, P. E. Quantitation of dimethylsulfoxide in solutions and tissues by high performance liquid chromatography. **Cryobiology**, v. 28, p. 210-5, 1991.

CARROLL, J. e GOSDEN, R.G. Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1163-1167, 1993.

CARPENTER, R.J.; ANGEL, M.F.; MORGAN, R.F. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. **Otolaryngology - head neck surgery**, v. 110, p. 228-231, 1994.

CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **Lancet**, v. 1, p. 884-886, 1986.

CLARK, P.; FAHY, G. M.; KAROW, A. M. Factors influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solutions in non frozen rabbit cortical slices. **Cryobiology**, v. 21, p. 274-84, 1984.

CORTVRINDT, R. e SMITZ, J.E.J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 3-9, 2001.

COX, S.L.; SHAW, J.; JENKIN, G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipient in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p. 315-322, 1996.

DE LA VEGA, A.C. e WILDE, O.R. Fundamentos biológicos de lá criopreservacion. **Revista Argentina de Producción Animal**, v. 11, p. 151-165, 1991.

DERMICI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J.F., Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertility and Sterility**, v. 75, p.754-762, 2002.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M., DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, p. 16-22, 2004.

ELMOAZZEN, H.Y.; ELLIOTT, J.A.W.; MCGANN, L.E. Cryoprotectant equilibration in tissues. **Cryobiology**, v. 51, p. 85-91, 2005.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **In: Seminars in Reproductive Endocrinology**, San Diego-California, p. 233-254, 1986.

FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; PRIMAVERA, M.R.; ROCCHETTA, G.; CIOTTI, P.M.; MAGRINI, O.; SERACCHIOLI, R.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 39-42, 2000.

FAHNING, M.L. e GARCIA, M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, v. 29, p. 1-18, 1992.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 203-216, 2003.

FAUQUE, P.; BEN AMOR, A.; JOANNE, C.; AGNANI, G.; BRESSON, .J. L.; ROUX, C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 87 (5), p. 1200-7, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. **In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Roca, p. 227-260, 2008.

FIGUEREDO, J.R. Isolament, caractérisation et culture de folículos préantaux chez les bovins. Liège-Belgique: Université de Liège, These PhD. 113 p, 1995.

FRIEDLER, S.; GIUDICE, S.C.; LAMB, E.J. Cryopreservation of embryos and ovario. **Fertility and Sterility**, v. 49, p.743-764, 1988.

GOOK, D. A.; MCCULLY, B.A.; EDGAR, D.H.; MCBAIN, J.C. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Human Reproduction**, v. 16, p. 417-422, 2001.

GORDON, I. Storage and criopreservation of oocytes and embryos. In: GORDON I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International, Raven Press, p. 293-328, 1994.

GOSDEN, R.G.; BAIRD, D.T.; WADE, J.C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. **Human Reproduction**, v. 9, p. 597-603, 1994.

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.

GUYADER-JOLY, C. Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. **Elevage et Insémination**, v. 288, p. 3-23, 1998.

HAFEZ, E.S.E. Anatomy of Female Reproduction. **In: Reproduction in Farm Animals**, 6<sup>th</sup> edition, USA: Williams & Wilkins, p. 20-58, 1996.

HARP, R.; LEIBACH, J.; BLACK, J.; KELDAHL, C.; KAROW, A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. **Cryobiology**. V. 31, p. 336-343, 1994.

HOLT, W.V. Genetic resource banking and maintaining biodiversity. **In: Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future?**. Taylor e Francis Ltd., p. 9-19, 2001.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; KRAUSZ, T.; ABIR, R.; MARGARA, R.; TREW, G. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectant. **Human Reproduction**, v. 11, p. 268-1272, 1996.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.D. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Jornal Reproduction and Fertiltlity**, v. 112, p. 39-47, 1998.

KACINSKIS, M.A.; LUCCI, C.M.; LUQUE, M.C.A.; BÁO, S.N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 45-57, 2005.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT M. Live offspring by in vitro oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 171-178, 2001.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of sections of ovarian tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; LOPES, L.H.R.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine *Bos indicus* ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1101-1114, 2004.

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; VAN LANGENDONCKT, A., DEFREERE S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 1390-1394, 2004.

MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Animal Physiology**, v. 27, p. 69-79, 1987.

MATOS, M. H.T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade folicular de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31 (4), p. 433-442, 2007.

MAZUR, P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. **Journal of General Physiology**, v. 47, p. 347-369, 1963

MAZUR, P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. **Origin Life**, v. 10, p. 137-159, 1980.

MIKKELSEN, A.L.; HOST, E.; LINDENBERG, S. Incidence of apoptosis in granulosa cells from immature human follicles. **Reproduction**, v. 122, p. 481-486, 2001.

NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J.R.P.; PEGG, D.E.; FADDY, M.J.; GOSDEN, R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 376-380, 1998.

NUGENT, D.; MEIROW, D.; BROOK, P.F.; AUBARD, Y.; GOSDEN, R.G. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, v. 3, p. 267-80, 1997.

OKTAY, K.; KAN, M.T.; ROSENWAKS, Z. Recent progress in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **Current Opinon in Obstetetrics & Gynecology**, v. 13, p. 263-268, 2001.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUBARD, Y. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging thecnology? **Fertility and Sterility**, v. 354, p.1-7, 1998.

PAYNTER, S.J.; COOPER, A.; FULLER, B.; 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.

PEGG, D.E.; JACOBSEN, I.A.; ARMITAGE, W.J.; TAYLON M.J. Mechanisms of Cryoinjury in organs. *In: Organ Preservation II*, Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 137-146, 1974.

PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, p. 5-13, 2002.

PEDERSEN, H.G, WATSON, E.D, TELFER, E.E. Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. **Reproduction**, v. 125, p. 417–423, 2003.

PETRUNKINA, A. M. Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology. **Journal Reproduction Medicine Endocrinology**, v. 2, p. 78-91, 2007.

QU, J.; GODIN, P.A.; NIZOLLE, M.; DONNEZ, J. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 15, p. 302-310, 2000.

RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v. 24, p. 387- 402, 1987.

RAND-LUBY, L.; POMMIER, R.F.; WILLIAMS, S.T. Improved outcome of surgical flap treated with topical dimethylsulfoxide. **Annual Surgery**, v. 224, p. 583-590, 1996.

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

RODRIGUES, A.P.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M., NUNES, J.F.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation and short term culture of isolated caprine primordial follicles. **Journal Small Ruminants Research**, v. 56, p. 103-111, 2005.

ROSE, R.J. e HODGSON, D.R. **Manual of Equine Practice**. Philadelphia: Saunders. 532p., 1993.

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; BERTHOLLET, C.; LORNAGE, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 172-177, 2003.

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; RUDIGOZ, R.C.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, v.77, p. 403-408, 2002.

SALLE, B.; LORNAGE, J.A., DEMIRCI, B.; VAUDOYER, F.; POIREL, M.T.; FRANCK, M. RIDIGOZ, R.C.; GUERIN, J.F. Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing and autograft of a hemi-ovary in sheep. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 366-370,1999.

SANTOS, I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SANTOS, R. R. Criopreservação de folículos pré-antrais ovinos. Universidade Estadual do Ceará. **Tese de Doutorado**. 182 p, 2005.

SANTOS, R. R.; KNIJN, H. M.; VOS PLAM, OEI CHY, VAN LOON T, COLENBRANDER B, et al. (2008) Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, auto-transplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility** [epub ahead of print]

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; SILVA, J.R.V.; MATOS, M.H.T.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N., VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249-263, 2006.

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.

SANTOS, R. R.; VAN HAEFTEN, T.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; COLENBRANDER, B. GADELLA, B. M.; et al (2008) Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles. **Cell Tissue Research** [Epub ahead of print]

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recherche Médecine Vétérinaire** v. 157, p. 29-38, 1991.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W.J.; VANDERSTCHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.48, p. 471-483, 1997.

SHAW, J.M.; COX, S.L.; TROUNSON, A.O.; JENKIN, G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 161, p. 103-110, 2000.

SILVA, J. R.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. ; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. et al. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. **Journal Endocrinology**, v. 1889, p. 113-25, 2006.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 6, p. 1691-1704, 2004.

SMITH, J.G.; LIU, X.; KAUFHOLD, R.M.; CLAIR, J.; CAULFIELD, M.J. Development and validation of a gamma interferon elispot assay for quantization of cellular immune responses to varicella-zoster virus, **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 18, p. 871-879, 2001.

STACHECKI, J.J. e COHEN, J. Symposium: cryopreservation and assisted human conception. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, p. 152-163, 2004.

STEPONKUS, P.L. & WEBB, M.S. Freeze induced dehydration and membrane destabilization in plants. *In: Water and Life: Comparative Analysis of Water Realationship at the Organismic, Cellular and Molecular Levels*, Springer: Berlin, p. 338-362, 1992.

SUGIMOTO, M.; MIYAMOTO, H.; KABASAWA, T.; MANABE, N. Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification. **CryoLetters**, v. 17, p. 93-98, 1996.

SUH, C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 3, p. 5-12, 2002.

TAYLON, M.J. e BUSZA, A.L. A convenient, non-invasive method for measuring the kinetics of permeation of dimethyl sulphoxide into isolated corneas using nmr spectroscopy. **Cryoletters**, v.13, p.273-282, 1992.

TILLY, J.L. e TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 136, p. 242-252, 1995.

VAN DEN HURK, R. e ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p. 1717-1751, 2005.

WHITTINGHAM, D.G. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 89-94, 1977.

## **ANEXO**

## ANEXO A - MATERIAL E MÉTODOS

### ANEXO AA - Origem e preparação do tecido ovariano

Foram utilizados ovários (n=8) de cabras adultas, sem raça definida, oriundos de abatedouro local. Uma vez coletados, os ovários foram removidos do tecido adjacente e lavados uma vez em álcool 70% e duas vezes em meio essencial mínimo (MEM) (Sigma) suplementado com HEPES (Sigma), constituindo o MEM<sup>+</sup>. Em seguida, foram colocados em tubos contendo 20 mL de MEM<sup>+</sup> acrescido de 200µl de penicilina e 200µl de estreptomicina e transportados, dentro de uma hora, ao laboratório a 20°C em recipiente térmico com água.

### ANEXO AB - Exposição e perfusão do tecido ovariano utilizando DMSO

No laboratório, os pares ovarianos provenientes de cada animal foram divididos em 25 fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm, sendo um fragmento (controle) imediatamente fixado em 4% paraformaldeído em PBS por 12 horas à temperatura ambiente e destinado à análise histológica e teste de TUNEL. Os 24 fragmentos restantes foram então expostos ao DMSO (Vetec, Rio de Janeiro – Brasil) nas concentrações de 1,0 M, 1,5 M ou 2,0 M nos tempos de 10, 20, 30 ou 40 minutos (dois fragmentos para cada tratamento) (Figura 2). Para exposição, os fragmentos foram colocados em microtubos contendo 1,8 mL de solução composta por MEM<sup>+</sup> suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e DMSO, nas concentrações de 1,0M, 1,5 M ou 2,0 M, sendo mantidos a 20°C por 10, 20, 30 ou 40 min. Após o término de cada período de exposição, um fragmento foi submetido a três lavagens de cinco minutos cada, em MEM<sup>+</sup> para remoção do crioprotetor e então fixados conforme descrito acima para o controle, os quais foram, posteriormente, utilizados para histologia clássica (HC) e TUNEL. O fragmento restante, oriundo de cada tratamento, foi destinado ao protocolo da análise por CLAE, modificado de Carpenter e Dawson (1990). Para tanto, fragmentos ovarianos foram levemente enxutos em papel toalha após exposição ao DMSO, pesados em balança de precisão e colocados em tubos de 50 mL em uma solução de metanol 10% (1:100). Após seis horas, o fragmento foi retirado e a solução foi refrigerada até sua análise.

#### ANEXO AC - Processamento e análise histológica do tecido ovariano

O tecido ovariano, tanto do controle como dos tratamentos destinados à HC após a fixação, foram desidratados, diafanizados e inclusos em parafina. Secções seriadas de 7 µm de espessura foram obtidas e então montadas em lâminas e coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS) – Hematoxilina. Todas as secções foram examinadas utilizando um microscópio óptico (Leica) no aumento de 400 x, e um número mínimo de 120 FOPA, ou seja, oócitos circundados por uma ou mais camadas de células da granulosa que não apresentavam cavidade antral, foram avaliados em cada tratamento. No tocante ao aspecto morfológico, a classificação dos FOPA foi baseada na integridade do oócito, das células da granulosa e da membrana basal, sendo os folículos classificados como morfolologicamente normais (folículos contendo oócito e células da granulosa intactas), ou degenerados (folículos apresentando retração citoplasmática e/ou núcleo do oócito picnótico, bem como desorganização das células da granulosa e destacamento da membrana basal). Apenas os folículos que apresentavam o núcleo do oócito visível foram analisados, a fim de evitar a contagem do mesmo folículo em secções diferentes.

#### ANEXO AD - Análise por HPLC

As análises foram realizadas empregando-se aparelho de cromatografia líquida Gilson 321 equipado com detector ultravioleta UV/Vis-152 Gilson e programa controlador unipoint 3.0. Utilizou-se pré-coluna Hichrom-5 C18-10C acoplada a coluna Hichrom-5 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, “*end capped*”), injetor manual Rheodine® com volume de 20 µL (“*loop*”), fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e detecção em 214 nm. Empregou-se como fase móvel a mistura água/metanol (9:1). Todas as amostras foram filtradas antes da injeção utilizando-se membranas de náilon de 0,45 µm (13 mm, MFS). O tempo de retenção obtido para o DMSO nas condições descritas foi de 3,4 min.

Para a obtenção da curva de calibração, as soluções padrões de dimetilsulfóxido (0,0; 0,00305; 0,01218; 0,04875; 0,19500 e 0,78000 mg/mL) foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1,56 mg/mL por diluição serial em fase móvel. Todas as soluções padrões

foram analisadas em triplicata. A análise de variância dos dados (ANOVA) obtidos para a curva de calibração resultou na **Equação 1** da curva de regressão (onde  $C$  = concentração e  $A$  = área do sinal). A resposta da curva padrão produzida foi linear com coeficiente de correlação  $R^2 = 0,99985$ .

$$C = -0,0020534 + 1,41045 \times 10^{-7} \cdot A \quad \text{Equação 1}$$

Através dos valores obtidos para a curva de calibração foi possível calcular o limite de detecção (LD) de 0,012 mg/mL e o limite de quantificação (LQ) de 0,03647 mg/mL para o DMSO nas condições analíticas disponíveis.

Para a obtenção dos níveis teciduais, a concentração obtida através da equação 1 foi multiplicada pelo volume de metanol 10% utilizado na extração do DMSO do fragmento.

ANEXO AE - Detecção da apoptose: Teste de TUNEL (terminal deoxynucleotidil transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling)

Para detecção do processo de apoptose, os fragmentos após exposição e criopreservação foram fixados e inclusos em parafina, conforme descrito anteriormente para HC. Em seguida, os fragmentos foram seccionados seriadamente à espessura de 5  $\mu\text{m}$  e montados em lâminas, diafinizados, reidratados e lavados 2 vezes em PBS, com intervalo de 3 minutos para cada banho. Posteriormente, as lâminas foram incubadas por uma hora em câmara úmida a uma temperatura de 37°C, com a solução marcadora (In situ cell death detection kit - POD, Alemanha). Ao término do tempo de incubação, as lâminas foram novamente lavadas em PBS, e colocadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos com Converter-POD. Passado este período, foi realizada uma lavagem em PBS seguida por incubação com DAB por 5 minutos à temperatura ambiente. Por fim, os fragmentos foram corados com hematoxilina e as lâminas foram examinadas utilizando um microscópio óptico (Leica) no aumento de 400x.

ANEXO AF - Congelamento/descongelamento

Para a congelação, foram utilizados sete fragmentos ovarianos de 3x3x1. Um fragmento, escolhido aleatoriamente, foi imediatamente destinado ao isolamento mecânico folicular por *tissue chopper* e análise da viabilidade (controle fresco) conforme descrito posteriormente. Os demais fragmentos foram colocados em macrotubos (2,0 mL) e expostos a 20°C ao DMSO nas concentrações de 1,0 M, 1,5 M e 2,0 M por 10 e 20 minutos, baseado nos melhores resultados obtidos após exposição. Após o período de exposição, os macrotubos contendo os fragmentos foram transferidos para um freezer programável biológico (Freeze control, Cryobiologic Pty. Ltd., Warverley, Austrália) a 20° C. Os fragmentos foram resfriados a uma taxa de 2° C por minuto até - 7° C e a formação de cristal de gelo (*seeding*) foi induzida manualmente por meio do toque dos macrotubos com um fórceps pré-resfriado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L). As amostras permaneceram nesta temperatura (-7°C) por 15 minutos e, então, foram resfriados a uma taxa de 0.3° C/ min até - 40°C e em seguida a uma taxa de 10° C /minuto até - 70° C. Posteriormente, os macrotubos foram mergulhados diretamente em N<sub>2</sub>L (-196°C) e estocados por uma semana antes da descongelação. Para a descongelação, os macrotubos foram retirados do N<sub>2</sub>L e, expostos à temperatura ambiente por 1 minuto sendo, em seguida, imersos em banho-maria à 37 °C até sua completa descongelação. O crioprotetor foi, então, removido através de 3 lavagens de 5 minutos cada, em MEM<sup>+</sup> suplementado com 10% SFB a temperatura ambiente. Finalmente, os fragmentos ovarianos foram destinados ao isolamento mecânico e análise da viabilidade.

#### ANEXO AG - Isolamento e análise da viabilidade

Os FOPA foram isolados de acordo com Lucci *et al.* (1999). Resumidamente, o tecido ovariano foi cortado em pequenos fragmentos utilizando o *tissue chopper* (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) ajustado para secções seriadas de 75 µm. Os fragmentos ovarianos foram colocados em MEM<sup>+</sup> acrescido de 10% SFB e dissociados mecanicamente com pipetas Pasteur. A suspensão obtida foi filtrada sucessivamente em malhas de 500 e 100 µm e uma alíquota de 100 µL contendo os FOPA frescos (não congelados - controle), bem como aqueles utilizados no processo de criopreservação foi adicionada a 5 µl de solução azul de trypan 0,4%. Após um minuto, a alíquota contendo os folículos isolados foi analisada sob um microscópio invertido e um total de 840 folículos foi

avaliado (120 por tratamento), e classificados como viáveis (não corados) ou não viáveis (corados).

#### ANEXO AH - Análise estatística

Após ANOVA a comparação das percentagens de folículos morfológicamente normais em relação ao controle foi realizada utilizando o teste de Dunnett. Para a análise do efeito da concentração e do tempo de exposição, foi realizado teste *t*. A correlação entre os FOPA normais e quantidade de DMSO encontrada no fragmento ovariano foi verificada pelo teste de Pearson. Os valores foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .