



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE
FACULDADE DE VETERINÁRIA - FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGCV

Ana Kelen Felipe Lima

**Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de
oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata
doméstica.**

**Fortaleza - Ceará
Dezembro de 2006**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE

Ana Kelen Felipe Lima

Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva

Fortaleza - Ceará

Dezembro de 2006

L237c Lima, Ana Kelen Felipe

Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica/Ana Kelen Felipe Lima - Fortaleza, 2006

75 p.

Orientadora: Profa. Dra.Lúcia Daniel Machado da Silva

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Gata doméstica 2. Criopreservação 3. Folículos pré-antrais

I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD: 636.3

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE
FACULDADE DE VETERINÁRIA - FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGCV

**Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de
oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata
doméstica.**

Autora: Ana Kelen Felipe Lima

Conceito obtido:

Nota obtida:

Aprovada em: 11/12/2006

Banca Examinadora

Profa. Dra Lúcia Daniel Machado da Silva.

Orientadora

Prof. Dr. José Ricardo Figueiredo
Co-orientador/examinador (UECE)

Dr. Ronaldo G. Morato
Co-orientador/examinador
(CENAP/Pró-Carnívoros)

Prof. Dr. Marcos Renato F. Mattos
Examinador (UFRPE)

Prof. Dr. Cláudio Cabral Campelo
Examinador (UECE)

*Dedico às minhas duas famílias: meus pais
e meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que iluminou e indicou o melhor caminho nos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha família, em especial meu pai Nilo Pereira Lima e minha mãe Maria Horaciana Felipe Lima por todo incentivo, sacrifício e dedicação. Aos meus irmãos Ana Karla Felipe Lima e João Virgílio Felipe Lima pelo apoio. E à minha prima-irmã Anna Marya Felipe Lacerda por todas as vezes que precisei de uma palavra de conforto.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Dr^a. Lúcia Daniel Machado da Silva, exemplo de dedicação e profissionalismo, porém sem perder a ternura. Agradeço por ter acreditado em mim e me concedido a oportunidade de trabalhar no LRC, onde reconheci uma nova família. As palavras são poucas para expressar todo meu agradecimento e admiração.

Ao Dr. Ronaldo Gonçalves Morato pelo incentivo e apoio. Em todas as vezes que algo dava errado durante os experimentos, era no objetivo final que eu buscava força pra começar de novo.

A amiga e companheira de trabalho “Madre Teresa de Calcutá” Ticiania Franco – sem a qual a execução desse trabalho teria se tornado impossível. Pela amizade, carinho e por ter assumido a fila do SUS em grande parte deste trabalho.

As estudantes de Iniciação Científica Andréia Farias e Daniele Manguiera, pelas incontáveis e prazerosas horas de trabalho; e a Cristina Vidal e Fabrícia Freitas, pela contribuição em parte do trabalho.

Aos “agregados” Carlos Headman, em nome do qual agradeço a toda equipe cirúrgica itinerante, e Ana Paula Domingos, que me mostrou que a pesquisa em silvestres e para silvestres é possível.

Aos amigos integrantes do LRC: Daniel Uchôa, Alexandre Rodrigues, Rita de Cássia Cardoso, Claudia da Cunha Barbosa, Gabriel Dias, Iran Águila, Janaina de Fátima Cardoso, pelo apoio e amizade. Aos estudantes de Iniciação Científica e estagiários Henna “Rodela” Quinto, Ângela Cristina de Oliveira, Camila Louise Ackerman, Camila Milena, Maíra Ferraz, Daniele Oga, David Ferreira, Bethânia, Elisângela, Antonio Filho, Jerlan Freitas, Leonardo Tavernezzzi, Raimundo Diones Carneiro, Belarmino Eugênio Neto, Daniel Falcão de Menezes Brilhante, Ricardo Jucá, Francisco Thiago Pinheiro, Áurea Helena Rocha Lima pelos momentos de alegria durante o trabalho e fora dele também.

Ao Dr. Marcos Renato F. Mattos, pela boa vontade em ajudar, pelas críticas e sugestões de metodologia logo no início da realização dessa pesquisa.

Aos proprietários dos animais que participaram da fila do SUS.

Aos amigos integrantes do LABOVIR, Jean Berg, pelo auxílio e dedicação, a Aracely Ricarte, Suzana Araújo, Tânia Dantas, Teresa D’Ávila de Freitas Aguiar, Juliana Castelo Branco Mesquita, Esmale Sales e Aline Mesquita Miranda pela ajuda em algum momento.

Às amigas Michelline Maciel e Dayanne Medeiros, pela amizade e apoio sempre, pelos momentos de alegria, pelo computador, e por tudo mais, só tenho a agradecer.

Aos amigos Isaac Neto, Michele Costa, pelo apoio e compreensão durante esses anos, até o presente.

A Lis Christina de Oliveira e Sheyla Fahrayeldes, companheiras do início de pesquisa, até os dias de hoje. A distância não diminuiu nossa amizade.

Agradeço ao Dr. José Ricardo de Figueiredo, pela orientação e por ter disponibilizado o seu laboratório e sua equipe para a realização deste trabalho. A todos integrantes do LAMOFOPA, em especial a Cláudio A. P. Lopes, pela amizade

e dedicação, e pela contribuição imprescindível, e Regiane Rodrigues Santos pela amizade e contribuição fundamental para a realização desta pesquisa. Juliana Celestino, Erisvaldo, Karla, Franzé, Lívia Schell Wanderley, Mônica Aline, Janaina e Viviane pela amizade e apoio fundamentais. Fabrício S. Martins, Helena Matos e Isabel Lima Verde pelos ensinamentos e auxílio durante a execução desse trabalho.

Ao Dr. Cláudio Cabral Campello, pela gentileza de ter cedido o seu laboratório de histologia para realização de parte deste trabalho, e pela contribuição imprescindível na análise estatística.

A Dra. Sonia Nair Bão, e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, pela realização das análises ultra-estruturais, pela paciência e pelos ensinamentos. À equipe técnica da UnB: Carol Luque e Shélida Brás, pelo apoio e amizade. A Dra. Daniele Scandiucci e ao Dr. Jadson Santana de Sousa por me ajudarem a desvendar Brasília.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – FUNCAP, pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo, que sem dúvida foi imprescindível para a realização desta pesquisa.

Ao laboratório de Tecnologia do Sêmen pela concessão do congelador automático.

Ao Laboratório de Virologia (LABOVIR), e ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da UECE, e Instituto do Câncer pela contribuição para a realização da análise histológica.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE, que contribuíram para o meu crescimento profissional. E as secretárias do PPGCV, Alzenira, Adriana e Cristina pela presteza e atenção.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Depende de nós, se este mundo ainda tem jeito, apesar do que o homem tem feito, se a vida sobreviverá.”

Ivan Lins

RESUMO

Objetivou-se caracterizar a população folicular (PF) e desenvolver protocolos para conservação e cultivo de FPA de ovários de gata doméstica. Foram coletados 35 pares de ovários, onde 20 foram destinados ao estudo da PF e 15 destinados à criopreservação de FPA *in situ* ou isolados, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLI), etilenoglicol (EG) e propanodiol (PROH). A PF foi similar a de outros mamíferos, sendo constituída principalmente por folículos primordiais. Foram avaliados 900 FPA isolados, sendo observado 99,3% de FPA íntegros no grupo controle (GC). Após a exposição ao período de equilíbrio (PE), observaram-se 95,3%; 94% e 93,3% de FPA íntegros com MEM sem crioprotetor (MEM*), DMSO e PROH, respectivamente, não diferindo do GC. Apenas quando se utilizou o EG (91,3%) e o GLI (79,3%), houve redução no % de FPA isolados viáveis. Após a criopreservação, foram analisados 900 FPA isolados. No GC, 98,6% destes apresentavam-se viáveis após o isolamento. Esse % diminuiu após a criopreservação para 69,3%, 63,3%, 59,3% e 28,6%, quando se utilizou o EG, DMSO, PROH e GLI, respectivamente. Apenas 8,6% dos FPA permaneceram viáveis após a criopreservação com MEM*. Após o PE dos FPA *in situ*, e após a criopreservação, foram avaliados 1.800 FPA. O GC apresentou 97,3% de FPA normais. Após o PE, observou-se que o % de FPA normais não diferiu do GC, quando os fragmentos foram expostos ao DMSO, EG, PROP e ao MEM* (97,3%, 94,6%, 98% e 96,6%, respectivamente). Entretanto, a exposição ao GLI diminuiu o % de FPA normais (68%) após o PE. Estes resultados foram confirmados qualitativamente pela análise ultra-estrutural dos FPA, onde se observou a integridade folicular. Entretanto, sinais de degeneração foram observados após o PE utilizando GLI. Após a congelamento/descongelamento, houve uma redução da viabilidade folicular em todos os tratamentos, onde 60%, 55,3%, 47,3% e 39,3% apresentavam-se viáveis, quando criopreservados *in situ*, utilizando DMSO, EG, PROH e GLI, respectivamente. Apenas 26% dos FPA criopreservados com MEM* permaneceram viáveis. Após o cultivo *in situ*, foram avaliados 1.650 FPA. O GC apresentou 90% de FPA normais. Após avaliação de fragmentos de tecido fresco, cultivado por um dia (87%), verificou-se não haver diferença do GC. Entretanto, o cultivo após cinco dias (71%) reduziu o número de FPA normais. Após o PE e cultivo por um e cinco dias, observou-se que o percentual de FPA normais foi inferior ao GC. O cultivo de FPA criopreservados com EG (40%) durante cinco dias, reduziu o percentual de FPA normais, quando comparado com a % de FPA criopreservados com o DMSO (56%). Conclui-se que EG, DMSO e PROH são semelhantes e que o GLI reduz o % de FPA isolados íntegros durante o PE; a criopreservação de FPA isolados pode ser realizada utilizando EG, DMSO ou PROH; o DMSO e EG são semelhantes e o GLI reduz o percentual de FPA *in situ* normais durante o PE. FPA felinos *in situ* podem ser criopreservados utilizando o DMSO e o EG. O DMSO é o crioprotetor mais indicado para criopreservação de FPA felinos com posterior cultivo.

ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the follicular population (FP) and to develop protocols for conservation and culture of PAF domestic cat. Then, were collected 35 domestic cat ovaries, where 20 were used to the study of the FP and 15 to test a protocol of cryopreservation of PAF *in situ* or isolated, using dimetilsulfóxido (DMSO), glycerol (GLY), etilenoglicol (EG) and propanodiol (PROH). The FP was similar to other mammals, being constituted in greatly by primordial follicles. It was evaluated 900 isolated PAF, being observed 99.3% of normal PAF in the group control (GC). After the exposition to the balance period (BP), 95.3% were observed; 94% and 93.3% of normal PAF when MEM was used without cryoprotector (MEM*), DMSO, and PROH, respectively, have no difference between these treatments and the GC. Just when EG was used (91.3%) and GLY (79.3%), there was reduction in the % of viable PAF. After cryopreservation, 900 isolated PAF were analyzed. In the CG, 98.6% of these were viable after the isolation. That % decreased after cryopreservation to 69.3%, 63.3%, 59.3% and 28.6%, when EG, DMSO, PROH and GLY, were used, respectively. Only 8.6% of PAF remained viable after cryopreservation with MEM*. After the BP of PAF *in situ*, and after cryopreservation, it was evaluated 1800 PAF. The GC presented 97.3% of normal PAF. After BP, it was observed that the % of normal PAF didn't differ from the control, when the fragments were exposed to DMSO, EG, PROP and to MEM * (97.3%, 94.6%, 98% and 98%, respectively). However, the exposition to GLY reduced % of normal PAF (68%) after BP. These results were confirmed by the ultra-structural analysis of PAF where the integrity follicular. However, degeneration signs were observed after BP using GLY. After freezing and thawing, there was reduction viability follicular in all of the treatments, where 60%, 55.3%, 47.3% and 39.3% were viable, when frozen *in situ*, using DMSO, EG, PROH and GLY, respectively. Only 26% of the PAF frozen with MEM* remained viable. After the culture of PAF *in situ*, it was evaluated 1650 PAF. The GC presented 90% of normal PAF. After evaluation of fragments of fresh tissue, cultured for one day (87%), was verified there was no difference from the GC. However, the culture before five days (71%) it reduced the number of normal PAF. After the BP and culture for one and five days, was observed that the percentage of normal PAF was inferior to the GC. The culture of PAF frozen with EG (40%), for five days, reduced the % of normal PAF significantly, when compared with the % of PAF frozen with DMSO (56%). In conclusion, EG, DMSO and PROH are similar and GLY reduces % of intact PAF isolated during the BP; the cryopreservation of isolated PAF can be accomplished using EG, DMSO or PROH; DMSO and EG are similar and GLY reduces the % of normal PAF *situ* during the BP. Besides, felines PAF *in situ* can be frozen using DMSO and EG. DMSO is the best cryoprotector for feline PAF cryopreservation followed by culture.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	:Porcentagem
µg	:Microgramas
µL	:Microlitro
µm	:Micrômetro
BSA	:Albumina sérica bovina
CG	:Células da granulosa
CO ₂	:Dióxido de carbono
DMSO	:Dimetilsulfóxido
DNA	:Ácido desoxirribonucléico
EG	:Etilenoglicol
FPA	:Folículo Pré-Antral
GLI	:Glicerol
M	:Molar
m	:Mitocôndria
MEM	:Meio essencial mínimo
mg	:Miligrama
min.	:Minutos
mL	:Mililitro
Mm	:Milímetro
°C	:Graus Celsius
P<0.05	:Probabilidade menor do que 5%
P>0.05	:Probabilidade maior do que 5%
PAS	:Ácido periódico de Schiff
PBS	:Tampão fosfato salino
PROH	:Propanodiol
SFB	:Soro Fetal Bovino
x ²	:Qui-quadrado
ZP	:Zona pelúcida

SUMÁRIO

1. Introdução	01
2. Revisão de Literatura	02
2.1. Ovário Mamífero e os processos de Oogênese e Foliculogênese	02
2.1.1. Ovário	02
2.1.2. Oogênese	03
2.1.3. Foliculogênese	03
2.1.3.1. Papel dos fatores intra-ovarianos na foliculogênese	05
2.1.4. Classificação Folicular	06
2.1.5. População Folicular	07
2.1.6. Atresia folicular	08
2.1.6.1. Degeneração celular	08
2.1.6.2. Apoptose	09
2.2. Biotécnica Manipulação de Oócitos em Folículos Pré-Antrais	09
2.2.1. Isolamento folicular	10
2.2.1.1. Métodos mecânicos	10
2.2.1.2. Métodos enzimáticos	11
2.2.2. Cultivo <i>in vitro</i>	11
2.2.2.1. Cultivo de oócitos inclusos em FPA	11
2.2.2.2. Cultivo de oócitos inclusos em folículos antrais	12
2.2.2.3. Cultivo de tecido ovariano	13
2.2.3. Criopreservação	13
2.2.3.1. Crioprotetores	16
2.2.3.2. Descongelação	18
2.2.3.3. Eficiência dos protocolos de criopreservação	18
2.3. Importância da MOIFOPA	19
3. Justificativa	21
4. Hipótese Científica	23
5. Objetivos	24
5.1.1. Objetivo Geral	24
5.1.2. Objetivos Específicos	24

6. CAPÍTULO I: Determinação da população folicular ovariana de gata doméstica.	25
7. CAPÍTULO II: Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais isolados de gata doméstica	31
8. CAPÍTULO III: Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais <i>in situ</i> de gata doméstica	37
9. CAPÍTULO IV: Cultivo de folículos pré-antrais <i>in situ</i> criopreservados de gata doméstica	49
10. Conclusões Gerais	56
11. Perspectivas	57
12. Referências Bibliográficas	58
13. Anexos	69

1. Introdução

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais tem como objetivo final a produção *in vitro* de um grande número de embriões, os quais poderão ser utilizados em programas de multiplicação animal, no intuito de aperfeiçoar o seu potencial reprodutivo, bem como evitar o risco de extinção de algumas espécies. Nesse sentido, alguns procedimentos foram descritos, tais como a maturação (POPE *et al.*, 1997) e fertilização de oócitos *in vitro* (HOFFERT *et al.*, 1997; DONOGHUE *et al.*, 1990), além de tentativas de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (FULTON *et al.*, 1998) e transferência de embriões (TE - DONOGHUE *et al.*, 1990). O sucesso dessas biotécnicas, dentre outras, permitiria a devolução de populações inteiras de animais ameaçados de extinção à natureza, sendo necessário para isso um número reduzido de fêmeas, as quais serviriam como doadoras de ovário.

Sabe-se que, das 37 espécies de felídeos, apenas o gato doméstico não se encontra em risco de extinção. Desse modo, preconiza-se a utilização deste como modelo experimental, adaptando procedimentos desenvolvidos nesta espécie para as espécies selvagens, devido a sua proximidade filogenética com as mesmas (IUNC, 2006), já que não é possível usá-los diretamente em experimentos científicos (JEWGENOW & STOLTE, 1996).

Para uma melhor compreensão deste assunto, serão abordados, primeiramente, aspectos gerais relacionados ao ovário quanto à sua origem, ao crescimento e desenvolvimento dos FPA, população e atresia folicular; em um segundo momento, será enfocado o estado atual e as aplicações da manipulação oocitária, no que concerne aos procedimentos de isolamento, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em FPA felinos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Ovário mamífero e os processos de oogênese e foliculogênese

2.1.1. Ovário

O ovário é considerado o órgão reprodutivo primário da fêmea. É assim chamado por realizar duas funções primordiais: (1) formar a célula germinativa feminina e (2) produzir os hormônios sexuais e diferentes peptídeos. É formado por duas regiões: a medular e a cortical. A região medular contém nervos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo de conformação firme. A matriz extracelular apresenta vários constituintes, entre os quais a elastina, a laminina, a fibronectina e o colágeno, sendo este largamente distribuído nesse tecido. O colágeno é metabolicamente estável, ou seja, tem uma vida média longa, mas, sob determinadas condições fisiológicas e patológicas, é degradado enzimaticamente, como, por exemplo, no útero pós-parto ou em processos de cicatrização (KARLSON *et al.*, 1982). A região cortical contém as células germinativas também denominadas oócitos e esses, por sua vez, estão inclusos nos folículos ovarianos. Na superfície do ovário, existe uma fina camada de tecido epitelial, originalmente chamada de epitélio germinativo, pois se acreditava, erroneamente, que dali se originavam as células germinativas femininas (BEARDEN & FUQUAY, 1997).

A *rete ovarii* na gata doméstica aparece como um ramo dos túbulos mesonéfricos no início do hilo e é extensamente separada por túbulos preenchidos por epitélio colunar ou cubóide escasso, na medula. Os túbulos da *rete ovarii* contendo epitélio colunar-cuboidal, com lúmen distinto, foram observados durante os estágios iniciais do desenvolvimento fetal da gata, e posteriormente esse epitélio se torna mais plano. Na gata, foi observado que a membrana ao redor da oogônia era contínua com a superfície do epitélio ovariano (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais). A função do folículo é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, crescimento e maturação do oócito (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

2.1.2. Oogênese

A oogênese pode ser definida como o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais das fêmeas, culminando com a formação do oócito haplóide fecundado (RUSSE, 1983). Nos mamíferos a oogênese tem início durante a vida fetal e desenvolve-se por meses a anos nos animais adultos (WASSARMAN, 1988).

Em mamíferos, o desenvolvimento ovariano inicia-se com as células germinativas primordiais, originadas do saco vitelínico, que migram e invadem a gônada embrionária. A célula germinativa primordial coloniza a gônada primitiva, perde sua motilidade e inicia a gametogênese. A formação do oócito primário tem início durante um período bem definido na gata doméstica, ocorrendo aproximadamente 40-50 dias do desenvolvimento fetal e possivelmente completa-se 8 dias após o nascimento. A morfologia ovariana típica, com região cortical e medular primitiva é totalmente estabelecida em torno de 40 dias de desenvolvimento fetal - 75 mm de comprimento cabeça-cauda (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

2.1.3. Foliculogênese

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório. Esse processo é contínuo, com saída diária de folículos do *pool* de reserva, os quais crescem, regridem em sua maioria, similarmente às mudanças que ocorrem para o corpo lúteo, estando desse modo o conteúdo ovariano em constante modificação (HAFEZ, 1995).

Ao final da multiplicação mitótica da oogônia, uma camada de células somáticas circunda o oócito primário, formando o folículo primordial. Esses folículos precisam ser ativados para ter início a fase de crescimento (RUSSE, 1983). Gradualmente, as células da granulosa do folículo primordial tornam-se cúbicas, caracterizando um folículo intermediário (BEZERRA *et al.*, 1998) e, posteriormente um folículo primário, quando este passa a ser circundado apenas por células cúbicas dispostas em uma única camada (VAN DEN HURCK *et al.*, 1997). A partir desse momento, ocorre o aumento contínuo do oócito e a proliferação das células da granulosa, que passam a se dispor em camadas concêntricas ao redor do oócito, formando o folículo secundário. Durante o crescimento dos folículos pré-antrais,

observa-se a diferenciação das células teçais, a formação e o espessamento da zona pelúcida, principalmente nos folículos secundários (HIRSHFIELD, 1988). A expressão de receptores específicos para estrógeno, progesterona e testosterona ocorre entre o estágio de desenvolvimento do folículo secundário terminal e terciário inicial. A fase antral da foliculogênese tem início com a formação de uma cavidade nos folículos terciários e culmina com a formação do folículo maduro ou de De Graaf (BEARDEN & FUQUAY, 1997).

Em gatas, durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, ocorrendo crescimento oocitário e diferenciação das células que o circundam. Na gata, esse processo inicia-se durante a segunda ou terceira semana do desenvolvimento fetal. Foi observado que os folículos ovarianos de gatas se assemelham morfológicamente àqueles encontrados em outras espécies mamíferos (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

Quanto ao desenvolvimento folicular, este pode ser dividido em três fases: recrutamento, seleção e dominância. O recrutamento parece ocorrer em decorrência de um pique de hormônio folículo estimulante (FSH), a partir do qual um grupo de folículos inicia seu desenvolvimento, determinando o surgimento de uma onda folicular (FORTUNE, 1994). Entretanto, dentre os folículos recrutados, apenas um número específico de folículos para cada espécie é selecionado a crescer. Isso se deve a fatores extra e intra-ovarianos, como o ambiente hormonal, a presença de receptores específicos, a nutrição e a ação de fatores de crescimento. Os folículos selecionados a crescer até o tamanho pré-ovulatório são denominados "dominantes". As células da granulosa desses folículos produzem a inibina, que age aumentando a síntese de estrógeno e, através de um mecanismo de *feedback* negativo do estrógeno e da inibina sobre a hipófise, causando um decréscimo na produção do FSH, impedindo o crescimento dos folículos considerados subordinados, ou seja, aqueles com menos receptores para este hormônio. Finalmente, o folículo dominante da última onda folicular atinge o tamanho pré-ovulatório e, através da ação sinérgica do FSH com o hormônio luteinizante (LH), ocorre a liberação do oócito (HAFEZ, 1995).

De acordo com FORTUNE (1994), alguns folículos ovarianos primordiais desenvolvem-se durante a vida fetal em ruminantes e primatas, e na fase neonatal precoce em roedores e em coelhos. Não se sabe se a gata doméstica possui células indiferenciadas após o nascimento ou se o número de folículos é estabelecido ao nascimento (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

2.1.3.1. Papel dos Fatores Intra-Ovarianos na Foliculogênese

O papel do fator de crescimento transformador β (TGF- β) foi investigado utilizando imunohistoquímica e imunofluorescência. Foram determinadas a localização das subunidades proteicas da inibina, ativina, fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), receptores da ativina, do TGF- β , proteína receptora morfogênica do ossos e sinalizadores moleculares como o Smad3.

A co-localização dessas proteínas em folículos específicos pode levar ao melhor entendimento dos sinais usados por células ativas e quiescentes dos folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso essas informações podem ser usadas para aperfeiçoar métodos de maturação de folículos de gatas *in vitro*, contribuindo com os programas de conservação de felinos em risco de extinção (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

Foi encontrado que as subunidades α A e α B da ativina foram produzidas coincidentemente com os receptores da ativina actRIB e actRIIB em pequenos folículos. O sinalizador molecular Smad3 foi localizado no núcleo desses folículos, uma indicação de que esses sinais estavam ativos. Então, constatou-se que todos os componentes necessários para um completo sinal de ativação estão presentes em folículos primordiais, primários e secundários. Em uma grande população folicular, a subunidade α da inibina, TGF- α I e seu receptor tipo II (TGF- α RII) e o sinalizador molecular Smad3 também estavam presentes, indicando o papel dominante do TGF- α e da inibina. Em gatas, foi confirmado que a ativina age nos pequenos folículos, entretanto a sinalização da inibina ocorre em toda população folicular. Em estágios intermediários, o TGF- α pode exercer sua ação mais notavelmente nos grandes folículos, já que não foram encontrados receptores do tipo II nos pequenos folículos (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

O fator de crescimento epidermal (EGF) e seus receptores também desempenham um importante papel na foliculogênese felina. O EGF foi localizado nas células da teca interna, células de glândulas intersticiais e corpo lúteo. Receptores do EGF foram encontrados na célula da granulosa de folículos primários, secundários e terciários e em células das glândulas intersticiais. Durante a fase de crescimento, o EGF pode estimular a proliferação de células da granulosa, enquanto que em folículos antrais o EGF regula a diferenciação das células da granulosa e a maturação oocitária. Entretanto, estudos mais detalhados são necessários para definir mais especificamente o papel crucial desses hormônios e os fatores de crescimento locais na foliculogênese de felinos (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006).

2.1.4. Classificação folicular

Segundo ERICKSON (1966), há três tipos básicos de folículos: (1) primordial, constituído por um oócito circundado por uma camada de células da granulosa; (2) em crescimento, constituído por um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa, mas sem vesícula formada e (3) vesicular, onde há presença de antro. Os folículos primordiais e em crescimento compõem a categoria dos folículos pré-antrais (FPA) e os folículos vesiculares estão na categoria dos folículos antrais ou cavitários. HULSHOF *et al.* (1994) fazem distinção entre folículos primordiais e primários, e afirmam que embora não se possa diferenciá-los pelo seu diâmetro, é possível fazê-lo por outras características morfológicas. Assim, nos folículos primordiais, o oócito é circundado por uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa, enquanto que nos folículos primários, as células da granulosa são cúbicas. Quanto aos folículos secundários, estes podem ser caracterizados por possuírem várias camadas de células da granulosa cúbicas em torno do oócito (HULSHOF *et al.*, 1994). Os folículos terciários e o folículo maduro ou de De Graaf caracterizam-se pela presença do antro folicular, camadas tecais e zona pelúcida completamente desenvolvida. O grau de maturação e a capacidade de resposta ao ambiente hormonal em que se encontra são os fatores determinantes da categoria à que pertence o folículo em questão.

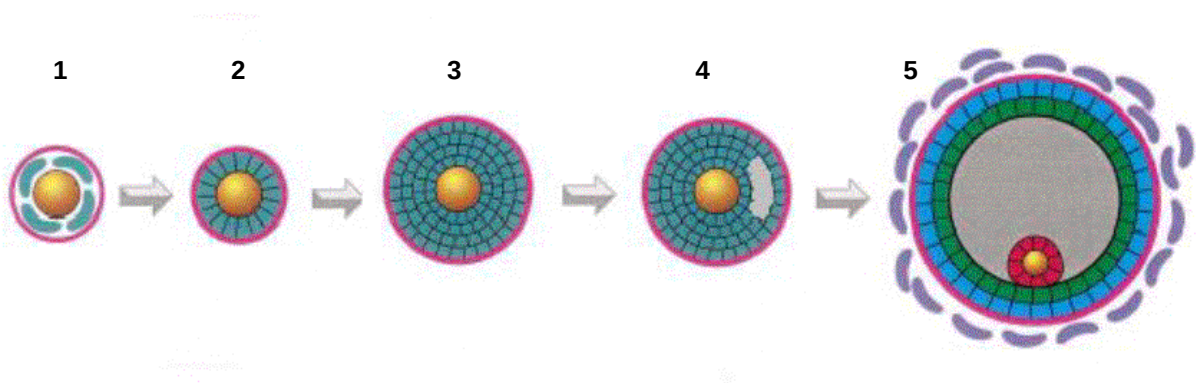


FIGURA 01. Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1. Folículo Primordial; 2. Folículo Primário; 3. Folículo Secundário; 4. Folículo Terciário; 5. Pré-ovulatório.

Fonte: RODGERS *et al.* 1999.

2.1.5. População folicular

Muitos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de estimar a população folicular ovariana em diversas espécies mamíferas. Nesses estudos, tem-se constatado que a população folicular ovariana sofre grande variação individual. Em bovinos, o número de folículos presentes no ovário pode variar de zero (animal estéril) a 700.000, com uma média de 130.000 folículos por ovário (ERICKSON, 1966). Em mulheres, estimou-se que, ao nascimento, existem aproximadamente 2 milhões de FPA por ovário (BAKER, 1966). GOUGEON & CHAINY (1987) mostraram que a população de FPA na mulher varia de 79.600 a 27.000, entre as idades de 19 a 46 anos, e conforme a idade aumenta, diminui a proporção de folículos primordiais (LINTERN-MOORE *et al.*, 1974). Em macacas rhesus, BAKER (1966) estima que, ao nascimento, existe uma média de 910.000 folículos por ovário. MILLER *et al.* (1999) demonstraram que, em fêmeas de *Macaca nemestrina* (*Pig tailed monkey*), o número de folículos pré-antrais varia de 9.940 a 30.900, em animais com a idade variando de 0,85 a 12,50 anos. Já em macaco-prego (*Cebus apella*), a população foi estimada em torno de 56.000 folículos por ovário (DOMINGUES, 2000). A população folicular também foi estimada em aproximadamente 180.000 folículos em ovinos (CAHILL *et al.*, 1979) e 35.000 em caprinos (LUCCI *et al.*, 1999).

Todos os autores citados demonstraram que ocorre uma grande variação no número de folículos estimados. Diversos fatores que podem afetar quantitativamente a população folicular ovariana têm sido descritos, como por exemplo, a idade (PETERS, 1976), a raça (CAHILL *et al.*, 1979; DRIANCOURT *et al.*, 1985), o estágio reprodutivo (ERICKSON *et al.*, 1976), a nutrição (SCARAMUZZI *et al.*, 1993) e fatores genéticos (ERICKSON *et al.*, 1966a e b; CAHILL *et al.*, 1979). Em ruminantes, cerca de 90% da população ovariana é constituída por FPA (SAUMANDE, 1991), sendo estes os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (GUILBAULT *et al.*, 1986).

Entretanto, até o momento, não existem relatos de estudos referentes à população ovariana em felinos domésticos e selvagens. Na espécie felina, existem alguns relatos de isolamento (JEWGENOW & PITRA, 1993; JEWGENOW & STOLTE, 1996; LIMA *et al.*, 2003) e cultivo de oócitos inclusos em FPA (POPE *et al.*, 1997; JEWGENOW & PITRA, 1993). O conhecimento de alguns aspectos relacionados à estrutura folicular no interior do ovário da gata doméstica contribuirá para uma melhor aplicação de algumas biotécnicas reprodutivas em desenvolvimento, dentre as quais podemos citar a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

Uma vez iniciado o crescimento folicular, este pode tomar dois caminhos distintos: o desenvolvimento até a ovulação, evento bastante raro (IRELAND, 1987), ou a morte folicular por atresia (ERICKSON, 1986), podendo esta ocorrer com maior frequência, em qualquer fase do crescimento folicular, em todas as espécies domésticas (IRELAND, 1987; FORTUNE, 1994). Entretanto, acredita-se que os folículos antrais sejam os mais afetados (LUSSIEUR *et al.*, 1987).

2.1.6. Atresia folicular

A atresia ou morte folicular é um fenômeno fisiológico que pode ocorrer por degeneração celular (SAUMANDE, 1991) ou por apoptose (IRELAND, 1987). Ela é o destino da maioria dos folículos. Em humanos, a atresia de folículos menores que 1 mm de diâmetro é caracterizada por uma ruptura inicial do oócito, seguida por retração das células da granulosa e hipertrofia das células tecaais (GOUGEON & LEFEVRE, 1983). Em grandes folículos, a atresia pode ser visualizada pela presença de corpos picnóticos (material nuclear condensado), cujo número determina o estágio de atresia. O último estágio da atresia é a invasão da cavidade folicular por fibroblastos e a reorganização do tecido intersticial. O oócito degenerado e a zona pelúcida (ou ambos) são as últimas estruturas que podem ser visualizadas num folículo em estágio avançado de atresia. Vários fatores podem influenciar no processo de atresia, como idade da fêmea, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, ambiente hormonal, nutrição e isquemia do ovário (IRELAND, 1987). A influência de agentes infecciosos na atresia ainda não está bem esclarecida, apesar de alguns vírus, terem capacidade de infectar células da granulosa *in vitro* (LAMARA *et al.*, 2001).

2.1.6.1. Degeneração celular

A degeneração é uma morte celular passiva, que ocorre após uma agressão com dano severo das membranas, induzida por fatores externos, como a ação degradativa progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesada, de maneira que ocorre uma degradação progressiva, com ativação da resposta imunológica. As alterações nucleares aparecem sob três padrões distintos. Primeiro ocorre diminuição da basofilia da cromatina (cariólise), uma alteração que supostamente se reflete na atividade da DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e aumento da basofilia, quando o DNA aparentemente se condensa em uma massa sólida e basofílica. No terceiro padrão, conhecido como cariorrexe, o núcleo picnótico ou parcialmente picnótico sofre fragmentação.

Com o tempo (um dia ou dois), o núcleo na célula necrótica desaparece totalmente (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1993).

2.1.6.2. Apoptose

A apoptose é um processo ativo que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos, nos quais a célula participa de sua própria destruição, seguindo passos pré-determinados. Esse processo é controlado geneticamente e remove células danificadas, que expressam modificações em seu código genético, evitando assim a transmissão de erros, culminando com a fragmentação e fagocitose dos restos celulares, sem ocasionar uma resposta inflamatória (KERR *et al.*, 1972). Os macrófagos reconhecem a célula apoptótica pelo aparecimento de modificações na superfície externa da bicamada lipídica da membrana, como por exemplo, alterações em sua simetria ou a exposição da fosfatidilserina (HOORNAERT *et al.*, 1997) e por modificações nos carboidratos da superfície celular, que seriam reconhecidos a partir de moléculas similares à lectinas, presentes na superfície externa dos macrófagos (DUVALL *et al.*, 1985).

2.2. Biotécnica de Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA)

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica que surgiu como uma via alternativa para o desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas, tais como a produção *in vitro* de embriões (PIV), a clonagem e a transgênia, no intuito de resgatar os FPA, antes que estes se tornem atrésicos. A MOIFOPA compreende três fases: o resgate de FPA, a conservação dos mesmos através do resfriamento e/ou criopreservação, e o cultivo *in vitro* até o estágio de maturação folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 1999), pertencendo ao grupo das biotécnicas fundamentais ligadas à reprodução, que se encontram em franco desenvolvimento.

No sentido de evitar a perda de um grande número de folículos pelo processo de atresia e resgatar oócitos viáveis, aptos à fertilização, surgiu a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

2.2.1. Isolamento folicular

UMA DAS ETAPAS DA MO IFOPA É O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE OBTENÇÃO FOLICULAR, EMPREGANDO PROCEDIMENTOS MECÂNICOS E ENZIMÁTICOS.

2.2.1.1. Métodos mecânicos

Na literatura, alguns procedimentos mecânicos têm sido citados em algumas espécies de felinos (Quadro 1). Folículos secundários foram isolados utilizando-se agulhas dissecantes e filtros de nylon para dissociação tecidual (JEWGENOW & PITRA, 1993). Em 1995, JEWGENOW & GÖRITZ demonstraram que o isolamento de FPA originados de gatos domésticos é possível utilizando dissociação dos ovários. Mais recentemente, LIMA et al (2003) isolaram em torno de 590 FPA por ovário, utilizando um fragmentador de tecido (*tissue chopper*) associado a filtros de nylon.

Quadro 1. Procedimentos mecânicos utilizados em ovários felinos.

Ano	Espécie	Instrumento(s)	Média de folículos isolados por ovário	Autor
1993	Gato doméstico	Dissecção + filtro	500	JEWGENOW & PITRA
1995	Gato doméstico	Dissociação	-	JEWGENOW & GÖRITZ
1996	Guepardo	Dissecção + filtro	1867	JEWGENOW & STOLTE
1998	Gato doméstico	Dissecção + filtro	1500	JEWGENOW & FICKEL
2003	Gato doméstico	Tissue chopper + filtro	590	LIMA et al.

A recuperação folicular pode ser realizada *post mortem* ou depois de uma ovariectomia, os quais podem ser recuperados até depois de 36 h a partir de ovários armazenados *ex situ* em meio fisiológico (JOHNSTON et al., 1991), ou ainda por punção folicular via laparoscopia. Antes de proceder a laparoscopia, faz-se um tratamento hormonal para induzir a atividade dos ovários, tendo sido obtido êxito em tigres (DONOGHUE et al.,

1990), guepardo (HOWARD *et al.*, 1992), suçuarana (BARONE *et al.*, 1994) e jaguatirica (SWANSON *et al.*, 1996). No entanto, tratamentos múltiplos com eCG/hCG podem diminuir progressivamente a sensibilidade dos ovários devido à formação de imunoglobulinas que as neutralizam (SWANSON *et al.*, 1995).

JEWGENOW & STOLT (1996) adaptaram para as espécies felíneas não-domésticas os métodos descritos para o gato doméstico, e realizaram o isolamento e a caracterização ultraestrutural de FPA oriundos de guepardos (*Acinonyx jubatus*), onça pintada (*Panthera onca*), leões (*Panthera leo*) e tigres de Sumatra (*Panthera tigris sumatrae*), Siberianos (*Panthera tigris altaica*) e de Bengala (*Panthera tigris tigris*) que haviam morrido em zoológicos locais. Esses autores constataram a similaridade entre os FPA dos felinos domésticos e não-domésticos. Posteriormente, JEWGENOW *et al.* (1997) recuperaram uma média de 1867 ± 1144 FPA por ovário de várias espécies de felinos não-domésticos.

2.2.1.2. Métodos enzimáticos

O estroma ovariano é constituído por uma matriz extracelular rica em proteínas estruturais. Assim, foram desenvolvidas metodologias fundamentadas na hidrólise de tais proteínas, empregando enzimas como a tripsina, a pronase e a colagenase, utilizadas isoladamente ou em associação. A ação dessas enzimas facilita a liberação dos folículos ovarianos, tornando-as importantes ferramentas nas técnicas de MOIFOPA. Apesar dos procedimentos enzimáticos terem sido largamente utilizados na recuperação folicular de várias espécies mamíferas (NICOSIA *et al.*, 1975; ROY & GREENWALD, 1985; BOLAMBA *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000), até o momento não foi relatado na literatura o uso de enzimas isoladas ou em associações objetivando a obtenção de FPA felinos.

2.2.2. Cultivo *in vitro*

2.2.2.1. Cultivo de oócitos inclusos em FPA

O cultivo de FPA vem sendo alvo de várias pesquisas na última década, o que é traduzido em avanços consideráveis na aplicação desta biotécnica. Com oócitos oriundos de FPA cultivados e fecundados *in vitro* já foi possível obter embriões de ratas (DANIEL *et al.*, 1989). Os resultados mais significativos nesta área foram obtidos por CARROL *et al.* (1990), os quais obtiveram o nascimento de camundongos a partir de FPA congelados, descongelados e cultivados *in vitro* até a ovulação, quando então seus oócitos foram

maturados e fecundados *in vitro*. Em ovinos até o presente momento foi relatado que FPA foram cultivados até a formação de antro (CECCONI et al, 1999).

A ativação do oócito ocorre com o desenvolvimento do folículo, no interior do ovário com um preciso controle físico e hormonal. No cultivo *in vitro*, o oócito é submetido a uma série de injúrias que podem interferir neste processo prejudicando assim, o seu desenvolvimento bem como a sua utilização para a FIV no futuro (POLLARD et al, 1996). Para o desenvolvimento de um sistema de cultivo de FPA eficiente é essencial o controle irrestrito de todas variáveis que possam afetar o crescimento folicular, tais como temperatura, CO₂, nutrientes, fatores de crescimento, contaminações fúngicas e bacterianas (SILVA et al, 2004a, b).

No que concerne ao cultivo de FPA felinos, JEWGENOW & PITRA (1993) verificaram que folículos secundários eram capazes de se desenvolver até a fase antral. Posteriormente, JEWGENOW et al. (1997) recuperaram FPA de várias espécies de felinos não-domésticos, observando ser possível seu desenvolvimento no meio de cultivo por até 14 dias. Em 1998, JEWGENOW cultivou FPA de felinos domésticos durante cinco dias, no qual aproximadamente 30% dos folículos sobreviveram por vários dias. Ainda nesta espécie, POPE et al. (1997) também cultivaram oócitos inclusos em FPA.

2.2.2.2. Cultivo de oócitos inclusos em folículos antrais

JEWGENOW et al. (1997) sugeriram que a coleta de ovários de tigres (*Panthera tigris*), leões (*Panthera leo*), pumas (*Felis concolor*), guepardos (*Acinonyx jubatus*), leopardos (*Panthera pardus*) e jaguares (*Panthera onca*) poderia ocorrer até oito horas após a morte desses animais, através da dissecação do ovário, seguida do isolamento dos folículos. Utilizando esse procedimento, esses autores obtiveram uma média de 16 ± 2 complexos *cumulus*-oócito de boa qualidade, os quais posteriormente foram submetidos aos procedimentos de maturação *in vitro* e FIV.

O estágio do ciclo reprodutivo de gatas domésticas não possui efeito aparente sobre a taxa de maturação e fertilização oocitária (KARJA et al., 2002), de onde se conclui que gatas podem ser doadoras de oócitos em qualquer estágio do seu ciclo reprodutivo.

2.2.2.3. Cultivo *in vivo* de tecido ovariano

GOSDEN *et al.* (1994) realizaram transplante de fragmentos do córtex ovariano de gatos domésticos para cápsula renal de ratos inférteis imunossuprimidos. Após nove meses, foi realizada a necropsia dos receptores, e foi verificada a presença de grandes folículos, os quais alcançaram um diâmetro aproximado de três milímetros, apresentando antro normal, além de se apresentarem citologicamente normal. No entanto, não foi observada ovulação.

2.2.3. Criopreservação

A criopreservação de FPA, ou seja, a conservação por meio de baixas temperaturas, atualmente tem ganhado grande valor na biotécnica de MOIFOPA, uma vez que permite a manutenção da viabilidade folicular por um período indeterminado, quando estes folículos são estocados em nitrogênio líquido, visando a sua utilização futura.

O objetivo da criopreservação é garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante o período de estocagem. Entretanto, para que isso seja possível mesmo após longos períodos de conservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como escolha do tipo e da concentração de agentes crioprotetores, taxa de redução da temperatura de congelamento, manutenção da temperatura de estocagem, escolha do procedimento de descongelamento e técnicas utilizadas para assegurar a remoção do crioprotetor (GORDON, 1994).

Os métodos de criopreservação foram classificados em congelamento lento, rápido, ultrarrápido e vitrificação. Na congelamento lento, a redução da temperatura ocorre de maneira gradual, e utiliza baixas concentrações de crioprotetores (PAYNTER *et al.*, 1999). Esse procedimento utiliza um período de exposição da célula ou tecido ao crioprotetor, também chamado de período de equilíbrio (CANDY *et al.*, 1997). Durante a congelamento lento, ocorre uma desidratação da célula a fim de prevenir a formação de cristais de gelo intracelular ou minimizar os danos que eles possam causar (SHAW *et al.*, 2000), enquanto mantém o citoplasma super resfriado até a congelamento celular (FAHNING & GARCIA, 1992). A congelamento lento tem sido largamente utilizada para a conservação de oócitos bovinos

(SCHELLANDER *et al.*, 1994), de camundongos (CANDY *et al.*, 1994), humanos (OKTAY *et al.*, 1998), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004) e ovinos (SANTOS *et al.*, 2005).

A vitrificação é considerada uma alternativa ao processo de congelação lenta, e consiste basicamente na exposição do material biológico a altas concentrações de crioprotetor, por um curto período de tempo, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido. Este método apresenta como vantagem seu baixo custo, pois não necessita de equipamentos sofisticados para sua realização. Em humanos, a análise de tecido ovariano vitrificado demonstrou que o tecido apresentou-se preservado com um mínimo de alterações morfológicas (ISACHENKO *et al.*, 2003).

Mais recentemente, a criopreservação de folículos pré-antrais vem sendo considerada como uma grande alternativa para a estocagem de um grande número de oócitos imaturos obtidos a partir de um único animal. Os oócitos inclusos em folículos pré-antrais possuem várias características que os tornam menos suscetíveis à crioinjúria do que os oócitos maduros (GOSDEN *et al.*, 1994; SHAW *et al.*, 2000). Dentre elas, as mais importantes são: o menor tamanho do oócito, bem como das suas células de suporte (células da granulosa), sua baixa taxa metabólica, estágio do ciclo celular (núcleo no estado de prófase da primeira divisão meiótica), número restrito de células da granulosa, ausência de grânulos corticais periféricos e a pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis às baixas temperaturas. Todas estas características são potencialmente benéficas para a criopreservação.

Uma vez que a grande maioria dos oócitos encontra-se inclusa em folículos pré-antrais e que estes oócitos não possuem um fuso meiótico, os riscos citogenéticos são menores nas divisões subseqüentes (OKTAY *et al.*, 1998). Portanto, eles são pouco suscetíveis às aberrações cromossômicas (CANDY *et al.*, 1994) e, conseqüentemente, mais resistentes aos procedimentos de congelação. Além disso, diferentemente dos oócitos maduros, os folículos primordiais possuem tempo para reparar danos subletais nas organelas e em outras estruturas durante a sua prolongada fase de crescimento, que ocorreria durante o cultivo *in vitro*. Entretanto, ainda não há um número suficiente de experimentos nesta área para comprovar esta suposição (OKTAY *et al.*, 1998).

Os oócitos inclusos em folículos pré-antrais podem ser congelados *in situ*, isto é, no interior do próprio tecido ovariano (BAHADUR & STEELE, 1996; COX *et al.*, 1996; NEWTON *et al.*, 1996; CANDY *et al.*, 1997) ou após isolamento (CORTVRINDT *et al.*, 1996;

JEWGENOW *et al.*, 1998). Pesquisadores têm concentrado seus esforços para a criopreservação de folículos pré-antrais *in situ*. Estes estudos têm demonstrado por análise histológica, 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. O transplante para um ambiente diferente do original pode ser uma alternativa para a constituição de bancos de tecido ovariano congelado (NEWTON, 1998).

Embora resultados satisfatórios referentes à congelação de tecido ovariano já tenham sido obtidos em alguns mamíferos (CANDY *et al.*, 1997; GUANASENA *et al.*, 1997a,b; DANIEL *et al.*, 1983; GOSDEN *et al.*, 1994; SALLE *et al.*, 1999), a formação de gelo intracelular ainda pode representar em alguns casos, um entrave para o sucesso da criotecnologia. A criopreservação de tecido é substancialmente diferente da criopreservação de células em suspensão, como os folículos pré-antrais isolados, por exemplo. Em um tecido organizado, a difusão de água e crioprotetores não é facilitada. Vários tipos celulares em um tecido desempenham uma contribuição para a função do mesmo. Portanto, a sobrevivência de cada tipo celular pós-descongelação é extremamente importante (HARP *et al.*, 1994). O tecido do estroma ovariano é muito rico em células, as quais estão juntamente posicionadas. Portanto, a formação de gelo no espaço intercelular pode danificar facilmente as células e quebrar a comunicação intercelular necessária para a integridade do tecido (SUGIMOTO *et al.*, 1996).

Uma possível alternativa para reduzir as injúrias causadas pela formação de gelo intracelular seria a congelação de folículos pré-antrais isolados. No entanto, este procedimento tem sido estudado apenas em camundongos (CARROLL *et al.*, 1990) e felinos (JEWGENOW *et al.*, 1998). Em uma primeira tentativa de congelar folículos pré-antrais de gatas, utilizando um procedimento de congelação lenta, JEWGENOW & GÖRITZ (1995), empregando o DMSO como crioprotetor, relataram que apenas 12% dos folículos que foram congelados, encontravam-se intactos após a descongelação. Posteriormente, JEWGENOW *et al.* (1998) testaram diferentes crioprotetores (DMSO, PROH, EG e glicerol) também para a congelação lenta de folículos pré-antrais felinos e observaram que somente quando o glicerol foi empregado, houve uma diminuição no número de folículos com oócito e células da granulosa intactas quando comparado com folículos não congelados (controle), e a percentagem de folículos viáveis utilizando os demais crioprotetores foi similar ao controle.

Os oócitos maduros têm sido criopreservados utilizando-se os protocolos de congelação lenta e rápida, bem como de vitrificação. Entretanto, as taxas de fecundação e desenvolvimento *in vitro* são muito inferiores às de oócitos não criopreservados. Apesar dos oócitos maduros serem particularmente sensíveis aos procedimentos de criopreservação, alguns progressos têm sido obtidos inicialmente com a adaptação de protocolos empregados em embriões (PARKS & RUFFINGS, 1992). Tanto em animais de produção, quanto em humanos, esta técnica ainda não foi completamente desenvolvida.

A criopreservação de oócitos maduros pode aumentar a incidência de perda cromossômica no fuso meiótico e nestes casos não se pode obter resultados favoráveis na fecundação (WOOD *et al.*, 1997). Em estudos referentes à conservação de oócitos utilizando o resfriamento, observou que oócitos obtidos de folículos antrais felinos podem ser estocados por 24 h a 4 °C sem que haja perda de sua habilidade para maturar e desenvolver *in vitro* após a FIV (WOLFE & WILDT, 1996). Mais recentemente, LUVONI & PELLIZZARI (2000) demonstraram que oócitos felinos maduros podem ser criopreservados e posteriormente fertilizados *in vitro* com sucesso.

2.2.3.1. Crioprotetores

Para a criopreservação faz-se necessário o uso de soluções crioprotetoras, cuja função é proteger a célula durante o período de estocagem em baixas temperaturas. Estas soluções são compostas geralmente de um ou mais crioprotetores penetrantes, aos quais se pode adicionar compostos não penetrantes que agem desidratando e moderando as mudanças osmóticas celulares (de la VEGA & WILDE, 1991).

Os crioprotetores podem ser classificados em dois tipos, a saber: a) Crioprotetores penetrantes ou intracelulares; e b) Não penetrantes ou extracelulares. Os crioprotetores penetrantes mais comumente utilizados são glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PROH) e etilenoglicol (EG). Já no que diz respeito aos crioprotetores extracelulares, açúcares como frutose e glicose são os mais freqüentemente utilizados.

O DMSO é um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO , peso molecular 78 e temperatura de congelamento 18,5 °C. A elevada capacidade higroscópica decorre da sua

intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente para a concentração entre 66-67% se for deixado exposto ao ar ambiente, razão porque deve ser mantido em frasco hermeticamente fechado. Uma reação exotérmica é verificada quando o DMSO administrado topicamente reage com a água do ar e dos tecidos. Essa particularidade química tem relação com várias propriedades da droga e com sua capacidade solvente. Já foram verificadas acima de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (<http://br.answers.yahoo.com/question/index?qid=20061103184521AAIUBny>).

Um outro crioprotetor bastante utilizado é o EG, também denominado etanodiol-1,2 ou glicol. É um líquido higroscópico incolor e viscoso, de fórmula: $\text{CH}_2\text{OHCH}_2\text{OH}$. Possui ponto de fusão igual a -13°C , e ponto de ebulição de 197°C . Já o PROH, também denominado Propileno glicol ou 1,2 Propanodiol, apresenta aspecto líquido claro de odor fraco ou sem odor. Possui pH 7, ponto de ebulição de 188°C , e ponto de fusão de -60°C . O GLI (ou glicerina) cuja nomenclatura pela IUPAC é 1,2,3-Propanotriol, é um composto orgânico pertencente a função álcool com tres hidroxilas de formula molecular $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$. Apresenta aspecto líquido xaroposo, higroscópico, e incolor. Possui ponto de ebulição de 290°C , densidade de 1,2610 g/ml, teor de água de 0,50% máx, e pH (solução 10%) de 6,5 – 7,5 (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glicerina>).

O mecanismo de ação desses crioprotetores tem como base a ligação a estruturas que promovem pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Estas ligações mudam a orientação da molécula de água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

Além da importância na escolha do crioprotetor mais adequado para cada criopreservação deve ser considerada também a concentração do mesmo a ser utilizada. A escolha do crioprotetor e da sua melhor concentração dependem do procedimento de criopreservação utilizado, da estrutura a ser criopreservada, bem como da espécie animal em que se está trabalhando. Os crioprotetores penetrantes são substâncias de baixo peso molecular e agem penetrando intracelularmente a fim de interagir e influenciar a dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (DOBRINSKY, 1996). Entretanto, apesar da sua conhecida

ação benéfica, deve-se considerar a toxicidade destas substâncias, que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de conservação, principalmente quando altas concentrações são empregadas (OKTAY *et al.*, 1998).

2.2.3.2. Descongelação

O procedimento de descongelação, por sua vez, pode ser dividido em lento ou rápido. A descongelação rápida, no qual a amostra é retirada do nitrogênio líquido e exposta imediatamente à temperatura ambiente ou mergulhada em banho-maria, é o procedimento mais correntemente utilizado (CARROLL *et al.*, 1991; ASADA *et al.*, 2000). Entretanto, a descongelação lenta, que geralmente utiliza equipamentos que fazem um aumento gradual da temperatura, também tem sido empregada com êxito. A escolha do procedimento de descongelação geralmente depende do protocolo de criopreservação e do crioprotetor empregado. Uma vez que a descongelação lenta utiliza mais tempo, ela seria mais prejudicial às células criopreservadas, pois permitiria que a recristalização ocorresse (MAZUR, 1984).

2.2.3.3. Eficiência dos protocolos de criopreservação

Atualmente não existem critérios bem definidos para avaliar a eficiência dos procedimentos de criopreservação. Entretanto, de acordo com a estrutura a ser criopreservada, há vários parâmetros que podem ser utilizados para auxiliar na análise dos protocolos empregados. Tais avaliações podem ser realizadas *in vitro* ou *in vivo*. Em embriões, existem alguns parâmetros que são utilizados baseando-se na taxa de gestação (JONES *et al.*, 1995). Em muitos experimentos, o desenvolvimento *in vitro* dos embriões é um dos parâmetros de análise escolhido (van der ZALMEN *et al.*, 1988; VALDEZ *et al.*, 1990; WEBER & YOUNGS, 1994).

Uma vez que os oócitos maduros são muito sensíveis à criopreservação, análises mais acuradas das suas características citológicas devem ser realizadas. Para analisar as alterações ocorridas na cromatina, tubulina e actina dos oócitos criopreservados, O'NEIL *et al.* (1997) utilizaram microscopia de fluorescência e de contraste de fase. Entretanto, para uma análise mais precisa, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido empregada com sucesso no intuito de identificar mudanças ultraestruturais ocorridas após a descongelação do oócito (FUKU *et al.*, 1995). No entanto, o método mais largamente empregado para avaliar os protocolos de criopreservação dos oócitos maduros tem sido a fecundação *in vitro* e cultivo de embriões (FUKU *et al.*, 1992, GEORGE *et al.*, 1994).

Para os procedimentos de criopreservação de tecido ovariano, a avaliação dos oócitos imaturos tem sido realizada principalmente utilizando-se a histologia clássica (HOVATTA *et al.*, 1996) e o transplante autólogo e heterólogo (CORTVRINDT *et al.*, 1996). Muitos trabalhos empregam ambas as metodologias, uma vez que visam o reimplante do tecido após criopreservação (NEWTON *et al.*, 1996; SALLE *et al.*, 1998; BAIRD *et al.*, 1999). A histologia clássica e a MET possibilitam resultados mais imediatos, no entanto, somente o transplante ou o cultivo *in vitro* permite uma melhor avaliação da viabilidade dos oócitos criopreservados.

No tocante à avaliação dos protocolos de criopreservação empregados em oócitos inclusos em folículos pré-antrais felinos isolados, os pesquisadores têm empregado corantes vitais, tais como o azul de Trypan (JEWGENOW & STOLT, 1996; JEWGENOW *et al.*, 1998) e o cultivo *in vitro* (JEWGENOW & PITRA, 1993). Em outras espécies, utilizou-se a MET (OKTAY *et al.*, 1998), e corantes como a aceto-orceína (DURRANT *et al.*, 1998).

2.3. Importância e aplicações da MOIFOPA

Sabe-se que dentre as 37 espécies felídeas existentes, apenas o gato doméstico não se encontra sob ameaça de extinção (POPE *et al.*, 1993). Elas vêm sendo vítimas constantes de eliminação sistemática, seja por causarem prejuízos econômicos a produtores rurais, seja pela caça clandestina para o comércio de peles, ou para o tráfico de animais vivos, ou ainda pela destruição de seus *habitats* naturais, sendo este último o fator de ameaça mais importante.

Nesse contexto, a recuperação, criopreservação e/ou cultivo de oócitos inclusos em folículos pré-antrais implicaria no uso de oócitos criopreservados para a criação de bancos de germoplasma, possibilitando, entre outras coisas, aproveitar ovários provenientes de animais com patologias reprodutivas ou portadores de problemas sanitários. Estes oócitos também seriam de fundamental importância em programas de multiplicação de animais de alto valor genético, bem como aqueles em vias de extinção (BEM *et al.*, 1995).

Ainda no tocante à pesquisa aplicada, a obtenção *in vitro* de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diferentes estágios de desenvolvimento, a partir de um único ovário possibilitaria a otimização e a padronização de biotécnicas como a PIV, a clonagem e a transgênia, através do fornecimento de um grande número de oócitos provenientes de um mesmo animal (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

A MOIFOPA é também de grande importância para a pesquisa básica ligada à reprodução animal. Esta biotécnica poderá contribuir para o esclarecimento de mecanismos que atualmente encontram-se obscuros, envolvidos na foliculogênese pré-antral, fornecendo importantes informações científicas a respeito da fisiologia ovariana, de modo a esclarecer a função dos fatores de regulação do desenvolvimento folicular e oocitário, observando suas exigências nutricionais mínimas, bem como sua capacidade de adesão e crescimento (FIGUEIREDO, 1995); ou o entendimento do papel de fatores humorais tecais e de citocinas sobre a maturação oocitária e a atividade das células da granulosa (GREENWALD & MOOR, 1989). Além disso, esses oócitos recuperados poderiam ser utilizados para avaliação morfológica, usando critérios como tamanho, aspecto e presença ou não de membrana basal (GREENWALD & MOOR, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 1993; HULSHOF *et al.*, 1994; JEWGENOW & STOLTE, 1996; SAHA *et al.*, 2000), implicando diretamente sobre os procedimentos aplicados da reprodução animal.

3. Justificativa

A biotécnica de MOIFOPA tem como objetivo o desenvolvimento *in vitro* de milhares FPA a partir de um ovário. Estes folículos cultivados *in vitro*, até o estágio antral poderiam ser utilizados posteriormente em programas de PIV ou de clonagem, visando posteriormente a TE, contribuindo assim para multiplicação de animais de alto valor zootécnico e/ou em vias de extinção.

Uma vez que ainda não existe um procedimento de cultivo *in vitro* que permita o completo crescimento e maturação de FPA felinos, o desenvolvimento de um protocolo eficiente de criopreservação possibilitaria, em curto prazo, a preservação do patrimônio genético de animais em risco de extinção, para posterior utilização em programas reprodutivos. Dessa forma, populações inteiras de animais ameaçados de extinção poderiam ser devolvidas à natureza, após um detalhado estudo de reintrodução de espécies e impacto ambiental, sendo necessário para isso um número reduzido de fêmeas doadoras de ovário. Além do mais, as fêmeas utilizadas nesses programas de reintrodução da fauna silvestre ou para o melhoramento genético de populações isoladas geograficamente poderiam ceder apenas um dos ovários para a recuperação folicular, enquanto o ovário contralateral permaneceria em seu local de origem, sem que houvesse o comprometimento da fisiologia reprodutiva da fêmea em questão.

No entanto, apesar de existirem protocolos de criopreservação para espécie felina, os resultados não foram favoráveis até o momento. Além disso, não se sabe se o baixo percentual de FPA viáveis após a congelação é devido ao procedimento de criopreservação, ou se já existe uma perda durante o período de exposição aos crioprotetores. Nesse contexto, o presente trabalho pretende contribuir para um melhor entendimento das etapas da criopreservação, do seu efeito sobre a viabilidade e manutenção das características ultraestruturais dos FPA criopreservados, bem como a susceptibilidade dos FPA felinos a diferentes crioprotetores. Em adição, o sucesso de algumas biotécnicas reprodutivas depende de uma maior compreensão dos aspectos morfológicos da espécie em estudo, e a caracterização da população folicular de gata doméstica poderá contribuir com este fim.

Desse modo, a utilização do gato doméstico como modelo experimental, adaptando procedimentos desenvolvidos nesta espécie se justifica pela sua proximidade filogenética com

as demais espécies selvagens, todas inclusas na lista dos animais em perigo de extinção (IUNC, 2006).

Hipóteses Científicas

Foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- 1) A população folicular de gata doméstica apresenta características morfológicas similares aos outros mamíferos domésticos;
- 2) O glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol podem ser utilizados com sucesso na criopreservação de folículos pré-antrais de gatas domésticas, melhorando as taxas de sucesso de criopreservação de FPA felinos descritos na literatura.
- 3) FPA felinos criopreservados podem sobreviver e apresentar-se morfolologicamente normais após cinco dias de cultivo *in vitro*.

4. Objetivos

5.1 Objetivo Geral

- ? Determinar a população ovariana de gatas domésticas;
- ? Adaptar protocolos para conservação de gametas femininos a partir de ovários de gata doméstica

5.2 Objetivos Específicos

- ? Caracterizar e quantificar a população folicular ovariana de gata doméstica
- ? Avaliar o efeito da exposição a quatro crioprotetores (etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido e propanodiol) a concentração de 1,5 M, sobre fragmentos de tecido ovariano ou em suspensão de folículos felinos isolados, mantidos a 20°C;
- ? Avaliar o efeito do crioprotetor sobre a viabilidade de folículos pré-antrais felinos *in situ* após descongelação;
- ? Avaliar os folículos pré-antrais *in situ* descongelados após cultivo.
- ? Avaliar a ultra-estrutura de FPA de gata doméstica após criopreservação e cultivo.

CAPÍTULO I:

Determinação da População Folicular Ovariana de Gata Doméstica

6.1. Material e Métodos

6.1.1. Coleta dos ovários

Foram utilizados ovários (n=20) de gatas adultas, sem raça definida, coletados após ovariosalpingohisterectomia. As gatas submetidas ao procedimento cirúrgico foram anestesiadas, utilizando associação de quetamina e xilazina, e após constatada a sedação, o procedimento da coleta foi iniciado. As cirurgias foram todas eletivas, realizadas ao longo do ano de 2005, no Laboratório de Reprodução de Carnívoros da Universidade Estadual do Ceará. Todos os animais utilizados neste experimento foram acompanhados até o retorno pós-cirúrgico e durante o período pós-operatório. Todas as gatas apresentavam-se clinicamente saudáveis.

6.1.2. Processamento dos ovários

Imediatamente após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70%, seguido de lavagem em solução salina 0,9% (NaCl) e foram retirados os tecidos circundantes. Os ovários foram então fixados em formol 10%, desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados e, finalmente, os fragmentos foram inclusos em parafina para a realização de cortes seriados a intervalos de 7 μ m. As lâminas foram montadas a cada 5ª secção e coradas com Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram montadas e analisadas.

6.1.3. Estimativa da População Folicular

As lâminas montadas foram avaliadas em microscópio ótico utilizando aumento de 400 vezes. Para a estimativa da população folicular, foi percorrida toda a secção e foram contados apenas os folículos cujos núcleos oocitários apresentarem-se claramente visíveis nas secções estudadas. O número de folículos por ovário foi estimado segundo GUNDERSEN *et al.* (1988).

6.1.4. Classificação folicular

Os folículos foram classificados segundo a sua morfologia. Assim, folículos primordiais possuíam o oócito circundado por uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa, enquanto que nos folículos primários, as células da granulosa são cúbicas. Quanto aos folículos secundários, estes podem ser caracterizados por possuírem várias camadas de células da granulosa cúbicas em torno do oócito (HULSHOF *et al.*, 1994). Os

folículos terciários e o folículo maduro ou de De Graaf caracterizam-se pela presença do antro folicular, surgimento das camadas tecais e zona pelúcida desenvolvida. Os parâmetros utilizados para a avaliação dos folículos incluíram morfologia do oócito, morfologia das células da granulosa e integridade da membrana basal.

6.1.6. Análise estatística

O número de folículos foi expresso em percentual, de acordo com a classificação folicular, e após a realização da estimativa da população folicular, o resultado foi expresso em número absoluto.

6.2. Resultados e Discussão

Todas as gatas utilizadas nesse trabalho eram adultas, e pertencentes a proprietários. Os ovários apresentavam um tamanho médio em torno de um centímetro de comprimento por meio centímetro de largura. A maioria apresentava folículos em crescimento visíveis em sua superfície, e alguns apresentavam dois ou mais corpos lúteos, sugerindo que as gatas apresentavam ciclicidade normal e, conseqüentemente, apresentavam uma população de folículos normais. Apenas dois ovários não apresentaram folículos na superfície, e posteriormente, foi observada durante a avaliação microscópica, a ausência de folículos viáveis.

De acordo com a metodologia proposta, a população média total de folículos ovarianos de gata doméstica foi estimada em 114.000,00 folículos por ovário, obedecendo a uma distribuição de 85,5%, 3,5%, 4,0%, 6,5% e 0,2% de folículos primordiais, primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios, respectivamente. Foram observados alguns folículos poliovulares, ou seja, folículos que continham dois ou mais oócitos inclusos no interior do mesmo folículo.

Tabela 1: Distribuição média dos folículos normais observados por classe folicular.

	Classe folicular					TOTAL
	Primordial	Primário	Secundário	Terciário	Pré-ovulatório	
Percentual	88,5%	2,89%	3,6%	4,85%	0,07%	100%
Média	75,33 ? 36,21	2,47 ? 4,05	3,07 ? 3,73	4,13 ? 4,24	0,07 ? 0,26	85,07 ? 35,93
Mínimo - Máximo	(5 - 159)	(0 - 12)	(0 - 13)	(0 - 18)	(0 - 1)	(10 - 164)

Muitos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de estimar a população folicular ovariana em diversas espécies mamíferas. Nesses estudos, tem-se constatado que a população folicular ovariana sofre grande variação individual. Em bovinos, o número de folículos presentes no ovário pode variar de zero (animal estéril) a 700.000, com uma média de 130.000 folículos por ovário (ERICKON, 1966). Em mulheres, estimou-se que, ao nascimento, existem aproximadamente dois milhões de folículos pré-antrais por ovário (BAKER, 1966). GOUGEON & CHAINY (1987) mostraram que a população de folículos pré-antrais na mulher varia de 79.600 a 27.000, entre as idades de 19 a 46 anos, e conforme a idade aumenta, diminui a proporção de folículos primordiais, ou da classe B, segundo LINTERN-MOORE *et al.* (1974). Em macacas rhesus, BAKER (1966) estima que, ao nascimento, existe uma média de 910.000 folículos por ovário. MILLER *et al.* (1999) demonstraram que, em fêmeas de Macaca nemestrina (*Pig tailed monkey*), o número de folículos pré-antrais varia de 30.900 a 9.940, em animais com a idade variando de 0,85 a 12,50 anos. Já em macaco-prego (*Cebus apella*), a população foi estimada em torno de 56.000 folículos por ovário (DOMINGUES, 2000). A população folicular também foi estimada em aproximadamente 180.000 folículos em ovinos (CAHILL *et al.*, 1979) e 35.000 em caprinos (LUCCI *et al.*, 1999).

Todos os autores citados demonstraram que ocorre uma grande variação no número de folículos estimados. Diversos fatores que podem afetar quantitativamente a população folicular ovariana têm sido descritos, como por exemplo, a idade (PETERS, 1976), a raça (CAHILL *et al.*, 1979; DRIANCOURT *et al.*, 1975), o estágio reprodutivo (ERICKSON *et al.*, 1976), a nutrição (SCARAMUZZI *et al.*, 1993) e fatores genéticos (ERICKSON *et al.*, 1966a e b; CAHILL *et al.*, 1979).

Nesse trabalho, foi observado que os folículos de gata, no tocante às características morfológicas durante o seu desenvolvimento, apresentaram-se similares ao descrito na literatura em outras espécies de mamíferos.

Em ruminantes, cerca de 90% da população ovariana é constituída por folículos pré-antrais (SAUMANDE, 1991). LUCCI (1999), determinou que folículos primordiais e primários perfazem, respectivamente, 67,8% e 25,8% do total de folículos ovarianos em caprinos, totalizando um grande número de folículos pré-antrais (em média 37.646 ± 4.277).

Os trabalhos citados em caprinos (LUCCI, 1999) e em macaco-prego (DOMINGUES, 2000) observaram que a maioria da população ovariana é constituída por folículos pré-antrais, estando de acordo com o resultado obtido no presente trabalho.

Na espécie felina, existem alguns relatos de isolamento (JEWGENOW & PITRA, 1993; JEWGENOW & STOLTE, 1996) e cultivo de oócitos inclusos em FPA (POPE *et al.*, 1997; JEWGENOW & PITRA, 1993). Entretanto, até o momento, não havia sido relatada estimativa de população folicular nessa espécie.

Durante a avaliação da estimativa folicular deste trabalho, foi verificada a presença de folículos poliovulares. Na literatura, folículos poliovulares foram observados em cadelas (MCDOUGALL *et al.*, 1997), novilhas (GREENWALD E MOOR, 1989) e cabras (LUCCI *et al.*, 1999b; BEZERRA *et al.*, 1998). NUTTINCK *et al.* (1993) observaram um caso de folículos biovulares numa população de folículos pré-antrais isolados bovinos. LUCCI *et al.* (1999) sugere que, em cabras, a incompleta separação dos clusters das células germinativas primordiais forma os folículos poliovulares. Estes folículos também foram estudados por AURICHIO (1995) em macaco-prego (*Cebus apella*). Este autor sugere que a presença de folículos poliovulares não interfere na taxa de ovulação nesta espécie. Em todo caso, o papel preciso dos folículos poliovulares em macacos e em outras espécies de mamíferos permanece desconhecido.

O conhecimento de alguns aspectos relacionados à estrutura folicular no interior do ovário da gata doméstica, dentre os quais o conhecimento da população folicular, poderá contribuir com uma melhor aplicação de algumas biotécnicas reprodutivas em desenvolvimento, dentre as quais podemos citar a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), além do conhecimento básico da morfofisiologia da espécie.

6.3. Conclusão

A população folicular de gatas domésticas apresenta características similares a outras espécies de mamíferos domésticos, sendo constituída em sua grande maioria por folículos primordiais.

7. CAPÍTULO II:

Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais isolados de gata doméstica usando diferentes crioprotetores

7.1. Material e Métodos

7.1.1. Isolamento de folículos pré-antrais felinos

Nesta etapa, foram utilizados 10 ovários oriundos de gatas adultas SRD. Cada par de ovários foi destinado ao isolamento folicular conforme procedimento descrito por LIMA *et al.* (2003).

7.1.2. Efeito da exposição dos folículos pré-antrais felinos isolados aos crioprotetores

Imediatamente após o isolamento folicular, uma alíquota contendo folículos pré-antrais isolados foi destinada à avaliação da integridade folicular, com o azul de Trypan, conforme descrito abaixo. Em seguida, cinco amostras de 0,9 ml da suspensão folicular foram retiradas e transferidas para cinco tubos Eppendorf separadamente, as quais foram adicionadas da mesma quantidade de Meio Essencial Mínimo (MEM) na ausência de crioprotetor ou na presença de DMSO, PROH, EG ou GLI, todos na concentração final de 1,5 M. As suspensões foram equilibradas a 20°C por um período de 20 min. Ao final do período de exposição, foi realizada a remoção do crioprotetor, sendo cada suspensão de folículos transferida para um tubo Eppendorf e submetida a três lavagens sucessivas por centrifugação (1000 rpm/2 min) em 1 mL de MEM à temperatura ambiente realizadas a intervalos de 5 min. Após a última lavagem, os folículos foram ressuspensos em 1,8 mL de MEM e corados para avaliar a sua integridade. Neste experimento, os tratamentos testados foram repetidos cinco vezes.

7.1.3. Criopreservação dos folículos pré-antrais felinos isolados

Os folículos isolados foram criopreservados utilizando procedimento descrito por RODRIGUES *et al.* (2005). Assim, o restante da suspensão de FPA isolados foi dividida em alíquotas de 0,9 mL, as quais foram adicionadas aos criotubos contendo apenas MEM ou contendo MEM acrescido dos quatro crioprotetores, ou seja, GLI, EG, DMSO e PROH, todos a uma concentração final de 1,5 M. Após esse procedimento, os criotubos foram equilibrados a 20°C por um período de 20 min. Após esse período, os criotubos contendo os FPA isolados foram submetidos a uma velocidade de resfriamento de 2°C/min até atingir a temperatura de -7°C, quando foi realizada indução da cristalização (*seeding*). Em seguida, a temperatura foi reduzida a 0,3°C/min até atingir -30°C, e a 0,15°C/min até -33°C/min, quando então, os criotubos foram removidos do freezer programável e mergulhados em nitrogênio líquido, no qual permaneceram estocados por uma semana.

7.1.3. Descongelamento e avaliação da viabilidade folicular

Após o período de estocagem, as suspensões de FPA isolados foram rapidamente expostas à temperatura em torno de 28°C por 1 min e, então, imersos em banho-maria a 37°C por um período de 3 a 5 min. Logo após foi realizada a remoção do crioprotetor, na qual a suspensão de FPA isolados foi submetida a três lavagens sucessivas em MEM, a intervalos de cinco minutos. A avaliação da viabilidade dos FPA isolados após a criopreservação foi realizada utilizando o corante vital Azul de Trypan.

7.1.4. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a um teste de normalidade de distribuição e homogeneidade de variância entre os tratamentos. Considerando o não atendimento das condições exigidas para a realização da análise de variância, mesmo quando os dados foram transformados, os tratamentos foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

7.2. Resultados e Discussão

7.2.1. Efeito da exposição dos folículos pré-antrais felinos isolados aos crioprotetores

Foram avaliados 900 folículos pré-antrais (FPA) após o isolamento e a exposição aos crioprotetores, sendo observado um percentual médio de 99,3% de FPA íntegros no grupo controle. Após a exposição ao período de equilíbrio, observou-se um percentual de 95,3%; 94% e 93,3% de FPA quando se utilizou MEM sem crioprotetor, DMSO, e PROH, respectivamente, não havendo diferença significativa entre estes tratamentos e o grupo controle. Apenas quando se utilizou o EG e o GLI, houve redução significativa na média de FPA isolados viáveis, reduzindo para 91,3% e 79,3% o número de FPA viáveis, respectivamente (Tab. 2).

Tabela 2. Número médio e percentual de FPA normais isolados expostos a diferentes crioprotetores.

Tratamentos	FPA normais isolados após exposição	
	Nº médio	Percentual
Controle	29,8 ± 0,4 ^A	99,3 %
MEM	28,6 ± 1,1 ^{AB}	95,3 %
Dimetilsulfóxido	28,2 ± 0,4 ^{AB}	94,0 %
Propanodiol	28,0 ± 1,0 ^{AB}	93,3 %
Etilenoglicol	27,4 ± 1,5 ^B	91,3 %
Glicerol	23,8 ± 1,6 ^C	79,3 %

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística (P < 0,05).

Os resultados mostraram que após o isolamento folicular, 99,3% dos folículos primordiais apresentaram-se não corados pelo azul de trypan, indicando uma excelente viabilidade folicular após o isolamento. Resultados similares foram relatados por AMORIM *et al.* (2003), em folículos primordiais ovinos, usando o mesmo procedimento de avaliação utilizado neste estudo. Em bovinos, a avaliação histológica revelou que 93,5% dos folículos pré-antrais apresentavam-se morfolologicamente normais após o isolamento mecânico (LUCCI, 2003). Por outro lado, resultados diferentes foram relatados por JEWGENOW *et al.* (1998) em folículos pré-antrais felinos. Estes autores demonstraram que em felinos, menos de 50% dos folículos pré-antrais apresentavam-se viáveis após o isolamento folicular, discordando dos achados deste trabalho. A taxa de atresia pode ser influenciada por diversos fatores tais como o método de avaliação da viabilidade folicular empregado, a categoria folicular incluída no estudo, bem como as diferenças entre espécies.

No que se refere à exposição dos FPA isolados aos crioprotetores, os resultados deste trabalho mostraram que apenas o GLI e o EG causam danos durante o período de equilíbrio, reduzindo a viabilidade dos FPA felinos antes da criopreservação, quando comparado ao controle. Similarmente, JEWGENOW *et al.* (1998) mostraram que mesmo em baixas concentrações (1,5 M) o GLI foi capaz de reduzir a taxa de viabilidade de folículos primordiais felinos para aproximadamente 15% após 15 min de exposição. RODRIGUES *et al.* (2004) mostraram que após a exposição aos crioprotetores nas concentrações testadas, o número médio de folículos primordiais foi significativamente reduzido quando comparado ao controle e, similar entre os demais tratamentos, mostrando uma sensibilidade dos FPA caprinos a todos os crioprotetores, ao contrário do observado neste trabalho.

É provável que a redução do número médio de folículos primordiais isolados seja

decorrente das perdas ocorridas durante as centrifugações e lavagens realizadas para a remoção do crioprotetor. Essa afirmação é baseada no fato de que no tratamento onde os folículos não foram expostos aos crioprotetores, porém submetidos à centrifugação e lavagem, o número médio de folículos foi significativamente inferior ao controle.

7.2.2. Criopreservação dos folículos pré-antrais felinos isolados

Foram analisados 900 FPA após a criopreservação. No grupo controle, 98,6% dos FPA isolados apresentavam-se viáveis após o isolamento. Esse percentual diminuiu significativamente após a criopreservação para 69,3%, 63,3%, 59,3% e 28,6%, quando se utilizou o EG, DMSO, PROH E GLI, respectivamente. Deve-se ressaltar que o percentual de FPA isolados normais após a criopreservação com GLI foi significativamente menor do que o encontrado nos demais crioprotetores. Apenas 8,6% dos FPA permaneceram viáveis após a criopreservação na ausência de crioprotetor.

Tabela 3: Número médio de folículos pré-antrais isolados submetidos à criopreservação utilizando diversos tratamentos.

Tratamento	Média	Percentual
Controle	29,6 ± 0,5 ^A	98,6%
EG	20,8 ± 4,5 ^B	69,3%
DMSO	19,0 ± 4,1 ^B	63,3%
PROH	17,8 ± 0,8 ^B	59,3%
GLI	8,6 ± 1,1 ^C	28,6%
MEM	2,6 ± 0,5 ^D	8,6%

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística (P < 0,05).

O presente estudo mostrou que todos os tratamentos apresentaram um reduzido número de folículos normais após a criopreservação quando comparado ao controle. Após o isolamento, 98,6% dos folículos estavam viáveis, de acordo com avaliação feita pela coloração vital com azul de trypan. Resultados similares foram obtidos por RODRIGUES *et al.* (2005) na espécie caprina e por SANTOS (2005) na espécie ovina, onde foram observados 92 e 94% de FPA viáveis após o isolamento, respectivamente. Entretanto, JEWGENOW *et al.* (1998) observaram menos de 50% de folículos viáveis após o isolamento folicular na espécie felina. Essa discrepância entre os percentuais de FPA viáveis observada dentro da mesma espécie pode ser devido às diferenças entre os procedimentos de isolamento folicular utilizados em cada trabalho.

A criopreservação de FPA vem sendo considerada como uma grande alternativa para a estocagem de um grande número de oócitos imaturos obtidos a partir de um único animal. Os oócitos inclusos em FPA felinos podem ser congelados *in situ*, isto é, no interior do próprio tecido ovariano (LIMA *et al.*, 2006) ou após isolamento (JEWGENOW *et al.*, 1995). Ainda na espécie felina, JEWGENOW *et al.* (1998) testaram os crioprotetores DMSO e PROH para a criopreservação de FPA isolados, os quais apresentaram um percentual de 19% de folículos felinos isolados viáveis após a criopreservação. O maior percentual de folículos viáveis obtido neste trabalho (EG – 69,3%) pode ser atribuído ao procedimento de isolamento folicular associado a uma curva de congelação lenta. O GLI tem sido utilizado freqüentemente para a criopreservação de embriões bovinos por causa de sua baixa citotoxicidade. No entanto, o mesmo pode induzir diversos danos no citoplasma devido à sua baixa penetrabilidade. De acordo com FUKU *et al.* (1992), o DMSO, PROH e EG possuem maior capacidade de penetração à membrana celular que o GLI, o que pode ter levado às menores taxas de FPA viáveis quando este foi utilizado. HOVATTA (2000) observou que o EG, em tecido humano, penetra no tecido mais rapidamente que o PROH e DMSO e que, o GLI possui uma ação mais lenta e, conseqüentemente, menos eficiente. Além disso, quando se avaliaram folículos de gata *in situ*, expostos ao GLI durante 20 min, a uma temperatura de 20°C, observou-se que estes já apresentavam sinais de degeneração, quando avaliados por histologia clássica e MET, o que sugere um efeito tóxico deste crioprotetor ainda durante o período de equilíbrio. Este mesmo autor observou uma diminuição significativa no percentual de FPA isolados viáveis após a exposição ao GLI, nas mesmas condições citadas anteriormente, avaliados pela coloração vital. Este resultado confirma um efeito tóxico deste crioprotetor, aliado a sua baixa permeabilidade, fatores estes que corroboram para o insucesso de sua utilização para a criopreservação de FPA felinos isolados.

7.3. Conclusão

Com base nesses resultados, conclui-se que os crioprotetores EG, DMSO e PROH possuem atividade semelhante durante o período de exposição e que o GLI reduz o percentual de FPA normais. Conclui-se ainda que a criopreservação de FPA isolados de gata doméstica pode ser realizada utilizando EG, DMSO ou PROH como crioprotetores.

8. Capítulo III:

Criopreservação de tecido ovariano de gata doméstica usando diferentes crioprotetores.

8.1. Material e Métodos

8.1.1. Efeito da exposição dos FPA felinos *in situ* aos crioprotetores

8.1.1.1. Coleta e transporte do tecido ovariano

Nesta etapa, foram utilizados 10 ovários de gatas adultas SRD, coletados cirurgicamente, lavados e mantidos em solução salina por até 10 minutos.

8.1.1.2. Exposição aos crioprotetores dos FPA felinos *in situ*

Cada par ovariano foi dividido em seis fragmentos de 3 mm aproximadamente. Imediatamente após a coleta, um fragmento tomado aleatoriamente foi fixado em formol a 10% por um período de 20 a 24 horas para análise histológica, constituindo o Tratamento Controle. Os cinco fragmentos restantes foram equilibrados a 20°C por um período de 20 min, na ausência de crioprotetor (MEM) ou na presença de GLI, EG, DMSO ou PROH, todos na concentração de 1,5 M. Ao término dos 20 min, os fragmentos foram lavados em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino para remoção do crioprotetor e fixados para análise histológica e ultraestrutural. Após a remoção do crioprotetor, os fragmentos ovarianos (inclusive aqueles expostos ao meio sem crioprotetor) foram fixados para histologia clássica (HC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Todos os tratamentos foram repetidos cinco vezes.

8.1.1.3. Análise histológica de FPA felinos frescos e congelados/descongelados

Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados, diafanizados, incluídos em blocos de parafina e seccionados seriadamente à espessura de 7 µm. Cada 5ª secção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina. Somente foram analisados os folículos pré-antrais cujos oócitos apresentaram o núcleo evidente na secção observada.

8.1.1.4. Análise ultra-estrutural de FPA felinos frescos e congelados/descongelados

Imediatamente antes da fixação para análise histológica, foi retirado 1/6 de cada fragmento ovariano, o qual foi fixado em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,3), pós-fixado em tetróxido de ósmio (1%), desidratado e incluído em Spurr. Cortes semi-finos (3 µm) foram corados com azul de

toluidina e observados ao microscópio óptico. Os cortes ultra-finos (70 nm) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

8.1.2. Criopreservação dos FPA felinos *in situ*

Foram utilizados dez ovários, obtidos por ovariosalpingohisterectomia, de cinco gatas adultas. No laboratório, os ovários foram fragmentados e imediatamente após a coleta um fragmento foi fixado para análise histológica (grupo controle). O restante dos fragmentos foi equilibrado a 20°C por um período de 20 min, na ausência ou na presença dos quatro crioprotetores, e após esse período, foram submetidos a uma velocidade de resfriamento de 2°C/min a -7°C, quando foi realizado o *seeding*. Em seguida, a temperatura foi reduzida a 0,3°C/min até atingir -30°C, e a 0,15°C/min até -33°C/min, quando então, os criotubos foram removidos do freezer e mergulhados em nitrogênio líquido, no qual permaneceram estocados por uma semana. Para a descongelação, os criotubos foram rapidamente expostos à temperatura em torno de 28°C por 1 min e, então, imersos em banho-maria a 37°C por um período de 3 a 5 min, e logo após foi realizada a remoção do crioprotetor, onde os fragmentos foram submetidos a três lavagens sucessivas em MEM, a intervalos de cinco minutos. A avaliação da viabilidade dos FPA *in situ* foi realizada por histologia clássica.

8.1.3. Avaliação Histológica e Ultraestrutural dos FPA felinos

A análise histológica e ultraestrutural dos fragmentos criopreservados foram realizadas utilizando o mesmo procedimento descrito para os fragmentos expostos aos crioprotetores.

8.1.4. Análise Estatística

Conforme descrito no capítulo anterior, os resultados foram submetidos a um teste de normalidade de distribuição e homogeneidade de variância entre os tratamentos. Considerando o não atendimento das condições exigidas para a realização da análise de variância, mesmo quando os dados foram transformados, os tratamentos foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

8.2. Resultados e Discussão

8.2.1. Efeito da exposição dos FPA felinos *in situ* aos crioprotetores

Foram avaliados 30 FPA por tratamento, em cinco repetições, totalizando 900 FPA *in situ*. O grupo controle apresentou uma média de $29,2 \pm 1,1$ FPA normais (97,3% - Figura 2). Estudos histológicos realizados em tecido ovariano caprino mostraram que a taxa de degeneração folicular *in vivo* pode variar de 6% (LUCCI *et al.* 1999b) a 12,2% (SILVA *et al.* 2002). Em gatos, folículos pré-antrais também foram analisados histologicamente e uma alta incidência de atresia folicular (65%) foi observada (WOOD *et al.*, 1997).

Após a exposição aos crioprotetores, observou-se que a média de FPA normais (Tab. 4) não diferiu significativamente do controle, quando os fragmentos foram expostos ao DMSO, EG, PROP, e quando não foi utilizado crioprotetor durante a exposição (97,3%, 94,6%, 98% e 98%, respectivamente). Entretanto, a exposição durante 20 min a 20°C ao GLI diminuiu significativamente a média de FPA normais para $20,4 \pm 3$, apresentando um percentual de 68% FPA normais após o período de equilíbrio. Estes resultados foram confirmados qualitativamente pela análise ultra-estrutural dos FPA (Fig. 3) na qual foi possível avaliar um FPA pertencente ao grupo controle. Este FPA manteve sua integridade folicular, o qual apresentou morfologia intacta, com membrana basal íntegra; o citoplasma apresentou um grande número de mitocôndrias, sem sinais de degeneração, com vacuolização discreta e grandes vesículas armazenadoras de lipídeos; o oócito apresentou-se morfolologicamente normal. Vale ressaltar que essas mesmas características foram observadas nos FPA expostos ao DMSO (Fig. 4A), EG e PROH, e naqueles equilibrados sem crioprotetor. Entretanto, após a exposição ao GLI (Fig. 4B), observou-se a presença de vacuolização do citoplasma das células da granulosa, além da fragmentação das gotas de lipídeo e acúmulo de material eletrondenso. Quando os FPA foram expostos ao GLI, estes apresentaram retração oocitária e intensa vacuolização em todo o citoplasma do oócito e das células da granulosa, indicando um processo degenerativo.

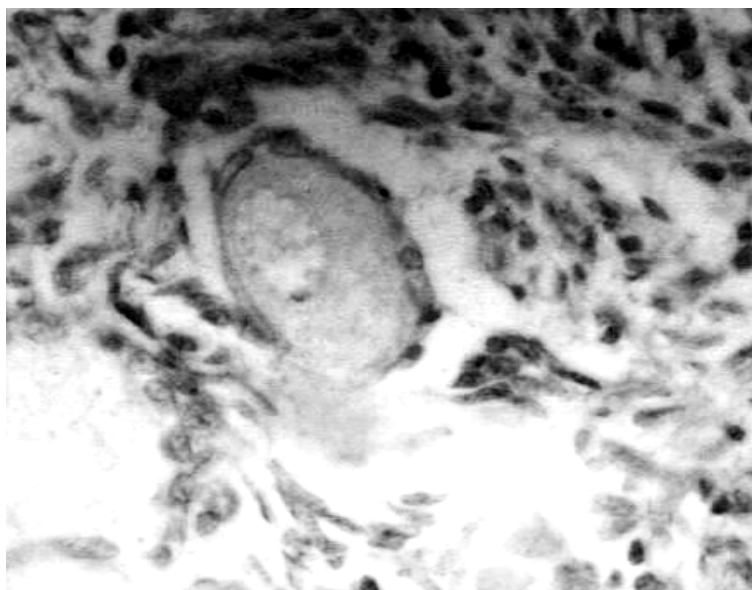


Figura 2. Análise histológica de tecido ovariano de gata: folículo primordial normal pertencente ao grupo controle.

Tabela 4. Número médio e percentual de FPA normais *in situ* expostos a diferentes crioprotetores.

Tratamentos	FPA normais <i>in situ</i>	
	Nº médio	Percentual
Controle	29,2 ± 1,0 ^A	97,3%
Dimetilsulfóxido	29,2 ± 1,0 ^A	97,3%
Propanodiol	29,4 ± 0,5 ^A	98,0%
Etilenoglicol	28,4 ± 2,6 ^A	94,6%
Glicerol	20,4 ± 3,0 ^B	68,0%
MEM	29,4 ± 0,5 ^A	98,0%

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

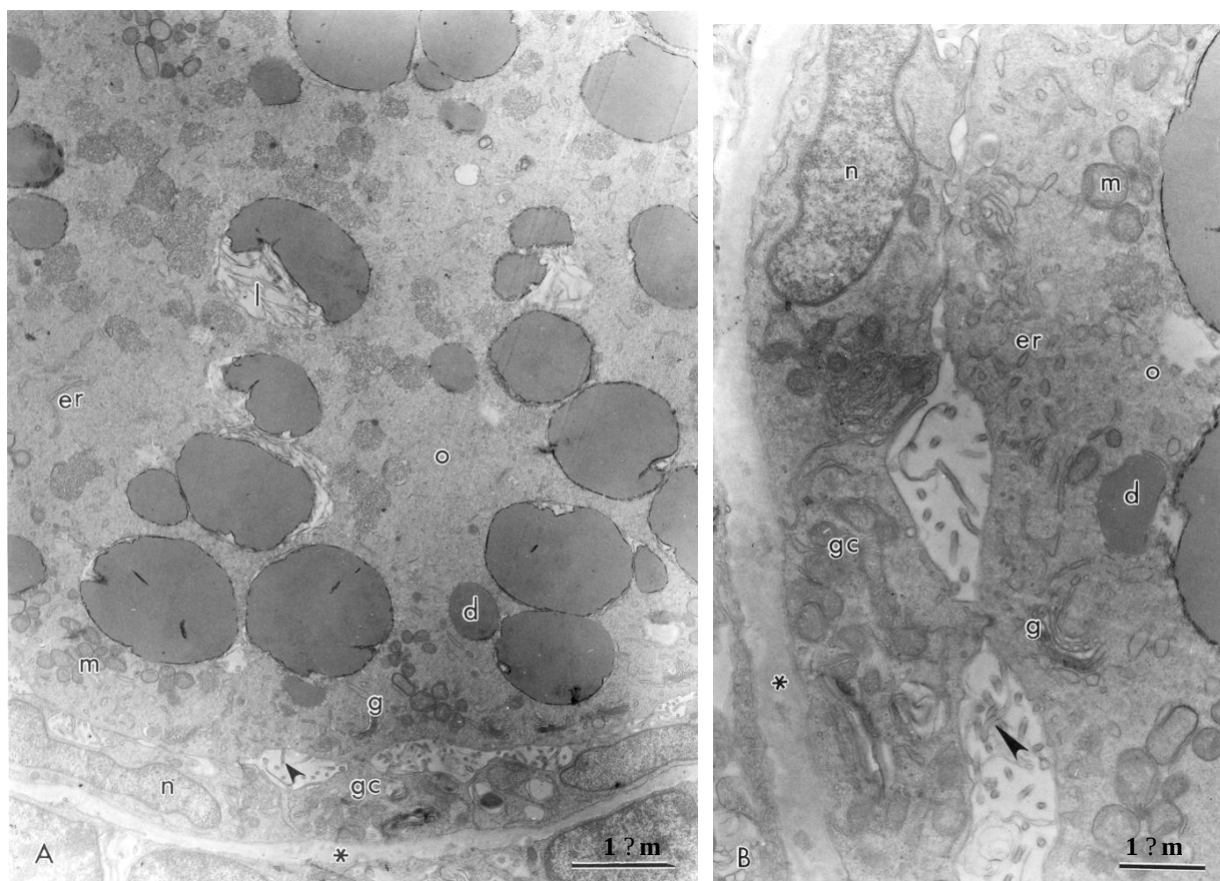


Figura 3A e 3B. Análise ultraestrutural de tecido ovariano fresco (grupo controle): o: oócito; n: núcleo; gc: célula da granulosa; m: mitocôndria; er: retículo endoplasmático; d gotas de lipídeo; g: complexo de Golgi; *: membrana basal; cabeça da seta: vilos (A: 4800x; B: 11200x).

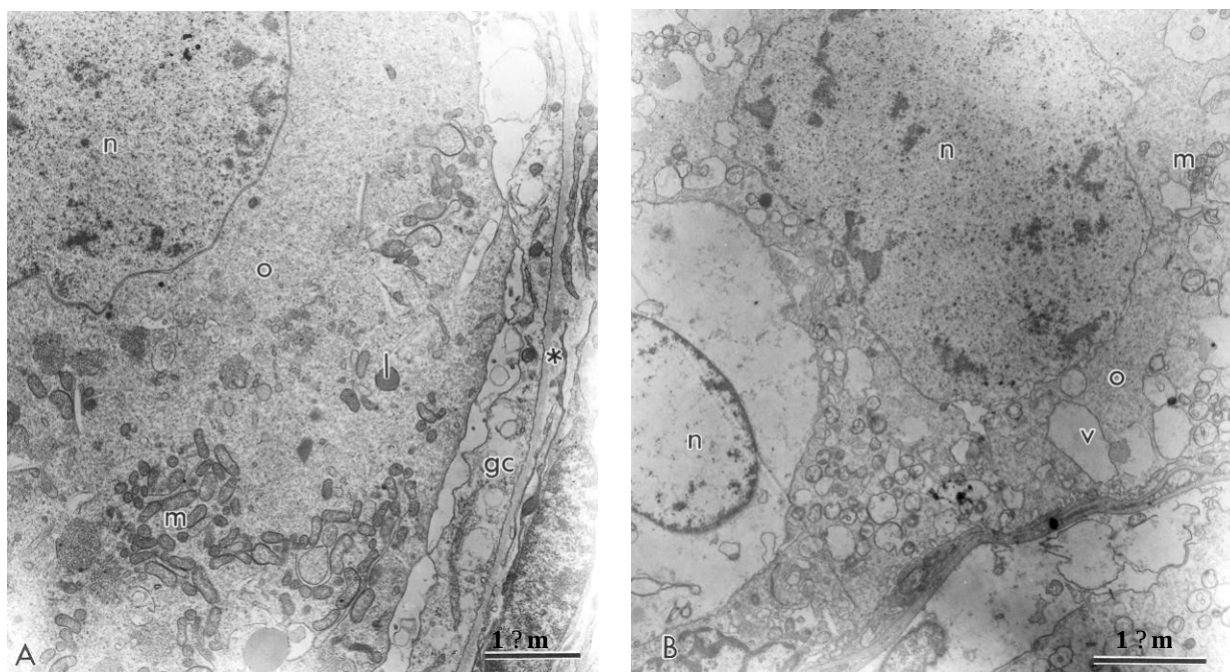


Figura 4. Análise ultra-estrutural de tecido ovariano exposto ao DMSO (Fig 4A) e ao GLI (Fig 4B): o: oócito; n: núcleo; gc: célula da granulosa; m: mitocôndria; v: vesículas *: membrana basal; (A: 4800x; B: 11200x).

Neste trabalho, folículos de gata *in situ*, expostos ao GLI durante 20 min, a uma temperatura de 20°C, apresentaram sinais de degeneração, quando avaliados por HC e MET, o que sugere um efeito tóxico deste crioprotetor ainda durante o período de equilíbrio. Também se observou uma diminuição significativa no percentual de FPA isolados viáveis após exposição ao GLI, nas mesmas condições citadas anteriormente, avaliados pela coloração vital. Este resultado confirma um efeito tóxico do crioprotetor, além da sua baixa capacidade de penetração, fatores estes que corroboram para o insucesso de sua utilização para a criopreservação de FPA felinos.

É conhecido que o GLI é menos penetrante que outros agentes crioprotetores como o EG (NEWTON *et al.*, 1996). Além disso, sabe-se também que o GLI é relativamente viscoso, podendo ou não penetrar eficientemente, nas células ou tecido (NEWTON, 1998), portanto, quando a concentração do GLI é aumentada, a sua permeabilidade torna-se reduzida. A baixa permeabilidade das células ao GLI pode aumentar os riscos de estresse osmótico durante a descongelação e remoção do crioprotetor, pois a entrada da água nas células ocorre muito mais rapidamente do que a saída do GLI (CANDY *et al.*, 1997).

8.2.2. Criopreservação de FPA felinos *in situ*

Foram contados 900 folículos. No grupo controle, 97,3% ($29,2 \pm 1,1$) dos FPA apresentavam-se normais (Fig. 5A). Após a descongelação, houve uma redução significativa em todos os tratamentos, em relação à viabilidade folicular, onde 60% ($18 \pm 2,1$), 55,3% ($16,6 \pm 5,8$), 47,3% ($14,2 \pm 3,8$) e 39,3 ($11,8 \pm 6,4$) apresentavam-se viáveis, quando criopreservados *in situ*, utilizando DMSO, EG, PROH e GLI, respectivamente. Vale ressaltar que o percentual de FPA viáveis referentes à criopreservação utilizando DMSO e EG não diferiu entre si, sendo estes valores significativamente superiores àquele encontrado quando se utilizou o PROH e o GLI, os quais também não diferiram entre si, sendo estes significativamente superiores apenas ao percentual de FPA viáveis observados após a criopreservação de FPA sem o uso de crioprotetor (26%; $7,8 \pm 1,5$ – Tab. 5 – Fig. 5B).

Tabela 5. Número médio e percentual de FPA normais *in situ* após a criopreservação utilizando diferentes crioprotetores.

FPA normais criopreservados <i>in situ</i>		
Tratamentos	Média $\pm$ SD	Percentual (%)
Controle	$29,2 \pm 1,1^A$	97,3%
DMSO	$18,0 \pm 2,1^B$	60,0%
EG	$16,6 \pm 5,8^B$	55,3%
PROH	$14,2 \pm 3,8^C$	47,3%
GLI	$11,8 \pm 6,4^C$	39,3%
MEM	$7,8 \pm 1,5^D$	26,0%

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

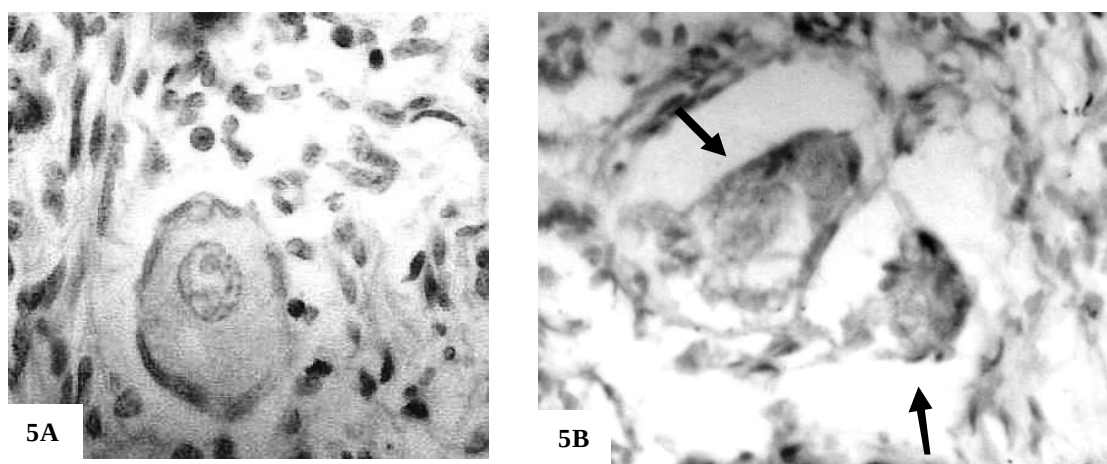


Figura 5. Análise histológica de tecido ovariano de gata: (A) folículo normal criopreservado com EG e (B) folículo pré-antral degenerado criopreservado sem crioprotetor - seta (400x).

Através da análise das micrografias, foi observado que os FPA pertencentes ao grupo controle apresentavam-se com morfologia intacta, com membrana basal íntegra, o citoplasma apresentava um grande número de mitocôndrias, sem sinais de degeneração, apresentando vacuolização discreta e grandes vesículas armazenadoras de lipídeos, e o oócito apresentava-se morfologicamente normal. Já os FPA criopreservados com DMSO, EG ou PROH apresentavam, em alguns folículos avaliados, presença de vacuolização do citoplasma das células da granulosa, além da fragmentação das gotas de lipídeo, e acúmulo de material eletrondenso. Quando os FPA foram expostos ao GLI, estes apresentaram retração oocitária e intensa vacuolização em todo o citoplasma do oócito e das células da granulosa. É importante mencionar que a membrana basal de todos os FPA avaliados, em todos os tratamentos, apresentava-se íntegra.

Este trabalho descreve um estudo histológico e ultraestrutural da criopreservação de folículos de preantral de gatas inclusos em tecido ovariano, utilizando DMSO, EG, PROH e GLI como crioprotetores a 1,5 M. De acordo com nosso resultado, houve uma redução significativa no percentual de FPA normais depois da criopreservação. No entanto, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou o DMSO e EG a 1,5 M. Este fato foi confirmado pela manutenção da integridade do tecido ovariano após o uso desses crioprotetores.

Quase todas as estratégias de criopreservação estão baseadas em dois fatores principais: crioprotetores e curvas de congelação-descongelação. As curvas tradicionais podem ser interpretadas como uma tentativa de criar um equilíbrio delicado entre vários fatores (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). Então, o uso de agentes crioprotetores para melhorar a sobrevivência de células e tecidos durante a criopreservação, e controlar os efeitos letais da concentração de sal extracelular, gelo intracelular e gelo na matriz de tecidos foram estudados para prevenir danos (ELMOAZZEN *et al.*, 2005). Comparado com uma única célula em suspensão, a criopreservação de tecido apresenta pontos críticos físicos sérios, principalmente no que se refere à transmissão de calor para reaquecer o tecido (KARLSSON *et al.* 1994). Além disso, devido à estrutura multicelular e as interações de célula-célula já conhecidas dentro do ovário, deve-se levar em consideração a dinâmica de permeabilidade do crioprotetor dentro e fora do tecido.

Quando tecido é colocado em solução crioprotetora hiperosmótica, a água é retirada das células e se acumula nos espaços extracelulares e nos vasos sanguíneos. O destino desta água é a formação de grandes cristais de gelo, o qual pode prejudicar o tecido durante a criopreservação e a descongelação subsequente. Sendo assim, espera-se que folículos primordiais sejam mais capazes de sobreviver a esse procedimento por causa do seu menor tamanho e não existência de fluido de folicular (AGCA, 2000).

Em uma primeira tentativa de criopreservar FPA felino isolado, JEWGENOW & GÖRITZ (1995) usando uma curva de congelação lenta com DMSO, obteve apenas 12% de FPA isolados intactos após a descongelação. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa (JEWGENOW *et al.*, 1998) comparou DMSO e PROH para criopreservar FPA felinos e observou que 19% de folículos sobreviveram usando ambos os crioprotetores. Em cabras, o uso de DMSO ou EG à concentração de 1,5 M, para criopreservar FPA *in situ*, mostrou 26% e 31% de PAF normal após a descongelação, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2004). Porém, quando SANTOS *et al.* (2006) criopreservaram FPA de ovelhas, utilizando esses mesmos crioprotetores, estes autores observaram 67.6% e 59.6% de FPA normal, respectivamente. Resultados preliminares deste trabalho foram publicados, onde 58% de FPA criopreservados *in situ* utilizando EG apresentavam-se normais após a descongelação (LIMA *et al.*, 2006). Vários autores optaram por usar DMSO para criopreservar oócitos devido à alta permeabilidade celular. Neste trabalho, esse efeito pôde ser confirmado. Em contraste, o GLI mostrou baixos resultados com relação ao seu efeito crioprotetor. Este fato pode estar relacionado à baixa permeabilidade do GLI, quando comparado aos outros agentes crioprotetores (FUKU *et al.*, 1992). Recentemente, realizou-se a criopreservação de tecido ovariano de gata seguido por xenotransplante para ratos imunodeficientes. Embora apenas

10% dos folículos tenham sobrevivido depois da descongelação e transplante (BOSCH *et al.*, 2004), este resultado demonstra que o córtex ovariano de gatas pode sobreviver à criopreservação e xenotransplante (LUVONI, 2006).

Neste trabalho, a análise ultraestrutural de FPA criopreservados com EG, por exemplo, mostrou perda de conteúdo celular e grandes áreas vazias no citoplasma do oócito. Foram descritos resultados semelhantes em caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004) e ovinos (SANTOS *et al.*, 2006), quando FPA foram criopreservados usando EG, no qual se observou um número reduzido de mitocôndrias e numerosas vesículas no oócito, com a presença de grandes vacúolos. Estes vacúolos podem representar mitocôndrias alteradas como observado em oócitos bovinos criopreservados (FUKU *et al.*, 1995; LUCCI *et al.*, 2004). Mitocôndrias com extensa tumefação e desaparecimento das cristas, como também o volume aumentado do retículo endoplasmático, são os primeiros sinais de degeneração em FPA caprinos (SILVA *et al.*, 2001). A análise ultraestrutural de FPA ovinos criopreservados, utilizando 1,5 M DMSO, demonstrou que apenas utilizando este crioprotetor, os FPA se mostraram normais (SANTOS *et al.*, 2006) e esses resultados confirmam os observados neste trabalho. Em nossos estudos, FPA do grupo controle e aqueles criopreservados utilizando DMSO continham vesículas que apresentavam tamanhos diferentes. Em uma primeira descrição da análise ultraestrutural de FPA felinos, foram observadas características semelhantes ao deste estudo, em FPA de tigre siberiano e leão (JEWGENOW & STOLTE, 1996). O oócito de gato doméstico possui um alto conteúdo de gotículas de lipídio no citoplasma (GURAYA, 1965), o que pode tornar mais baixa a permeabilidade do oócito à solução crioprotetora em relação a outras espécies (VAN DER ELST *et al.*, 2003). A presença das gotículas de lipídio intracelulares pode ser responsável por uma formação de gelo intracelular desigual, o que poderia afetar o processo de congelação e descongelação (LUVONI, 2006). Assim, observou-se que a criopreservação de fragmentos de tecido ovariano acarreta danos morfológicos aos FPA felinos *in situ* em todos os crioprotetores utilizados, apresentando graus variados de comprometimento, sendo necessários novos estudos para verificar se os FPA criopreservados ainda seriam capazes de retomar seu desenvolvimento após a criopreservação.

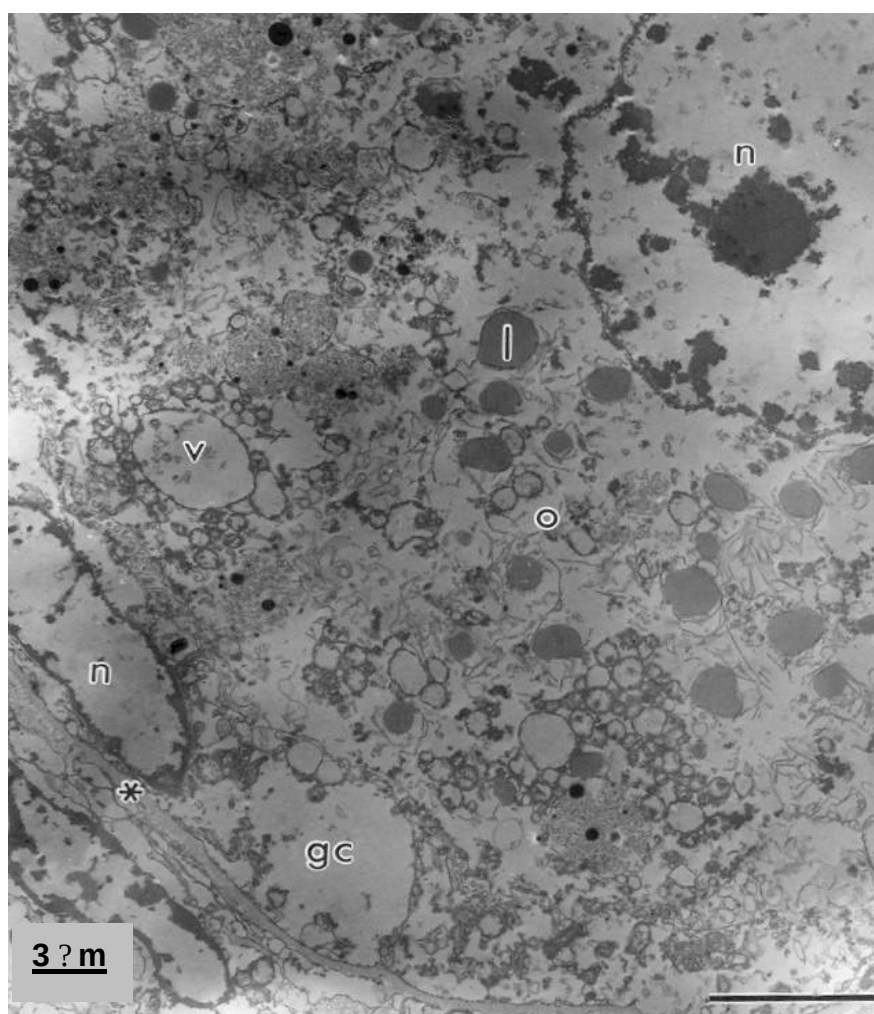


Figura 6. Análise ultraestrutural de tecido ovariano criopreservado com DMSO: o: oócito; n: núcleo; gc: célula da granulosa; v: vesículas; l: gotas de lipídeo; *: membrana basal (4800x).

8.3. Conclusão

Com base nesses resultados, podemos concluir que os crioprotetores EG, DMSO e PROH possuem atividade semelhante durante o período de exposição e que o GLI reduz o percentual de FPA normais ainda no período de equilíbrio. Além disso, FPA felinos *in situ* podem ser criopreservados utilizando o DMSO e o EG.

9. **CAPÍTULO IV**

Cultivo de folículos ovarianos pré-antrais *in situ* criopreservados de gata doméstica.

9.1. Material e Métodos

9.1.1. Efeito da exposição dos folículos pré-antrais felinos *in situ* aos crioprotetores

9.1.1.1. Coleta e transporte do tecido ovariano

Nesta etapa, foram utilizados 10 ovários de gatas adultas SRD, coletados cirurgicamente, lavados e mantidos em solução salina por até 10 minutos.

9.1.1.2. Exposição aos crioprotetores dos FPA felinos *in situ*

Cada par ovariano foi dividido em seis fragmentos de 3 mm aproximadamente. Imediatamente após a coleta, um fragmento tomado aleatoriamente foi fixado em formol a 10% por um período de até 24 horas para análise histológica, constituindo o Tratamento Controle. Os cinco fragmentos restantes foram equilibrados a 20°C por um período de 20 min, na ausência de crioprotetor ou na presença de EG e DMSO, na concentração de 1,5 M. Ao término dos 20 min, os fragmentos foram lavados em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino para remoção do crioprotetor e fixados para análise histológica e ultraestrutural. Após a remoção do crioprotetor, os fragmentos ovarianos foram cultivados por 1 e 5 dias, e ao final desse período, foram fixados para histologia clássica (HC) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Todos os tratamentos foram testados cinco vezes.

9.1.2. Criopreservação dos FPA felinos *in situ*

Foram utilizados dez ovários, obtidos por ovariosalpingohisterectomia, de cinco gatas adultas. No laboratório, os ovários foram fragmentados e imediatamente após a coleta um fragmento foi fixado para análise histológica (grupo controle). O restante dos fragmentos foi equilibrado a 20°C por 20 min, utilizando EG e DMSO e após esse período, foram submetidos a uma velocidade de resfriamento de 2°C/min a -7°C, quando foi realizado o *seeding*. Em seguida, a temperatura foi reduzida a 0,3°C/min até atingir -30°C, e a 0,15°C/min até -33°C/min, quando então, os criotubos foram removidos do freezer e mergulhados em nitrogênio líquido, no qual permaneceram estocados por uma semana. Para a descongelação, os criotubos foram rapidamente expostos à temperatura em torno de 28°C por 1 min e, então, imersos em banho-maria a 37°C por um período de 3 a 5 min, e logo após foi realizada a remoção do crioprotetor, quando os fragmentos foram submetidos a três lavagens sucessivas em MEM, a intervalos de cinco minutos.

9.1.3. Cultivo *in vitro* de FPA *in situ*

Os fragmentos obtidos do período de equilíbrio, e após serem descongelados foram cultivados individualmente em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultivo em estufa a 39°C com 5% de CO₂ na presença de ar. O meio de base utilizado no cultivo foi o Meio Essencial Mínimo (MEM) (Osmolaridade: 300 mOsm/L, pH: 7,2 – Sigma, St Louis, MO, USA), suplementado com antibióticos (100µg/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina) e antimicótico (0,25µg/mL de anfotericina), ITS (6,25 µg/mL de insulina, 6,25 µg/mL de transferrina e 6,25ng/mL de selênio), 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 1,25 mg/mL de BSA. Foram cultivados os fragmentos ovarianos criopreservados utilizando DMSO e EG durante 1 e 5 dias.

9.1.4. Análise histológica de folículos pré-antrais felinos

Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados, diafanizados, incluídos em blocos de parafina e seccionados seriadamente à espessura de 7 µm. Cada 5ª secção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina. Somente foram analisados os folículos pré-antrais cujos oócitos apresentaram o núcleo evidente na secção observada.

9.1.5. Análise ultra-estrutural de FPA felinos

Imediatamente antes da fixação para análise histológica, foi retirado 1/6 de cada fragmento ovariano, o qual foi fixado em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2%) em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,3), pós-fixado em tetróxido de ósmio (1%), desidratado e incluído em Spurr. Cortes semi-finos (3 µm) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio óptico. Os cortes ultra-finos (70 nm) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

9.1.6. Análise estatística

A porcentagem de folículos morfologicamente normais entre os diferentes tratamentos foi comparada pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$).

9.2. Resultados e Discussão

Foram avaliados 1.650 FPA *in situ* após o cultivo. O grupo controle apresentou uma média de $27,0 \pm 0,7$ FPA normais (90%). Após avaliação de fragmentos de tecido fresco, cultivado por um dia (87%), verificou-se não haver diferença significativa do grupo controle. Entretanto, o cultivo após 5 dias (71%) reduziu significativamente o número de FPA normais ($p < 0,05$). Após a exposição aos crioprotetores DMSO e EG e cultivo por um e cinco dias, observou-se que a média de FPA normais (Tab. 1) foi significativamente inferior ao controle.

O cultivo de FPA inclusos em tecido ovariano, criopreservados com EG (40%) durante cinco dias, reduziu significativamente o percentual de FPA normais, quando comparado com a percentagem de FPA criopreservados com o DMSO (56%).

Tabela 6. Número médio e percentual de FPA normais *in situ* após a criopreservação com DMSO e EG, cultivados durante 1 e 5 dias.

FPA normais criopreservados <i>in situ</i>		
Tratamentos	Média $\pm$ DP (Percentual)	
	DIA 1	DIA 5
Controle (Co)	$27,0 \pm 0,7^a$ (90%)	—
Co Cultivado	$26,2 \pm 0,8^{aA}$ (87%)	$21,2 \pm 0,8^{bB}$ (71%)
Exp. DMSO	$24,8 \pm 0,8^{bA}$ (82%)	$21,4 \pm 1,1^{bB}$ (71%)
Exp. EG	$21,8 \pm 1,3^{cA}$ (72%)	$18,4 \pm 1,8^{cB}$ (68%)
Crio. DMSO	$19,4 \pm 1,1^{dA}$ (64%)	$16,8 \pm 0,8^{cdB}$ (56%)
Crio. EG	$16,8 \pm 1,9^{eA}$ (56%)	$12,2 \pm 2,3^{eB}$ (40%)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as linhas ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as colunas ($P < 0,05$).

Estes resultados foram confirmados qualitativamente pela análise ultra-estrutural dos FPA (Fig. 1) através do qual foi possível avaliar um FPA pertencente ao grupo controle, no qual se observa a integridade folicular, o qual apresentava morfologia intacta, com membrana basal íntegra; o citoplasma apresentava um grande número de mitocôndrias, sem sinais de degeneração, apresentando vacuolização discreta e grandes vesículas armazenadoras de lipídeos; o oócito apresentava-se morfológicamente normal. Vale ressaltar que essas mesmas características foram observadas nos FPA criopreservados com DMSO (Fig. 2). Entretanto,

após a criopreservação com EG (Fig. 3), observou-se a presença de vacuolização do citoplasma das células da granulosa, além da fragmentação das gotas de lipídeo, e acúmulo de material eletrondenso.

SANTOS (2005), cultivando FPA ovinos após criopreservação com DMSO e EG, observou que percentual de FPA normais diminuiu significativamente do primeiro para o quinto dia de cultivo, tanto em FPA apenas expostos aos crioprotetores, quanto naqueles criopreservados. Nosso trabalho apresentou resultados similares (Tab. 6).

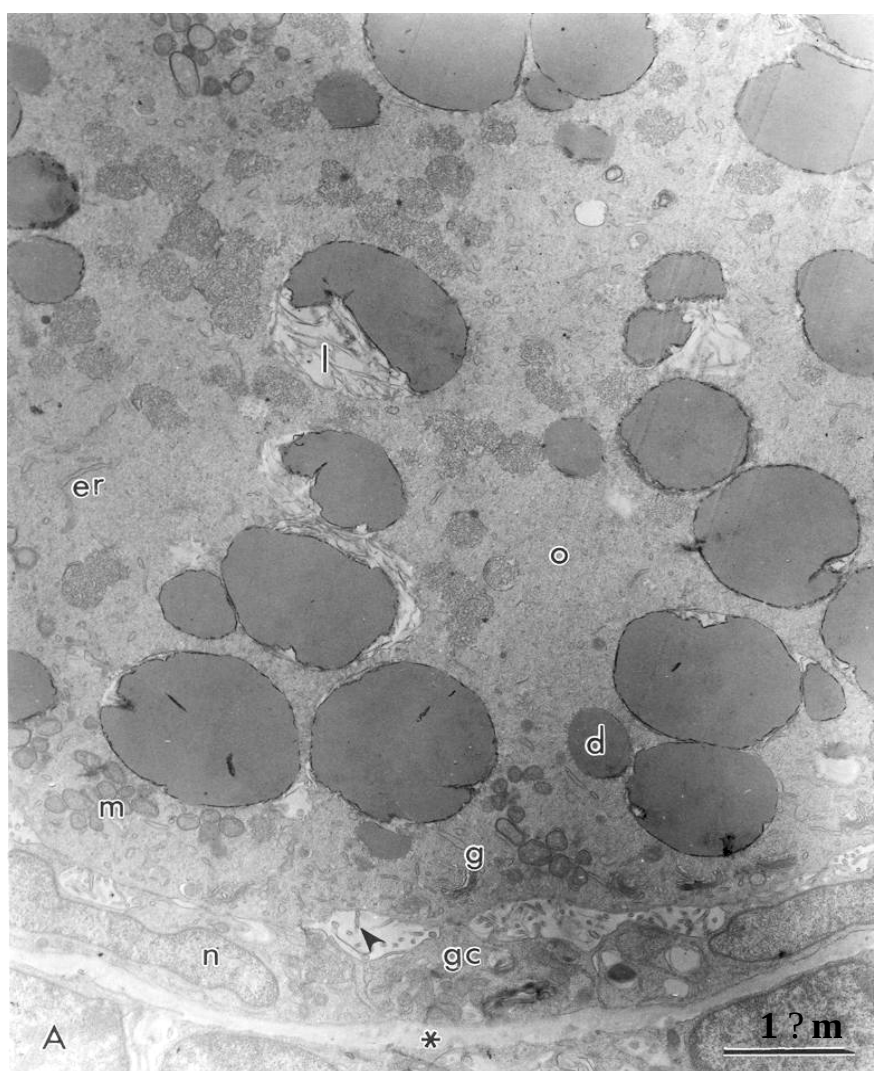


Figura 7. Análise ultraestrutural de tecido ovariano fresco. o: oócito; n: núcleo; gc: célula da granulosa; m: mitocôndria; er: retículo endoplasmático; l: gotas de lipídeo; g: complexo de Golgi; *: membrana basal (4800x).



cg

m

Figura 8. Análise ultraestrutural de tecido ovariano criopreservado com DMSO e cultivado por 5 dias: cg: célula da granulosa; m: mitocôndria; (4800x).

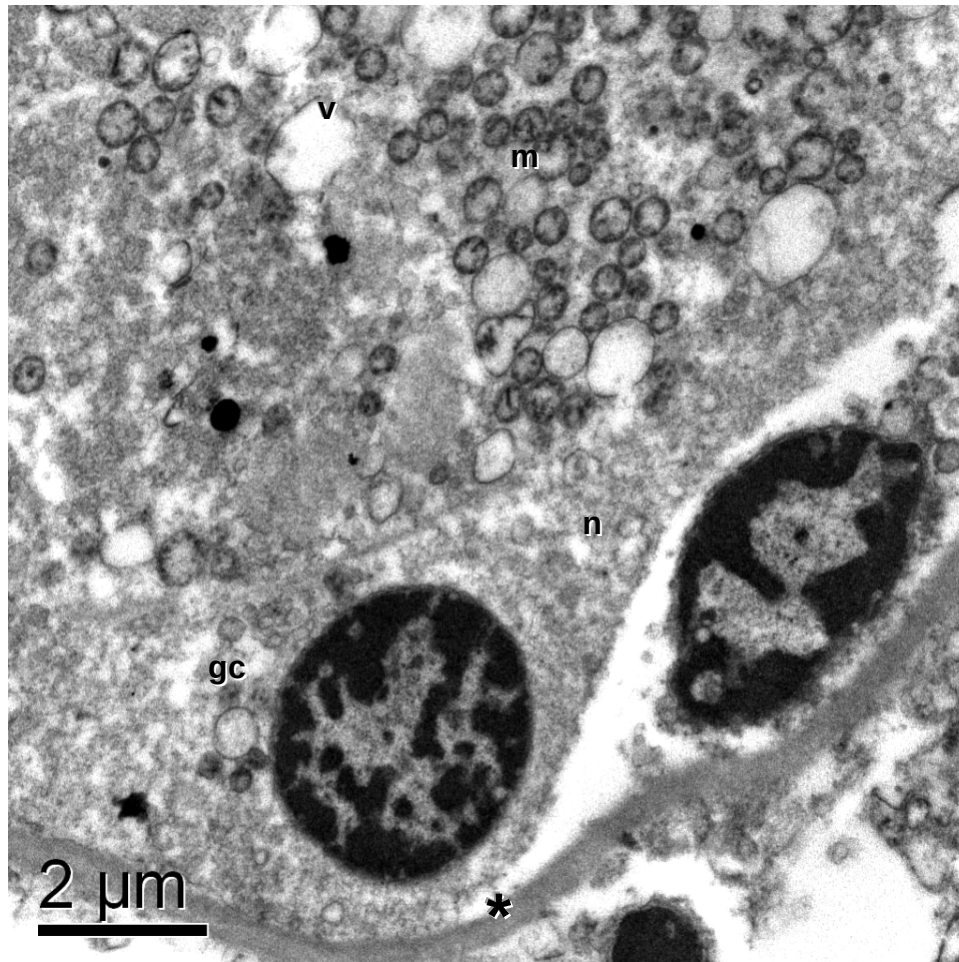


Figura 9. Análise ultraestrutural de tecido ovariano criopreservado com EG e cultivado por 1 dia. n: núcleo; gc: célula da granulosa; m: mitocôndria; v: vesículas; *: membrana basal (4800x).

Neste trabalho, foi possível constatar que o cultivo por mais de um dia acarreta danos aos FPA, independente deste ter sido criopreservado ou não. PINCTON & GOSDEN (2000) relataram que folículos primordiais e primários tendem a degenerar após poucos dias de cultivo. Até o presente, os sistemas de cultivo desenvolvidos não são capazes de promover o desenvolvimento *in vitro* de folículos normais. Foram testados diversos meios de cultivo, fatores de crescimento, suplementos de soro, mas a degeneração ocorre em poucos dias (JEWGENOW & PARIS, 2006).

9.3. Conclusão

Com base nos resultados observados, concluiu-se que o DMSO é o crioprotetor mais indicado para criopreservação de FPA felinos com posterior cultivo.

10. Conclusões Gerais

- ✍ A população folicular de gatas domésticas apresenta características similares a outras espécies de mamíferos domésticos, sendo constituída em sua grande maioria folículos primordiais;
- ✍ Os crioprotetores EG, DMSO e PROH possuem atividade semelhante durante o período de exposição, tanto *in situ* quanto na forma isolada;
- ✍ O GLI reduz o percentual de FPA normais isolados e *in situ* durante o período de exposição (equilíbrio) na metodologia adotada;
- ✍ FPA isolados de gata doméstica podem ser criopreservados utilizando EG, DMSO ou PROH, havendo manutenção de integridade folicular;
- ✍ FPA felinos *in situ* podem ser criopreservados utilizando o DMSO e o EG, com manutenção da ultra-estrutura folicular;
- ✍ O DMSO é o crioprotetor mais indicado para criopreservação de FPA felinos com posterior cultivo *in vitro*, segundo a metodologia adotada.

11. Perspectivas

Com os resultados obtidos no presente trabalho é possível formular as seguintes perspectivas:

- ? Verificar se a vitrificação de FPA seria uma alternativa que possibilitaria melhores resultados no que se refere ao percentual de FPA viáveis após a criopreservação;
- ? Verificar se um cultivo a longo prazo seria capaz de manter a viabilidade dos FPA;
- ? Testar a utilização do transplante de fragmento de tecido ovariano como ferramenta para o cultivo *in vivo*.
- ? Uma vez estabelecido o melhor protocolo de criopreservação, utilizar a MOIFOPA como uma alternativa para a conservação do material genético dos felídeos silvestres.

Uma vez que foram constatadas similaridades filogenéticas existentes entre as espécies silvestres e o gato doméstico, a possibilidade de utilizar esses resultados em prol da conservação destas espécies é uma perspectiva promissora. Assim, este trabalho vem a contribuir de forma significativa para formação de bancos de material genético de felídeos, contribuindo com a manutenção da variabilidade genética desses animais.

12. Referências Bibliográficas

- AGCA, Y. Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue. ILAR Journal v. 41, p. 207-220, 2000.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethylsulfoxide. Fertil. Steril v. 79, p. 682-686, 2003.
- ASADA, M.; HORRI, M.; MOGO, T.; FUKUI, Y.; ISHIKAWA, H.; OHSUMI, S. In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Biol. Reprod. v. 62, p. 253-259, 2000.
- AURICHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 168p 1995.
- BAHADUR G, STTELE SJ. Ovarian tissue cryopreservation for patients. Hum. Reprod. v. 11, p. 2215-2216, 1996.
- BAIRD, D. T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; HARKNEWS, 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.
- BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. J. Anat. v. 100, p. 761- 766, 1966.
- BARONE, M. A., WILDT, D. E., BYERS, A. P., ROELKE, M. E., GLASS, C. M., HOWARD, J. G. Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). J. Reprod.Fertil. v. 101, p. 103–108, 1994.
- BEARDEN, H. J. & FUQUAY, J. W. **Applied Animal Reproduction**. 4^a ed. Prentice Hall. 351p. 1997.
- BEM, A. R.; RUMPF, R.; SOUSA, R.V. A biotecnologia animal, pesquisas e resultados no CENARGEN In: I Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos, ANAIS: p. 12-27. 1995.
- BEZERRA, M. B., RONDINA, D., OLIVEIRA, L. C., LIMA, A. K. F., CECCHI, R., LUCCI, C. M., GIORGETTI, A., FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. Ciência Animal v. 8 p. 47-56, 1998.
- BOLAMBA, D, BORDEN-RUSS, K. D., DURRANT, B. S. In vitro maturation of domestic dog oocyte cultured in advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology v. 49, p. 933-942, 1998.
- BOSCH, P., HERNANDEZ-FONSECA, H.J., MILLER, D.M., WININGER, D.J., MASSEY, J. B., LAMB, S.V., BRACKETT, B.G. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. Theriogenology v. 61, p. 581–94, 2004.

BRASILEIRO FILHO, G., PEREIRA, F.E.L., PITTELLA, J.E.H., BAMBIRRA, E.A., BARBOSA, A.J.A. **Bogliolo - Patologia Geral**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 220 p., 1993.

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

CAHILL, L. P., MARIANA, J. C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *Journal of Reproduction and Fertility* v. 55, p. 27-36, 1979.

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

CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG, MERRIMAN JA, CHOUDHURY NC. Cryopreservation of immature mouse oocytes. *Hum. Reprod.* v. 9, p. 1738-1742, 1994.

CARROL J, WHITTINGHAM DG, WOOD MJ. Growth in vitro and acquisition of meiotic competence after the cryopreservation of isolated mouse primary ovarian follicles. *Reprod. Fertil. Dev.* v.3, p.593-599, 1991.

CARROLL J, WHITTINGHAM D.G., WOOD M.J., TELFER E, GOSDEN R.G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fert.* v. 90, p. 321-327, 1990.

CECCONI, S., BARBONI, B., COCCIA, M. & MATTIOLI, M I vitro development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod.*, v. 60, p. 594-601, 1999.

CORTVRINDT R, SMITZ J, van STEIRTEGHEM AC. A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. *Hum. Reprod.* v.11, p. 2648-2655, 1996.

DANIEL, A. J., ARMSTRONG, D. T. & GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocyte in vitro. *Gam. Res.*, v. 24, p. 109-121, 1989.

DE LA VEGA AC, WILDE OR. Fundamentos biológicos de la criopreservación. *Ver. Arg. Prod. Anim.* v.11, p.151-165, 1991.

DMSO: O que é? Acesso em <<http://br.answers.yahoo.com/question/index?qid=20061103184521AAIUBy>> em Novembro de 2006.

DOBRINSKY RJ. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* v. 45, p. 17-26, 1996.

DOMINGUES, S. F. S. Isolamento mecânico e estudo histológico de folículos ovarianos em primatas não-humanos da espécie *Cebus apella* (macaco-prego). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 83 p (Dissertação de Mestrado) 2000.

DONOGHUE, A.M., JOHNSTON, L.A., SEAL, U.S, ARMSTRONG, D.L., TILSON, R.L., WOLF, P., PETRINI, K., SIMMONS, L.G., GROSS, T., WILDT, D.E. In vitro fertilization and

embryo development in vitro and in vivo in the tiger *Panthera tigris*. Biol. Reprod. v. 43, p. 733–744, 1990.

DRIANCOURT M. A, CAHILL L. P, BINDON B. M. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. J Reprod Fertil. v. 73, p. 93-107, 1985.

DURRANT, B. S., PRATT, N.C., BORDEN-RUSS, K. D., BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology v. 49, p. 917-932, 1998.

DUVALL, E., WYLLIE A H., MORRIS, R. G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology v. 56, p. 351-358, 1985.

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

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. Journal Animal Science v. 25, p. 800-805, 1966.

ERICKSON, B. H; REYNOLDS, R. A; MURPHREE R. L. Late effects of 60 Co gamma radiation on the bovine oocyte as reflected by oocyte survival, follicular development, and reproductive performance. Radiat Res. v. 68, p. 132-137, 1976a.

ERICKSON, B. H; REYNOLDS, R. A; MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. Biol Reprod. v. 15, p. 555-560, 1976b.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. IN: Seminars and Reproductive Endocrinology, San Diego – Califórnia, p. 233 – 254, 1986.

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

FIGUEIREDO JR, AMORIM CA, LUCCI CM, GONÇALVES PBD. Isolation and in vitro culture of ruminant preantral follicles. Arq. Fac. Vet. UFRGS, v. 27, p. 11-31, 1999.

FIGUEIREDO, J. R Isolement, caractérisation et culture de follicules pré-antraux chez les bovins. Université de Liège, Liège-Belgique, 113 p.(Tese de doutorado) 1995.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C. J., VAN DEN HURK, R., ECTORS, F.J., FONTES, R. S., NUSGENS, B., BEVER, M. M, BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. Theriogenology, v. 40, p. 789-799, 1993.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. Biology of Reproduction v. 50 p. 225-232, 1994.

FUKU E., KOJIMA T., SHIOYA Y., MARCUS G.J., DOWNEY B.R. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. Cryobiology v. 29, p. 485-92, 1992.

FUKU, E., XIA, L., DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* v. 32, p.139–156, 1995.

FULTON, R.M., KESKINTWEPE, L., DURRANT, B.S., FAYRER-HOSKEN, R.A. Intracytoplasmic sperm injection ICSI for the treatment of canine infertility. *Theriogenology* v. 49, p. 366, 1998.

GEORGE, M.A.; JOHNSON, M.H.; HOWLETT, S.K. Assessment of the developmental potential of frozen-thawed mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, v. 9, p.130-136, 1994.

GLICERINA. Acesso em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glicerina>> em Novembro de 2006.

GORDON, I. Prenatal development of bovine ovary. IN: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB, International: Ravon Press, p. 43-49, 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. *Hum. Reprod.* v. 9, p. 597-603, 1994.

GOUGEON, A. & CHAINY, G. B. N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fert.* v. 81, p. 433-422, 1987.

GOUGEON, A. & LEFREVE, B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *Journal of Reproduction and Fertility.* v. 69, n. 2, p. 497-502, 1983.

GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod. Fertil.* v. 87, p. 561-571, 1989.

GUNDERSEN, H.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T. The new sterological tools: dissector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* v. 96, p. 857-881, 1988.

GURAYA, SS. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. *J. Exp. Zool.* v. 160, p. 126-136, 1965.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 6^a ed, São Paulo, Manole, 582p. 1995.

HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol. Reprod.* v. 38, p. 1181-1188, 1988.

HOFFERT, K.A., ANDERSON, G.B., WILDT, D.E., ROTH, T. Transition from maternal to zygotic control of development in IVMrIVF domestic cat embryos. *Mol. Reprod. Dev.* v. 48, p. 208–215, 1997.

HOLST, P.A., PHEMISTER, R.D. The prenatal development of the dog. Preimplantation events. *Biol. Reprod.* v. 5, p. 771–779, 1971.

HOORNAERT, S., HANON, J., LYAKU, J., PASTORET, P. P. The Use of Annexin for Concomitant Detection of Apoptosis and Cellular Phenotype. *Biochemica* v. 3, p. 19-20, 1997.

HOVATTA, O. Cryopreservation and culture of human primordial ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 169, p. 95–97, 2000.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; KRAUSZ, T.; ABIR, R.; MARGARA, R.; TREW, G.; LASS, A.; WINSTON, R.M.L. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants; *Hum. Reprod.* v.11, p.1268-1272, 1996.

HULSHOF, S. C. J., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. F., BEVERS, M. M., VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary Quarterly* v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility* v. 24, p. 39-54, 1987.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; RAHIMI, G.; NAWROTH, F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* v. 108, p. 186–19, 2003.

IUNC acesso em: www.iucnredlist.org em Outubro de 2006.

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

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.* v. 44, p. 183–193, 1996.

JEWGENOW, K.; WOOD, T. C.; WILDT, D. E. DNA degradation in mural granulosa cells of non-and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries. *Mol. Reprod. Dev.* v. 48, p. 350-355, 1997.

JEWGENOW, K. & FICKEL, J. Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biology of Reproduction* v. 60, p. 522-526, 1998.

JEWGENOW, K. & GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. *Animal Reproduction Science* v. 39, p. 285-297, 1995.

JEWGENOW, K. & PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology* v. 39, n. 2, p. 527-535, 1993.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology* v. 49, p. 1567-1577, 1998.

JEWGENOW, K.; PARIS, C. J Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology* v. 66, p 93-100, 2006.

JOHNSTON, L.A., DONOGHUE, A.M., O'BRIEN, S.J., WILDT, D.E. Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. *J. Exp. Zool.*, v. 2057, p. 350–359, 1991.

- JONES J.R., H.W.; VEECK, L.L.; MUASHER, S.J. Cryopreservation: the problem of evaluation. Hum. Reprod. v. 10, n. 8, p. 2136-2138, 1995.
- KARJA, N. W.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FAHRUNDIN, M.; SUZUKI, T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. Theriogenology v. 57, n. 9, p. 2289-2298, 2002.
- KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W., HOXTER, G. **Patobioquímica**, 1ª ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 321p., 1982.
- KARLSSON, J. M., CRAVALHO, E.G., TONER, M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cell during freezing. J Appl Phys v. 75, p. 4442-4452, 1994.
- KERR, J. R. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British Journal of Cancer v. 26, p. 239-257, 1972.
- LAMARA, A.; FIENI, F., MSELL-FLAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis–encephalitis virus in goat granulosa cells. Virus Res. v.79, p. 165–172, 2001.
- LIM, J. M.; KO, J. J.; HWANG, W. S.; CHUNG, H. M.; NIWA, K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. Theriogenology v.51, p.1303-1310, 1999.
- LIMA, A. K. F.; SILVA, A. R.; SANTOS, R. R.; SALLES, D. M.; EVANGELISTA, A. F.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, L. D. M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. Theriogenology v. 66, p. 1664–1666, 2006.
- LIMA, A. K. F. BEZERRA, M. B.; OLIVEIRA, L. C.; FIGUEIREDO, J. R. SILVA, L. D. M. Isolamento e caracterização de folículos ovarianos pré-antrais em gatas domésticas (*Felis catus*). Rev Bras Reprod Anim. v. 27, n. 3, p.396–397, 2003.
- LIMA, A. K. F.; CRISÓSTOMO, F. S. M.; FIGUEIREDO, J. R.; TEIXEIRA, M. F. S. Recuperação de Folículos Pré-Antrais a partir de Ovários Ovinos Adultos Utilizando Associação de um Método Enzimático a um Procedimento Mecânico de Isolamento. Ciência Animal v. 10, n.2, p. 91-96, 2000.
- LINTERN-MOORE S., PETERS H., MOORE G. P. M & FABER M. Follicular development in the infant human ovary. J. Reprod. Fert. v. 20, p. 773- 778, 1974.
- LUCCI, C. M., AMORIM, C. A., BAO, S. N., FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P., SILVA, J. R., GONCALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. Animal Reproduction Science; v. 56 n. 1 p. 39-49, 1999a.

- LUCCI, C. M., AMORIM, C. A., BAO, S. N., FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P., SILVA, J. R., GONCALVES, P. B. Study of preantral follicle population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science* v. 56, p. 223-236, 1999b.
- LUCCI, C.M., KACINSKIS, M.A.; LOPESA, 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.
- LUSSIER, J. G.; MATTON, P. & DUFOUR, J. J. Growth rates follicles in the ovary of the cow. *Reprod. Fert.* v. 81, p. 301-307, 1987.
- LUVONI, C. G. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* v. 66, p. 101–111, 2006.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Physiological Society*, p. C125-C142, 1984.
- MAZUR, P.; SEKI, S; PINN, I.L.; KLEINHANS, F.W.; EDASHIGE, K. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocyte. *Cryobiology* v. 51, p. 29–53, 2005.
- MILLER P. B., CHARLENSTON J. S., BATTAGLIA D. E., KLEIN N. A. & SOULES M. R. Morphometrics analysis of primordial follicle number in pigtailed monkey ovaries: symmetry and relationship with age. *Biology of Reproduction* v. 61, p. 553-556, 1999.
- NEWTON, H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Hum. Reprod. Update* v. 4, p. 237-247, 1998.
- NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* v. 11, p. 1487-1491, 1996.
- NICOSIA, S. V. EVANGELISTA, I., BATTA, S. K. Rabbit ovarian follicles. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biology of Reproduction* v. 13, p. 423-447, 1975.
- NUTTINCK, F., MERMILLOD, P., MASSIP, A., DESSY, F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral follicles: A preliminary study. *Theriogenology* v. 39, n. 4, p. 811-82, 1993.
- O'NEIL, L.; PAYNTER, S. J.; FULLER, B. J.; SHAW, R. W. Murine oocyte cytoskeletal changes, fertilisation and embryogenic development following exposure to a vitrification solution. *Cryo-Letters* v. 18, p. 17-26, 1997.
- OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUSBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertility and Sterility* v. 354, p. 1-7, 1998.
- PARKS, J.E.; RUFFINS, N.A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology* v. 37, n.1, p. 59-73, 1992.

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.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. *Ann. Biol. Anim. Biophys* v. 16, p. 271-278, 1976.

[PICTON HM, KIM SS, GOSDEN RG.](#) Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *Br Med Bull.* v. 56, n. 3, p. 603-15, 2000.

POLLARD, J. W., MARTINO, N. D., RUMPH, N. & LEIBO, S. P.. Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 46, p. 849-858, 1996.

POPE, C.E., KELLER, G.L., DRESSER, B.L. In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, developments in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility* v. 47, p.189-201, 1993.

POPE, C.E., MCRAE, M.A., PLAIR, B.L., KELLER, G.L., DRESSER, B.L. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fertil.* v. 51, p. 69–82, 1997.

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

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

RODGERS, R. J.; LAVRANOS, T. C.; Van WEZEL, I. L.; IRVING-RODGERS, H. F. Development of the ovarian follicular epithelium. *Mol. Cell. Endocrin.* 151:171-179, 1999.

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

ROY, S. K. & GREENWALD, G. S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from hamster ovary: histological and quantitative aspects. *Biology of Reproduction* v. 32, p. 203-215, 1985.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomic* v. 24, p. 77-92, 1983.

SAHA, S., SHIMIZU, M., GESHI, M., IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science* v. 63, p. 27-39, 2000.

SALLE B.; LORNAGE, J.; FRANCK, M.; ISOARD, L.; RUDIGOZ, R.C.; GUERIN, J.F. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. *Fertility and Sterility*, v. 70, p. 124-128, 1998.

SANTOS, R. R. Criopreservação de folículos pré-antrais ovinos. Fortaleza, Universidade Estadual do Ceará. 182 p (Tese) 2005.

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.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Recueil Medicine Vétérinaire* v. 167, p. 205-218, 1991.

SCARAMUZZI R. J, ADAMS N. R, BAIRD D. T, CAMPBELL B. K, DOWNING J. A, FINDLAY J. K, HENDERSON K. M, MARTIN G. B, MCNATTY K. P, MCNEILLY A. S, TSONIS C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev.* v. 5, n. 5, p. 459-78, 1993.

SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmaturred bovine oocytes. *Theriogenology* v. 42, p. 909-915, 1994.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, J. M.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* v. 53, p. 59-72, 2000.

SILVA J.R.V., FERREIRA, M.A.L., COSTA, S.H.F. et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research* v.43, p. 203-209, 2002.

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

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. 61, p.1691-1704, 2004b.

SILVA, J. R. V., BÁO, S. N., LUCCI, C. M., CARVALHO, F. C. A., ANDRADE, E. R., FERREIRA, M.A.L., FIGUEIREDO, J.R. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* v. 66, p. 209–223, 2001.

- STACHECKI, J. J.; COHEN, J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, v. 9, p. 152–63, 2004.
- SWANSON, W.F.; HOROHOV, D.W. & GODKE, R.A. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *Journal of Reproduction and Fertility* v. 105, p. 35-41, 1995.
- SWANSON, W.F.; HOWARD, J.G.; ROTH, T.L.; BROWN, J.L.; ALVARADO, T.; BURTON, M.; STARNES, D.; WILDT, D.E. Responsiveness to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. Reprod. Fertil.* v. 106, p. 87–94, 1996.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* v. 65, p. 236–244, 2006.
- VALDEZ, C.A; MAZNI, O. A; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* v. 33, p. 627-636, 1990.
- VAN DEN HUCK, R., BEVERS, M. M., BECKERS, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* v. 47, p. 73-82, 1997.
- VAN DER ELST, J. Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update* v. 9, p. 463-470, 2003.
- VAN DER ZWALMEN, P.; GAUROIS, B.; ECTORS, F.J.; TOUATI, K.; MASSIP, A.; ECTORS, F. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* v. 30, p. 1177-1183, 1988.
- WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. The physiology of reproduction. Raven Press, New York, p. 69-101, 1988.
- WEBER, P.K. & YOUNGS, C.R. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. *Theriogenology* v. 41, p.1291-1298, 1994.
- WOOD, C.E.C.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. Cryopreservation of ovarian tissue – Potential “reproductive insurance” for women at risk of early ovarian failure. *MJA*, v. 166, p. 366-369, 1997.

ANEXOS

ANEXO I:

Cryopreservation of preantral ovarian follicles *in situ* from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents.

LIMA, A. K. F.; SILVA, A. R.; SANTOS, R. R.; SALLES, D. M.; EVANGELISTA, A. F.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, L. D. M.

Theriogenology 66: 1664–1666. 2006