

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

LUCIANA ROCHA FAUSTINO

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO
ETILENOGLICOL PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO
CAPRINO E OVINO

FORTALEZA
2009

LUCIANA ROCHA FAUSTINO

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO
ETILENOGLICOL PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO
CAPRINO E OVINO

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

Orientadora (a): Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

FORTALEZA
2009

F268d

Faustino, Luciana Rocha

Diferentes Concentrações e Tempos de Exposição ao Etilenoglicol para Criopreservação de Tecido Ovariano Caprino e Ovino / Luciana Rocha Faustino. — Fortaleza, 2009.

77p.; il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Folículos pré-antrais. 2. Morfologia. 3. Viabilidade. 4. Estroma. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD:636.089

LUCIANA ROCHA FAUSTINO

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO
ETILENOGLICOL PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO
CAPRINO E OVINO

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

Aprovada em: 27 / 07 / 09

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
Orientadora – Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci
Examinadora – Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes
Examinador – Universidade Estadual do Ceará (UECE)

*Aos responsáveis por minha essência, meus
amados pais, Faustino e Helena,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) que através de sua equipe de funcionários – professores, secretários e coordenadores, muito contribuíram para minha formação profissional.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, indispensável para a realização desse trabalho.

À minha querida orientadora Professora Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, mais que sinceros agradecimentos pela oportunidade, pela confiança depositada tendo certeza que eu teria condições de “cuidar” do setor de criopreservação na sua ausência e por mesmo à distância ter me orientado com tamanho profissionalismo. Acredito que poucos possam se vangloriar de uma amizade com seu orientador como eu.

Ao meu “co”-orientador, Professor Dr. José Ricardo de Figueiredo, eterno agradecimento por todo ensinamento, pela “adoção” durante a ausência da professora Ana Paula e, principalmente, por nossas conversas extremamente pertinentes que contribuíram para meu crescimento profissional e sobretudo pessoal.

À minha co-orientadora, Dra. Regiane Rodrigues dos Santos por compartilhar comigo sua grande experiência com a criopreservação; pela ajuda imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, por mesmo distante ser sempre tão rápida e eficiente em suas respostas, sugerindo idéias extremamente relevantes à elaboração do artigo científico.

Ao Professor Dr. Cláudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados, por todas as valiosas dicas no trabalho e pela atenção disponibilizada. Profissional cuja presteza e simplicidade deveriam servir como exemplo de caráter para qualquer grande pesquisador.

À Professora Dra. Carolina Madeira Lucci e ao Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes pela disposição em analisar este trabalho e por terem aceitado, tão prontamente, o convite para participação da banca examinadora. Tenho certeza que as críticas e sugestões a serem abordadas adicionarão um inestimável valor à obra.

À Professora Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira, responsável pelo Laboratório de Virologia da UECE, por disponibilizar o microscópio de fluorescência, fundamental para a parte experimental desse trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, em especial Marcella Moreira Clemente de Mello Pinto, Liliane Moreira Silva, Marina Parissi Accioly, Antônio Cavalcante Mota Filho, Nathalie Ommundsen Pessoa e Priscilla Raquel Nogueira Vieira, pelo agradável convívio e pelos pensamentos compartilhados durante os intervalos de aula e corredores do PPGCV.

A todos os alunos e doutores do LAMOFOPA que me deram apoio e carinho durante essa jornada e a todos aqueles que passaram por este laboratório e contribuíram para a execução do trabalho. Agradecimento especial à Juliana Jales de Hollanda Celestino pela grande contribuição na parte escrita deste trabalho e à técnica Patrícia Magalhães de Andrade pela imensa ajuda no corte dos “milhões” de blocos de forma tão rápida e prestimosa.

Aos grandes e eternos amigos veterinários, Leonardo Correia Pinto, Márcia Viviane Alves Saraiva, Rafael Rossetto DE SOUSA, Isabel Bezerra Lima-Verde e Giovanna Quintino Rodrigues pela ajuda e dedicação constante e, principalmente, pelas grandes alegrias durante o “expediente”. Em especial gostaria de agradecer imensamente ao meu querido amigo Cleidson Manoel Gomes da Silva por ser um dos principais responsáveis pela concretização deste trabalho, no tocante à parte escrita e principalmente à parte prática. Sem sua ajuda o trabalho teria sido muito mais árduo, muito menos valioso e com certeza, sem nenhuma graça!

Aos grandes e mais que amados amigos Juliana Nogueira Brasil, Abraão Campos de Oliveira, Célio Moura Neto, Ana Camila dos Santos Dias, Ilane Magalhães Silva e aos

companheiros, agora de década, do CEFET, por todo carinho, por todo apoio à distância ou não, pelos momentos de alegria e, principalmente, por fazerem de nossa amizade, um sentimento tão bonito e verdadeiro.

Agradeço em especial ao meu amor Pedro Bastos de Macedo Carneiro, por ser simplesmente um grande amigo e companheiro, cuja paciência e inteligência transpõem a barreira do possível e, principalmente, por me mostrar que o amor não é algo a ser merecido, mas conquistado todos os dias.

Agradecimento mais que especial ao querido irmão Lucas Rocha Faustino (Quinha), por desde pequeno sempre ser meu irmão protetor. Até hoje consigo sentir suas mãos segurando as minhas quando me deparo com algum desafio. À minha irmã Annelize Rocha de Oliveira Cavalcante pelo carinho, alegria, força e por hoje significar para mim uma mãe. Às minhas preciosas Giulia Maria Rocha Cavalcante e Ana Sofia Rocha Cavalcante, mais filhas do que sobrinhas, por me fazerem esquecer os estresses do dia-a-dia com um “Mamãe Dudu, eu te amo!” e por fazerem de qualquer momento simples, o mais belo e mais feliz.

Por fim, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais queridos, José Maria Faustino dos Santos e Helena Maria Rocha Faustino, os quais dediquei todo esforço dessa jornada, por tudo que significam na minha vida, pelo amor incomensurável, pelo apoio incondicional, por sempre colocarem minha educação acima de qualquer prioridade e simplesmente por me tornarem o que hoje sou. Acredito que esse momento significa algo a mais para vocês do que para qualquer outra pessoa.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui, compartilhando comigo um momento tão importante como este. Feliz sou por ser rodeada de tanto amor.

*“Os caminhos e meios das ciências nunca
poderão atingir a essência da ciência. Todavia,
como ser pensante, todo pesquisador e mestre da
ciência, todo homem, que atravessa uma ciência,
pode mover-se em diferentes níveis do sentido e
manter-lhe sempre vivo o pensamento.”*

Martin Heidegger

RESUMO

Uma etapa decisiva para o sucesso da congelação do tecido ovariano consiste na boa exposição deste ao crioprotetor. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes tempos (5, 10 e 20 min) e concentrações (1,0 M e 1,5 M) de etilenoglicol (EG) na morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais, bem como na densidade das células do estroma de tecido ovariano caprino e ovino após congelação. Para avaliar a morfologia folicular e densidade do estroma ovariano foi utilizada a análise histológica. Os folículos foram considerados como normais com base na integridade dos diferentes compartimentos foliculares (oócito, células da granulosa e membrana basal). Para análise da viabilidade folicular, o tecido ovariano de cabras e ovelhas foi congelado, baseado nos resultados obtidos através da análise histológica, e após descongelação foi realizado o isolamento dos folículos pré-antrais, os quais foram incubados com marcadores fluorescentes: calceína-AM e etídio homodímero. Para análise estatística do efeito da concentração e tempo de exposição sobre os folículos pré-antrais e densidade do estroma, foi utilizada ANOVA seguida de teste SNK, enquanto os dados referentes à viabilidade folicular foram comparados através do teste Qui-quadrado. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Somente a exposição do tecido ovariano caprino a 1,0 M de EG por 5 min resultou em uma porcentagem de folículos pré-antrais normais similar ao controle. No entanto, após criopreservação não houve efeito significativo da concentração de EG, tempo de exposição e espécie nas percentagens de folículos pré-antrais normais. A densidade das células do estroma foi reduzida em todos os tratamentos após criopreservação, exceto no tecido ovariano caprino previamente exposto a 1,0 M de EG por 5 min. Após análise da viabilidade folicular, a criopreservação do tecido ovariano previamente exposto a 1,0 M de EG por 5 (ovelha e cabra) e 10 min (cabras) apresentou as maiores taxas de folículos viáveis. Em conclusão, 5 min de exposição a 1,0 M de EG pode ser aplicado com sucesso na criopreservação de tecido ovariano caprino e ovino, não sendo, portanto, necessário tempos de exposição ou concentrações mais elevadas.

Palavras-chave: Folículos pré-antrais. Morfologia. Viabilidade. Estroma.

ABSTRACT

A decisive step in the process of slow freezing of ovarian tissue consists of an efficient exposure of this tissue to a cryoprotectant agent. Therefore the aim of this work was to evaluate the effect of ethyleneglycol (EG), in different exposure times (5, 10 and 20 min) and concentrations (1.0 M and 1.5 M), on the morphology and viability of preantral follicles, as well as on the stromal cells density in goat and sheep ovarian tissue, followed or not by the freezing procedure. Histological analysis was applied to evaluate follicular morphology and stromal cells density. Preantral follicles were classified as morphologically normal based on the integrity of the oocyte, granulosa cells and basement membrane. To analyze follicular viability, ovarian tissue was frozen based on the results of the histological analysis, and after thawing preantral follicles were isolated and then labeled with fluorescent markers: calcein-AM and ethidium-homodimer. The statistical analysis of the effect of concentration and exposure time on preantral follicles quality and stromal density was carried out using ANOVA and SNK test, while viability data were analysed with the chi-square test. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$. Only goat ovarian tissue exposed to 1.0 M of EG for 5 min had a percentage of normal preantral follicles similar to the control. On the other hand, after cryopreservation there was no significant effect of EG concentration, exposure time and species on the percentage of normal preantral follicles. Stromal cells density was reduced in all treatments after cryopreservation, except for goat ovarian tissue previously exposed to 1.0 M EG for 5 min. The analysis of follicular viability showed that ovarian tissue previously exposed to 1.0 M EG for 5 min (sheep and goat) and 10 min (goat) presented the highest levels of viable follicles. In conclusion, 5 min of exposure to 1.0 M EG may be used to cryopreserve goat and sheep ovarian tissue with success, not being necessary long exposure times nor high concentrations.

Keywords: Preantral follicles. Morphology. Viability. Stroma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das alterações celulares durante a congelação. À medida que a célula é resfriada (I), ocorre primeiramente a formação de gelo extracelular (II). Se a taxa de congelação for rápida, a formação de cristais de gelo extracelular ocorre mais rápida do que o efluxo de água; a desidratação é incompleta e a solução intracelular congela-se, formando os cristais de gelo intracelular – CGI (III). Por outro lado, se a taxa de congelação for lenta, ocorre uma desidratação celular efetiva e a nucleação intracelular do gelo não ocorre. A água move-se para fora da célula e congela externamente, não permitindo a ocorrência da formação de CGI (IV). Linhas descontínuas representam a saída gradual da água, enquanto linhas contínuas representam uma saída mais rápida.....25

Fig. 1 – Viability of goat (A and C) and sheep (B and D) preantral follicles based on staining with calcein-AM (green staining viable cells) and ethidium homodimer (red staining nuclei form dead cells). A and B: Representative images of viable goat and sheep preantral follicles. C and D: Representative images of viable goat and sheep preantral follicles.....55

Fig. 2 – Histological sections of goat and sheep normal preantral follicles. A and B, respectively: Morphologically normal goat follicles after exposure to 1.0 M EG for 5 min and to 1.5 M EG for 20 min. C and D, respectively: Morphologically normal sheep follicles after exposure to 1.0 M EG for 5 min and to 1.5 M EG for 20 min.....56

Fig. 3 – Histological sections of goat and sheep atretic preantral follicles. A and B, respectively: Atretic goat follicles after exposure to 1.5 M EG for 5 and 20 min. C and D, respectively: Atretic sheep follicles after exposure to 1.5 M EG for 5 and 20 min. Arrows indicate oocyte retraction, pyknotic nucleus or disorganization of granulosa cells.....57

Fig. 4 – Representative images of fresh (non-exposed and non-cryopreserved) goat (A) and sheep (B) ovarian cortex showing a dense stroma. Reduction stromal cells density was observed after goat ovarian tissue exposure to 1.0 M EG for 5 min (C), 10 min (E) and 20 min (G), followed by cryopreservation. Similar reduction was observed when sheep ovarian tissue was only exposed for 5 min to 1.0 M EG (D) or 1.5 M EG (F), or cryopreserved in any of the tested treatments, e.g. 1.0 M for 5 min (H).....58

Fig. 5 – Stromal cells density (cells/100 μm^2) in control, exposed and cryopreserved ovarian tissue from goat (light grey) and sheep (dark grey). *Differs significantly from control ($P < 0.05$); a, b: values differ significantly among the exposure times within the same tested EG concentration and procedure (exposure and cryopreservation); A, B: values differ significantly between procedure in the same exposure time and EG concentration.....59

Fig. 6 – Percentage of viable preantral follicles (calcein-AM positive and ethidium-homodimer negative) in ovarian fragments from goat (dark grey) and sheep (light grey) non-cryopreserved (control) and cryopreserved in 1.0 M EG for 5, 10 or 20 min ($n = 30$ follicles per treatment). A, B: values differ significantly among treatment for each specie ($P < 0.05$); a, b: values differ significantly between the specie within the same treatments ($P < 0.05$).....60

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Percentage of morphologically normal goat and sheep preantral follicles in control (non-exposed) ovarian fragments and in fragments only exposed in EG for 5, 10 or 20 min at different concentrations (1.0 or 1.5 M) or exposed and subsequently cryopreserved ($n = 150$ follicles per repetition).

* Differs significantly from control ($P < 0.05$); a, b: values differ significantly among the exposure times within the same EG concentration tested; A, B: values differ significantly among the EG concentrations tested (1.0 and 1.5 M) within the same exposure time ($P < 0.05$); α : values differ significantly between the procedure (exposure and cryopreservation) within the same exposure times and EG concentrations ($P < 0.05$); $\blacklozenge$: values differ significantly between the specie (caprine and ovine) within the same exposure times and EG concentrations.

.....61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades químicas dos principais crioprotetores intracelulares empregados na criopreservação de tecido ovariano.....	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP - Agente(s) Crioprotetor(es)
CGI - Cristais de Gelo Intracelular
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm³ - Centímetro Cúbico
DMSO - Dimetilsulfóxido
EG - Etilenoglicol
Fig - Figura
FOPA - Folículos Ovarianos Pré-Antrais
FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio Científico e Tecnológico
g - Grama
GLI - Glicerol
GLM - General Linear Models
h - Hora(s)
H₂O - Molécula de Água
HEPES - Ácido (N-[2-Hidroximetil] Piperazina-N`-[2-Etanossulfônico]
HMEM - Meio Essencial Mínimo tamponado com HEPES
LABOVIR - Laboratório de Virologia
LAMOFOPA - Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré- Antrais
M - Molar
MEM - Meio Essencial Mínimo
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
min - Minuto(s)
mL - Mililitro
mm - Milímetro
MOIFOPA - Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
PAS - Ácido Periódico de Schiff
PROH - Propanodiol
P<0,05 - Probabilidade de erro menor do que 5%
PPGCV - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
RM - Ressonância Magnética
SAS - Statistical Analysis System
SNK - Student-Newman-Keuls

SD - Standard Deviation

UnB - Universidade de Brasília

UECE - Universidade Estadual do Ceará

v:v - Volume/Volume

μm - Micrômetro

μm^2 - Micrômetro ao Quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Ovário: estrutura e função.....	19
2.2 Aspectos gerais da criopreservação.....	20
2.3 Principais resultados da criopreservação de tecido ovariano.....	27
2.4 Desafios da criopreservação de tecido ovariano.....	30
2.5 Análise da qualidade folicular após criopreservação de tecido ovariano.....	31
3 JUSTIFICATIVA.....	33
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	35
5 OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo Geral.....	36
5.2 Objetivos Específicos.....	36
6 CAPÍTULO I (Criopreservação de tecido ovariano caprino e ovino: Efeitos na viabilidade folicular e densidade das células do estroma).....	37
7 CONCLUSÕES.....	62
8 PERSPECTIVAS.....	63
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXO A (Composição do soro fetal bovino).....	76

1 INTRODUÇÃO

Para a maximização do potencial reprodutivo de fêmeas, é necessário o desenvolvimento e a aplicação de biotécnicas reprodutivas. Neste sentido, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) vem sendo bastante explorada por sua potencialidade em aproveitar a abundância oocitária presente no ovário. Através da MOIFOPA, os folículos pré-antrais podem ser isolados do ambiente ovariano e cultivados *in vitro* até a completa maturação (FIGUEIREDO et al., 2007), maximizando o número de oócitos viáveis à fecundação e produção *in vitro* de embriões. No entanto, até o presente momento ainda não está estabelecido um meio de cultivo que mantenha a viabilidade e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais, inviabilizando o aproveitamento máximo do potencial oocitário. Dessa forma, a criopreservação desses folículos inclusos em tecido ovariano pode ser empregada como uma importante ferramenta para a preservação da viabilidade folicular, até que sejam desenvolvidos protocolos ideais para o desenvolvimento completo de folículos pré-antrais *in vitro* (SANTOS et al., 2007a).

Em ruminantes, inúmeros protocolos de criopreservação de tecido ovariano têm sido desenvolvidos (ovinos: SANTOS et al., 2006a; PINTO et al., 2008; caprinos: RODRIGUES et al., 2004a,b; LUZ et al., 2009; bovinos: LUCCI et al., 2004; CELESTINO et al., 2008). No entanto, apesar de já ter sido relatado na literatura resultados satisfatórios, como o nascimento de animais após o enxerto de tecido ovariano ovino previamente criopreservado (SALLE et al., 2002; IMHOF et al., 2006), na maioria dos estudos, a viabilidade folicular ainda permanece inferior à do tecido fresco (RODRIGUES et al., 2006; PINTO et al., 2008). Além disso, uma drástica redução no número total de folículos após transplante de tecido ovariano criopreservado ainda é observada (SALLE et al., 2003), limitando o sucesso da criotecnologia. Baseado nisso, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de criopreservação que mantenham a sobrevivência folicular e a integridade do tecido como um todo a fim de que resultados satisfatórios com maior repetibilidade sejam alcançados.

Para uma melhor compreensão da importância deste trabalho, os aspectos relacionados à estrutura e função do ovário, princípios básicos da criopreservação de tecido ovariano, principais desafios e sucessos dessa técnica em diferentes mamíferos, bem como a análise da qualidade folicular após criopreservação do tecido ovariano serão abordados a seguir na revisão de literatura. Esta revisão deu origem ao artigo intitulado “Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos”, o qual foi submetido para publicação no periódico *Revista Brasileira de Reprodução Animal*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário: estrutura e função

O ovário mamífero é um importante órgão do sistema reprodutivo feminino, o qual é composto de vários tipos de células diferenciadas que trabalham em conjunto para promover suas funções endócrina e exócrina (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Com relação à *função endócrina*, o ovário é responsável pela produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos, enquanto a *função exócrina* ou *gametogênica* visa a produção e liberação de oócitos (SAUMANDE, 1991).

Em todas as espécies de mamíferos, o ovário é composto de uma região medular e uma cortical, circundada pelo epitélio germinativo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A região medular, que na maioria das espécies consiste na porção interna do ovário, é constituída por tecido conjuntivo, células musculares lisas, nervos, artérias e veias (CORMACK, 1991), que se estendem para o interior do córtex ovariano e são responsáveis por nutrir e fornecer sustentação ao ovário. O córtex, localizado mais externamente, com exceção dos eqüinos, contém folículos ovarianos e corpos lúteos em vários estádios de desenvolvimento e regressão (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O folículo ovariano constituído, basicamente, por um oócito circundado por células foliculares demarcadas por uma membrana basal, é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário e tem como principais funções proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e a maturação oocitária (CORTVRINDT; SMITZ, 2001), bem como produzir hormônios e peptídeos (ADASHI, 1994). De acordo com a presença de uma cavidade repleta de líquido, denominada antro, os folículos podem ser classificados em (a) *folículos pré-antrais* e (b) *folículos antrais*. Os folículos pré-antrais, de acordo com o estágio de desenvolvimento, podem ser ainda classificados em primordiais, em transição, primários ou secundários. Os folículos antrais são assim denominados por possuírem uma cavidade antral bem desenvolvida em seu interior e são classificados em terciários ou pré-ovulatórios (FIGUEIREDO et al., 2008).

Quantitativamente, a população folicular é bastante variável entre as espécies, podendo se encontrar de 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999) a 2.000.000 de folículos na mulher (ERICKSON, 1986). Independente da espécie, o percentual de folículos pré-antrais representa a reserva folicular ovariana e corresponde a cerca de 90 a 95% de todo o capital folicular, enquanto os folículos antrais compreendem somente cerca de 5 a 10%

(FIGUEIREDO et al., 2008). Outro dado relevante, comum a todos os mamíferos, é que a maioria (99,9%) dos folículos não chega à ovulação, pois morre por um processo fisiológico conhecido como atresia, que pode ocorrer por via degenerativa necrótica (BRAS QUEENAN; SUSIN, 2005) e/ou apoptótica (HUSSEIN, 2005). Os folículos pré-antrais são menos susceptíveis à atresia do que os folículos antrais e, à medida que ascendem para esta categoria, tornam-se também mais vulneráveis à morte folicular.

Visando maximizar a utilização do potencial reprodutivo de fêmeas, vários estudos relacionados à biotécnica de MOIFOPA têm contribuído bastante no sentido de se desenvolver um meio de cultivo que bloqueie a atresia e assegure o crescimento e maturação *in vitro* de oócitos oriundos desses folículos. Entretanto, a utilização de milhares de folículos pré-antrais oriundos de um mesmo animal ou animais diferentes em uma única manipulação, além de pouco prática, pode incorrer em riscos de perda folicular, a exemplo do que acontece no ambiente ovariano. Neste sentido, a criopreservação do tecido ovariano poderá manter a viabilidade folicular até que seja realizado o cultivo *in vitro* ou transplante do ovário, pois permite a manutenção da integridade estrutural tanto das células somáticas como das células germinativas. Os principais aspectos relacionados ao processo de criopreservação estão descritos nos tópicos a seguir.

2.2 Aspectos gerais da criopreservação

A criopreservação consiste no armazenamento e preservação de materiais biológicos sob baixas temperaturas. Normalmente, a temperatura adotada é a do nitrogênio líquido (-196°C), embora não se tenha conhecimento de um valor preciso para este fim (JAIN; PAULSON, 2006). Sob temperaturas tão baixas, a criopreservação permite que as células vivas sejam submetidas a um estado de redução do metabolismo, no qual podem permanecer por um período indefinido e, futuramente, serem resgatadas ainda viáveis (MAZUR, 1980), a fim de continuarem o seu desenvolvimento normal após descongelação. Para que isso seja possível, mesmo após longos períodos de conservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser cuidadosamente considerados, tais como o tipo e concentração do(s) agente(s) crioprotetor(es) empregados; a escolha do método de criopreservação (congelação lenta ou vitrificação); a taxa de redução da temperatura durante a congelação e técnicas utilizadas para assegurar a remoção do agente crioprotetor após a descongelação (GORDON, 1994), as quais têm sido extensivamente utilizado em diferentes protocolos de criopreservação.

2.2.1 Agentes crioprotetores (ACP)

Os ACP são classificados como substâncias orgânicas e têm a função de proteger a célula ou tecido contra desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema da temperatura (SANTOS et al., 2008). Esses agentes podem ser divididos em dois principais grupos: *intracelulares* ou *penetrantes* e *extracelulares* ou *não-penetrantes*.

Os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular que reduzem as lesões celulares causadas pela congelação (KAROW, 2001). Dentre os mais empregados para a criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano estão o dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol (PROH), etilenoglicol (EG) e o glicerol (GLI), cujas propriedades químicas são mostradas no quadro 1. Essas substâncias agem por meio de diferentes mecanismos como: (1) interação na dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (DOBRINSKY, 1996); (2) redução do ponto de congelação da solução; (3) redução da concentração de eletrólitos intra e extracelulares durante a criopreservação (LOVELOCK, 1953), (4) interação com as moléculas de água via ligação com o hidrogênio (ASHWOOD-SMITH, 1987).

Quadro 1. Propriedades químicas dos principais crioprotetores intracelulares empregados na criopreservação de tecido ovariano.

Propriedades químicas	DMSO	EG	PROH	GLI
Fórmula	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	$\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$	$\text{C}_3\text{H}_6(\text{OH})_2$	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$
Classe	Sulfóxido	Álcool (diol)	Álcool (diol)	Álcool (triol)
Peso Molecular (g.mol^{-1})	~78,13	62,068	~76,10	92,094
Densidade (g.cm^{-3})	1,1004	1,1132	1,036	1,2613

Especificamente em tecido ovariano, as primeiras tentativas para criopreservação foram realizadas a partir da congelação de fragmentos do tecido ovariano de animais de laboratório (camundongas e ratas), utilizando o GLI como crioprotetor (DEANESLY, 1954; GREEN; SMITH; ZUCKERMAN, 1956). Entretanto, este ACP é pouco recomendado para a criopreservação de tecido ovariano devido à sua baixa capacidade de penetração (NEWTON et al., 1998). Para o tecido ovariano utiliza-se mais comumente o DMSO, PROH ou EG, uma

vez que estes crioprotetores possuem alta solubilidade, rápida penetrabilidade e levam a menores danos osmóticos (OKTAY; NEWTON; AUBARD, 1998).

No que se refere aos crioprotetores extracelulares como, por exemplo, os carboidratos sacarose, rafinose, trealose, ficoll, e proteínas como as presentes no soro fetal bovino, são moléculas com grandes dimensões que não penetram na membrana celular (HOVATTA, 2005), porém, protegerem-na por intermédio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos membranários (QUINN, 1985). Além disso, agem reduzindo o choque osmótico, controlando a entrada de água na célula (SHAW, 1993) e causando desidratação celular antes da congelação.

No entanto, apesar da ação benéfica dos ACP, deve-se considerar sua toxicidade, que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação. A escolha do tipo e concentração de um ACP que resulte em uma baixa toxicidade depende do tipo de célula e tecido a ser criopreservado (FULLER; PAYNTER, 2004), bem como da espécie utilizada e do método de criopreservação empregado.

2.2.2 Métodos de criopreservação

Os métodos de criopreservação são classificados em congelação lenta e vitrificação. A congelação lenta é considerada o método convencional de criopreservação e tem sido largamente utilizada para a conservação de tecido ovariano em diferentes espécies. Entretanto, atualmente tem-se verificado também a importância e aplicabilidade da vitrificação para a criopreservação desse tipo de tecido (SANTOS, 2005).

Na congelação lenta, é fundamental promover a desidratação da célula ou tecido com a redução gradual da temperatura, na presença de baixas concentrações de ACP, sob o controle de um freezer programável (PAYNTER, 2000). Ao contrário da congelação lenta, a vitrificação envolve um processo muito rápido, que emprega altas concentrações de ACP (YEOMAN; WOLF; LEE, 2005), e é considerado um método relativamente barato, uma vez que não requer equipamento especial como o freezer programável.

2.2.3 Etapas da criopreservação

De forma geral, um protocolo de criopreservação compreende basicamente cinco etapas: (1) exposição ao ACP ou período de equilíbrio; (2) resfriamento; (3) armazenamento; (4) descongelação ou aquecimento e (5) remoção do ACP.

2.2.3.1 Exposição ao ACP (Período de equilíbrio)

A exposição ao crioprotetor ou período de equilíbrio consiste no tempo necessário para penetração ou perfusão do ACP nas células e/ou tecidos e pode ser considerado o primeiro passo para um eficiente protocolo de criopreservação (ELMOAZZEN; ELLIOTT; MCGANN, 2005). Principalmente na congelação lenta, o período de equilíbrio é uma etapa extremamente importante para que a célula ou tecido atinja um estado no qual as concentrações de crioprotetor e água, extra e intracelulares, tornem-se iguais (GUNASENA et al., 1997), sendo fortemente influenciada pela própria concentração do crioprotetor, tempo e temperatura em que é realizada a exposição (ELMOAZZEN, 2000). Dessa forma, dados sobre a cinética e o influxo de crioprotetores no tecido são essenciais para assegurar adequadamente o equilíbrio entre as concentrações intra e extracelulares do crioprotetor, bem como otimizar os procedimentos de criopreservação (TAYLOR; BUSZA, 1992).

Neste sentido, a determinação dos níveis de crioprotetores presentes nas células e ou tecidos, após o período de equilíbrio, é de suma importância para o desenvolvimento de um protocolo ideal de criopreservação. Dentre as técnicas utilizadas para mensurar os níveis teciduais de um ACP, pode-se destacar a ressonância magnética – RM e a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (ELMOAZZEN; ELLIOTT; MCGANN, 2005). A RM já foi utilizada para determinar a concentração de ACP em diversos tecidos, inclusive no tecido ovariano suíno e humano (THOMAS et al., 1997; NEWTON et al., 1998). A CLAE, cujo método é mais prático e de menor custo, foi utilizada recentemente, para determinar os níveis teciduais de DMSO em córtex ovariano caprino (LUZ et al., 2009) e ovino (PINTO et al., 2008).

2.2.3.2 Resfriamento

2.2.3.2.1 Durante o processo de congelação lenta

Durante o resfriamento, à medida que as células são resfriadas a temperaturas entre -5 e -15°C, ocorre, primeiramente, a formação de gelo no meio extracelular (Figura 1). Com a continuidade da redução da temperatura, a quantidade de gelo aumenta e os solutos concentram-se no meio extracelular criando um gradiente osmótico (ELMOAZZEN, 2000). A partir desse estágio, os eventos físicos subsequentes dependem da velocidade de congelação. Se a taxa de congelação for rápida, a formação de cristais de gelo na solução extracelular ocorre de forma mais rápida do que o efluxo de água das células; a desidratação não ocorre, o citoplasma se torna cada vez mais super-resfriado e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo intracelular – CGI (KARLSSON; CRAVALHO; TONER, 1993). Ao contrário, sob baixas taxas de congelação ocorre uma progressiva desidratação celular, concentrando solutos intracelulares para eliminar o super-resfriamento do citoplasma e manter o potencial químico da água intra e extracelular em equilíbrio. Uma vez que os cristais de gelo são incapazes de atravessar a membrana celular, a nucleação do gelo intracelular é impedida, a água move-se para fora da célula e congela externamente, consequentemente, evitando a formação de CGI (FRIEDLER; GIUDICE; LAMB, 1988). No entanto, nas duas situações – velocidade de congelação rápida ou lenta – danos celulares poderão ocorrer (ELMOAZZEN, 2000), conforme será abordado mais adiante.

Com a finalidade de reduzir a formação de CGI, deve-se induzir a formação de gelo extracelular, processo conhecido como *seeding*, que previne a supercongelação da célula e inicia o processo de desidratação (SHAW, 1993). A indução do *seeding* pode ser realizada automaticamente (*self-seeding* – MALTARIS et al., 2005) ou manualmente através do toque de um objeto de metal pré-resfriado a -196°C na parede dos criotubos ou palhetas (FABBRI, 2006). Outra forma de reduzir ou evitar a formação de CGI pode ser através de uma desidratação celular adequada (SHAW et al., 2000), uma vez que a redução da água intracelular diminui os danos causados pelo procedimento de congelação. Além da taxa de congelação/descongelação, o processo de desidratação também pode ser influenciado pela presença de ACP na solução de congelação (FABBRI et al., 2000), que provoca a saída de água do citoplasma em decorrência da maior concentração de soluto extracelular (SHAW, 1993).

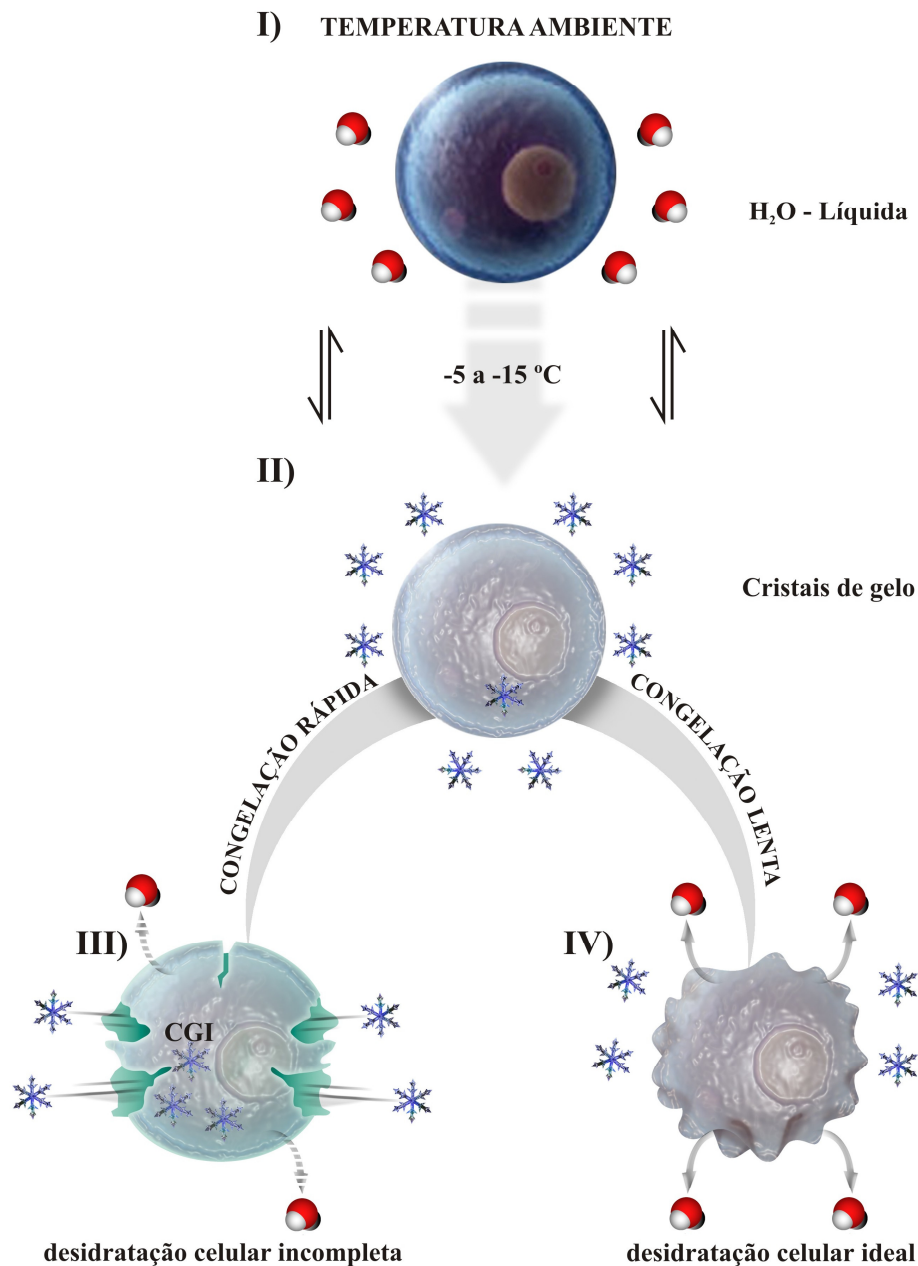


Figura 1. Representação esquemática das alterações celulares durante a congelamento. À medida que a célula é resfriada (I), ocorre primeiramente a formação de gelo extracelular (II). Se a taxa de congelamento for rápida, a formação de cristais de gelo extracelular ocorre mais rápida do que o efluxo de água; a desidratação é incompleta e a solução intracelular congela-se, formando os cristais de gelo intracelular – CGI (III). Por outro lado, se a taxa de congelamento for lenta, ocorre uma desidratação celular efetiva e a nucleação intracelular do gelo não ocorre. A água move-se para fora da célula e congela externamente, não permitindo a ocorrência da formação de CGI (IV). Linhas descontínuas representam a saída gradual da água, enquanto linhas contínuas representam uma saída mais rápida.

2.2.3.2.2 Durante o processo de vitrificação

Diferentemente da congelação lenta, na vitrificação, a velocidade de resfriamento é extremamente rápida, podendo variar de aproximadamente 20.000 a 40.000°C/min (LIN et al., 2008). Como consequência, a água passa do estado líquido para um estado vítreo, considerado um sólido amorfo, sem ocorrência de um estágio cristalino (RALL; FAHY, 1985), ou seja, não se observa a formação de cristais de gelo (YEOMAN; WOLF; LEE, 2005).

A vitrificação do citoplasma é obtida, experimentalmente, através da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes da imersão em nitrogênio líquido. Com isto, a solução intracelular se torna muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de resfriamento apropriada é utilizada (SANTOS, 2000).

2.2.3.3 Armazenamento

Ao fim do processo de criopreservação, a amostra deve ser armazenada até o momento de sua descongelação. Embora temperaturas abaixo de -80°C sejam geralmente suficientes para a preservação celular por longos períodos, a manutenção da viabilidade celular aumenta com a redução da temperatura de armazenamento (KARLSSON; TONER, 1996). Dessa forma, diversos trabalhos utilizam com frequência o nitrogênio líquido para estocagem de materiais biológicos, cuja temperatura é de -196°C. Segundo McGee e Martin (1962), à temperatura de -196°C, a energia térmica existente é insuficiente para a ocorrência das reações químicas. Estudos prévios sobre a influência do tempo de armazenamento mostraram que os processos de criopreservação, e não o tempo de estocagem, exercem os principais efeitos sobre as células (KLEEBERGER et al., 1999; SMITH et al., 2001).

2.2.3.4 Descongelação ou aquecimento

Outra etapa crítica da criopreservação é a descongelação. Durante essa etapa, o reaquecimento do material congelado pode ocasionar injúrias celulares através do processo de recristalização ou ainda pelo crescimento dos microcristais de gelo que se formaram durante a congelação, tornando-se macrocristais, os quais levam à ruptura celular. Portanto, recomenda-se que o processo de descongelação seja suficientemente rápido, 35- 40°C (SANTOS, 2000),

para permitir que o gelo extracelular derreta e atravesse a membrana extracelular em estado líquido para a reidratação da célula (FRIEDLER; GIUDICE; LAMB, 1988).

2.2.3.5 Remoção ou diluição do ACP

Após o procedimento de descongelação, é necessária a remoção do ACP, que pode ser realizada através de uma ou várias lavagens do material criopreservado (SANTOS et al., 2008); geralmente usa-se três lavagens, com duração entre 5 a 15 minutos cada uma. A remoção do crioprotetor é um fator que pode afetar a sobrevivência celular pós-descongelação, uma vez que ao expor a célula com alta concentração de ACP a um meio com concentração deste agente baixa ou nula, a água passa a entrar de forma rápida na célula, causando aumento de volume ou até mesmo rompimento celular (FABBRI, 2006). Portanto, recomenda-se também que a remoção do ACP seja realizada em passos seriados, utilizando-se para isso, soluções em concentrações decrescentes de crioprotetor extracelular, como, por exemplo, a sacarose, que funciona como tampão osmótico extracelular (MANDELBAUM et al., 1988).

2.3 Principais resultados da criopreservação de tecido ovariano

2.3.1 Criopreservação de tecido ovariano em animais de laboratório

Desde a década de 50, fragmentos do tecido ovariano de roedores têm sido submetidos à congelação e autotransplante subcutâneo (DEANESLY, 1954; GREEN; SMITH; ZUCKERMAN, 1956). Nos últimos anos, diversos estudos realizados em animais de laboratório têm demonstrado que folículos pré-antrais após congelação apresentaram-se morfolologicamente normais (HOVATTA et al., 1996; CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997), bem como a retomada do ciclo reprodutivo pode ser alcançada (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1995). Esse tipo de observação foi relatado em experimentos com camundongas ovariectomizadas, no qual 75 e 80% dos animais apresentaram ciclos estrais regulares após autotransplante com tecido ovariano fresco ou previamente congelado, respectivamente (HARP et al., 1994). Além disso, foi demonstrado que ovários fetais congelados e transplantados, recuperaram a fertilidade de camundongas adultas, resultando em 86% de gestação (HARP et al., 1994). Em ratas neonatas, após avaliação da sobrevivência folicular de ovários vitrificados foi observado um número considerável de folículos com

morfologia normal (92 folículos/ovário), no entanto este número foi menor que no tecido ovariano não criopreservado (334 folículos/ovário) (SUGIMOTO et al., 1996).

Após congelação do tecido ovariano de camundongas seguida de cultivo foi relatado o crescimento *in vitro* de folículos isolados, contudo a taxa de desenvolvimento e sobrevivência folicular foi baixa em relação ao tecido fresco (NEWTON; ILLINGWORTH, 2001). Segino et al. (2005) mostraram que folículos pré-antrais de camundongas isolados de tecido ovariano previamente congelado desenvolvem mais lentamente do que aqueles não congelados. Recentemente, foi demonstrado que a criopreservação suprime temporariamente a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais de camundongas através da redução da expressão de ciclinas e quinases (CHOI et al., 2008), o que pode estar relacionado ao atraso no desenvolvimento folicular. No entanto, atualmente foi mostrado que folículos isolados derivados de tecido vitrificado apresentaram crescimento folicular e maturação oocitária similar aos folículos não vitrificados (HAIDARI; SALEHNIA; VALOJERDI, 2008).

Crias saudáveis de camundongas têm sido obtidas a partir de ovário previamente congelado, seguido do transplante para a cápsula renal e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no próprio tecido ovariano ou mesmo após acasalamento quando o transplante foi realizado na bursa ovariana (LIU et al., 2001; 2008). No entanto, existem poucos relatos de experimentos que obtiveram crias a partir de folículos pré-antrais que cresceram, maturaram e foram fertilizados somente com o cultivo *in vitro* após criopreservação. Nessas condições, ou seja, sem a utilização do transplante, a obtenção de crias de camundongos (n=2) já foi obtido recentemente por Hasegawa et al. (2006) após vitrificação do tecido ovariano.

2.3.2 Criopreservação de tecido ovariano em animais domésticos

Em animais domésticos como os ovinos, a sobrevivência folicular foi demonstrada através da viabilidade de tecido ovariano congelado (PINTO et al., 2008; TSURIBE; GOBBO; LANDIM-ALVARENGA, 2009). Além disso, após autotransplante do tecido ovariano ovino previamente congelado foi observado um aumento nos níveis de progesterona quatro semanas após o enxerto (BAIRD et al., 1999), bem como a atividade hormonal foi restaurada após autotransplante de ovário inteiro (REVEL et al., 2004).

Os primeiros resultados mais encorajadores foram alcançados por Gosden et al. (1994), que relataram a retomada da atividade cíclica e gestação, obtendo o nascimento de uma cria saudável depois de autotransplante ortotópico em ovelhas com fragmentos do córtex ovariano congelado/descongelado. Outros estudos também relataram o nascimento de

cordeiros após congelação do tecido ovariano seguida do transplante (SALLE et al., 2002; 2003). Mais recentemente, Bordes et al. (2005) obtiveram três gestações, com nascimento de cordeiros saudáveis, após autotransplante ortotópico de metade do ovário vitrificado.

Na espécie caprina, mesmo ainda não tendo sido relatado nascimento de animais após criopreservação de tecido ovariano, já foi demonstrado que folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano podem ser congelados (RODRIGUES et al., 2004a,b; LUZ et al., 2009) ou vitrificados (SANTOS et al., 2006b; 2007b), demonstrando grande potencial para a constituição de bancos de germoplasma. Recentemente, Santos et al. (2009) relataram pela primeira vez a retomada da função ovariana após transplante do tecido ovariano caprino descongelado.

Em bovinos, alguns autores têm obtido resultados bastante satisfatórios na criopreservação de tecido ovariano, demonstrando que folículos pré-antrais bovinos possuem altas taxas de sobrevivência após criopreservação (LUCCI et al., 2004; CELESTINO et al., 2008).

Em felinos, resultados bastante animadores foram obtidos após congelação do córtex ovariano de gatas seguida de xenotransplante sob cápsula renal de camundongos imunodeficientes, com evidência do desenvolvimento de folículos em estádios avançados (BOSCH et al., 2004).

Já em suínos, poucos trabalhos relatam a influência da criopreservação de tecido ovariano, sendo relatado por Gandolfi et al. (2006) que nesta espécie a criotolerância foi maior que em bovinos e humanos. Recentemente, foi demonstrado que os folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano podem ser congelados, sem sinais ultraestruturais de degeneração avançada (BORDES et al., 2009).

2.3.3 Criopreservação de tecido ovariano em humanos

Experiências com a criopreservação de tecido ovariano humano tem sido realizadas desde a década de 90, quando Newton et al. (1996) demonstraram que o tecido congelado permaneceu viável após transplante sob cápsula renal de camundongos imunodeficientes. A viabilidade de tecido ovariano humano após descongelação também foi relatada após xenotransplante subcutâneo (VAN DEN BROECKE et al., 2001) e transplante ortotópico (RADFORD, 2003). Já a função ovariana seguida de crescimento folicular foi comprovada primeiramente após transplante subcutâneo de tecido congelado (OKTAY;

KARLIKAYA, 2000), com relato inclusive de formação da cavidade antral após transplante sob cápsula renal do ovário previamente congelado (GOOK et al., 2003).

Estudos recentes relataram o nascimento de crianças saudáveis após transplante ortotópico de tecido ovariano congelado (DONNEZ et al., 2004; MEIROW et al., 2005; 2007; DEMEESTERE et al., 2007; ANDERSEN et al., 2008), evidenciando assim um avanço extremamente significativo da criopreservação e do transplante de tecido ovariano. Esses resultados mostram que a associação das técnicas de criopreservação e transplante de tecido ovariano é de grande valor para preservação da fertilidade de mulheres, sobretudo daquelas que são submetidas a quimio/radioterapia para tratamento de cânceres.

Apesar da maioria dos estudos focarem o transplante de tecido ovariano, já foi relatado que após cultivo por 2 semanas, os folículos congelados apresentaram taxas de sobrevivência e crescimento semelhante aos folículos não congelados, com o desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio de folículos secundários (HOVATTA et al., 1997). Em outro estudo, foi mostrado que folículos presentes no tecido ovariano humano criopreservado e cultivado *in vitro* cresceram até o estágio antral após seis semanas de estimulação exógena com FSH (OKTAY et al., 1998).

2.4 Desafios da criopreservação de tecido ovariano

Apesar dos estudos promissores já relatados na literatura utilizando a criopreservação do tecido ovariano, alguns entraves intrínsecos ao procedimento são decisivos para que resultados satisfatórios e contínuos sejam obtidos. Primeiro, para cada tipo celular existe uma taxa ótima de resfriamento (FABBRI, 2006), sendo esta uma das razões que dificulta a criopreservação do tecido ovariano, uma vez que este tecido é composto por muitos tipos celulares diferentes, como as células do estroma e os folículos (oócito e células foliculares), além dos vasos sanguíneos e nervos que são importantes para o restabelecimento da função ovariana após transplante (HOVATTA, 2005).

As injúrias celulares também estão relacionadas à natureza e cinética das células ao responderem às condições induzidas pela temperatura. Mazur; Leibo; Chu (1972) propuseram que durante a congelação lenta, as injúrias celulares ocorrem devido à exposição relativamente longa das células às condições deste processo que alteram as propriedades das soluções intra e extracelulares como resultado da desidratação. Segundo Mazur; Rall; Chu (1984), durante a redução da temperatura quando as células são desidratadas em excesso, elas podem ser danificadas pela exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos

eletrólitos celulares, evento conhecido como efeito solução, que inclui alterações de pH, aumento na concentração e precipitação de solutos resultando em alterações no citoplasma, causando injúrias nas proteínas celulares (JAIN; PAULSON, 2006). Em 1974, Meryman propôs a existência de um volume crítico de tolerância que as células poderiam resistir durante a retração. Outros autores sugeriram ainda que durante as injúrias do resfriamento, a área de superfície celular é reduzida como resultado da perda de material da membrana (STEPONKUS; WEIST, 1978). Um estudo mostrou que os lipídios da membrana podem ser eliminados durante a desidratação e que danos podem ocorrer durante a reidratação se não existir uma quantidade suficiente de constituintes da membrana que façam com que a célula retorne ao seu volume isotônico (ELMOAZZEN, 2000).

Como visto anteriormente, os crioprotetores são imprescindíveis para os protocolos de criopreservação. No entanto, nos casos em que altas concentrações são utilizadas, a toxicidade dos ACP pode ser prejudicial. Embora sua toxicidade tenha sido observada em numerosos modelos celulares e teciduais, ainda não existe evidência experimental adequada para explicar o mecanismo das injúrias. Numerosos estudos propõem que a toxicidade esteja relacionada com ações não-específicas de desidratação e aumento intracelular da concentração de soluto ou à indução de danos na membrana através da alteração da polaridade do meio celular ou pela fusão da membrana (HUANG et al., 2006).

Apesar dos fatores citados serem responsáveis por danos celulares, na congelação lenta, a formação de CGI é considerada um dos mais importantes. Essa formação de gelo ocorre quando as células não estão suficientemente desidratadas (SZÉLL; SHELTON, 1986). Segundo Jain e Paulson (2006), os danos dos CGI estão relacionados à expansão do gelo dentro da célula que causa pressão no citoplasma, tencionando as organelas, que podem sofrer consideráveis injúrias irreparáveis. Essas injúrias podem ser observadas por meio de técnicas que permitem avaliar a viabilidade morfológica e ultraestrutural da célula.

2.5 Análise da qualidade folicular após criopreservação de tecido ovariano

Para avaliar a eficiência da criopreservação do tecido ovariano, diversas técnicas podem ser aplicadas com base na morfologia (RODRIGUES et al., 2004a,b), ultraestrutura (CELESTINO et al., 2008), viabilidade celular (SANTOS et al., 2006b; PINTO et al., 2008), dentre outras.

A histologia clássica, considerada de baixo custo e fácil execução, tem sido largamente utilizada para análise da morfologia folicular por ser um método quantitativo, no

qual um grande número de folículos pode ser avaliado. Entretanto esta técnica permite identificar somente sinais avançados de atresia, como a picnose nuclear, danos citoplasmáticos, destacamento das células da granulosa e danos na membrana basal (DEMIRCI et al., 2002). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é capaz de revelar alterações das organelas celulares e mudanças ultraestruturais, inclusive na membrana nuclear (SALEHNIA; MOGHADAM; VELOJERDI, 2002), sendo considerada, portanto, um método qualitativo. No entanto, essa técnica necessita de um maior tempo para sua execução e permite a avaliação de uma baixa quantidade de folículos.

Estudos demonstraram que a análise morfológica também apresenta suas limitações, pois nem sempre pode ser correlacionada com a viabilidade e capacidade de desenvolvimento folicular (MARTINEZ-MADRID et al., 2004a), e como já se sabe, a criopreservação pode induzir a ruptura da membrana celular, levando à morte dos folículos. Dessa forma, estudos sobre a integridade da membrana utilizando corantes vitais como o azul de Trypan (PINTO et al., 2008) ou marcadores fluorescentes como a calceína-AM e o etídio homodímero-1 (SANTOS et al., 2007b; AERTS et al., 2008a) são ferramentas importantes para análise da viabilidade dos folículos após isolamento do tecido ovariano.

Além dessas técnicas, Rodrigues et al. (2005) mostraram que o cultivo folicular *in vitro* é uma ferramenta importante para avaliar a eficiência da criopreservação, uma vez que lesões foliculares não detectadas pós-descongelação podem evoluir e serem manifestadas após cultivo. Outra estratégia para avaliar o sucesso da criopreservação consiste no transplante do tecido ovariano, haja vista muitos pesquisadores usarem esse artifício visando a retomada da função ovariana (SALLE et al., 2002, 2003; ARAV et al., 2005).

3 JUSTIFICATIVA

Conforme mostrado na revisão de literatura, o ovário mamífero, como o dos pequenos ruminantes, apresenta milhares de oócitos contidos no interior de folículos pré-antrais, os quais poderiam chegar até à ovulação, originando um número de embriões e crias superior ao que ocorre normalmente *in vivo*. No entanto, ao longo da foliculogênese, a grande maioria dos folículos morre devido à atresia folicular. Diante dessa problemática, a biotécnica de MOIFOPA tem sido intensamente explorada por diversos pesquisadores (TAMILMANI et al., 2005; MATOS et al., 2007; GUPTA et al., 2008).

A MOIFOPA tem como principal objetivo recuperar um grande número de folículos pré-antrais do ambiente ovariano e cultivá-los *in vitro* até à maturação para posterior fecundação e produção *in vitro* de embriões, evitando assim, a grande incidência de morte folicular. Por outro lado, até o presente momento, não existe um sistema de cultivo *in vitro* que assegure o desenvolvimento completo e a viabilidade folicular e oocitária fora do ambiente ovariano, o que inevitavelmente também leva à perda folicular. Baseado nisso, a criotecnologia representa uma excelente alternativa para a preservação dos folículos presentes no ovário oriundo de animais de produção, como os caprinos e ovinos, geneticamente superiores que venham a óbito subitamente, ou até mesmo de espécies em risco de extinção. Além disso, por se tratarem de animais cujo ovário serve como modelo para estudo em mulheres, a criopreservação do tecido ovariano desses animais pode contribuir bastante para o aprimoramento dos protocolos de criopreservação de tecido ovariano humano.

Estudos realizados anteriormente em pequenos ruminantes mostraram que folículos pré-antrais morfolologicamente normais e viáveis podem ser obtidos após congelamento lento de tecido ovariano utilizando o EG como agente crioprotetor (ovinos: SANTOS et al. 2006a; TSURIBE; GOBBO; LANDIM-ALVARENGA, 2009; caprinos: RODRIGUES et al. 2004a; 2006; SANTOS et al., 2006b). Nesses estudos as concentrações de EG variaram de 1,0 a 3,0 M, com tempo de fixo de exposição de 20 minutos. Entretanto, as taxas de sobrevivência folicular após a congelamento ainda são muito inferiores às observadas no tecido ovariano fresco, significando também perda folicular. Sabe-se que os protocolos de criopreservação de tecido ovariano, sobretudo para as espécies caprina e ovina, capazes de manter a integridade folicular semelhante à observada *in vivo*, ainda não estão plenamente estabelecidos. Isso reflete a necessidade de realização de estudos que resultem na determinação de um sistema de criopreservação ideal para o tecido ovariano.

Para a padronização de um protocolo de criopreservação, como a congelamento lenta, que resulte na redução de crioinjúrias, uma etapa fundamental é a determinação das condições ideais de exposição ao agente crioprotetor. Estudos relacionados à exposição do ACP como a concentração, tempo e temperatura são de extrema importância para a manutenção da integridade não só folicular, como também do estroma ovariano, refletindo no sucesso da criopreservação. As razões para isso fundamentam-se no fato dos ACP causarem toxicidade celular quando utilizados em altas concentrações ou durante excessivos períodos de exposição antes do processo de criopreservação. Visando uma melhor avaliação da eficácia dos protocolos de criopreservação aplicados neste trabalho, além da análise histológica, foram utilizados marcadores fluorescentes que permitem a avaliação da viabilidade folicular e, consequentemente, conferem maior segurança à análise.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Curtos tempos de exposição e baixas concentrações de EG podem ser aplicados com sucesso para a criopreservação do tecido ovariano caprino e ovino.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Determinar o efeito de diferentes concentrações (1,0 M e 1,5 M) e tempos (5, 10 e 20 min) de exposição ao EG sobre a criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano caprino e ovino.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a morfologia de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano, bem como a densidade do estroma ovariano caprino e ovino após exposição a diferentes tempos e concentrações de EG, seguida ou não de congelação;
- Analisar a viabilidade de folículos pré-antrais caprino e ovino através de marcadores fluorescentes, após congelação do tecido ovariano;
- Comparar a sobrevivência de folículos pré-antrais, bem como a densidade de células do estroma ovariano entre caprinos e ovinos.

6 CAPÍTULO I

Criopreservação de tecido ovariano caprino e ovino:
Efeitos na viabilidade folicular e densidade das células do estroma

Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation:
Effects on follicular viability and stromal cells density

RESUMO

Fragmentos do córtex ovariano de ovelhas e cabras foram expostos a 1,0 ou 1,5 M de etilenoglicol (EG) por 5, 10 ou 20 min, seguido ou não de criopreservação. Análise histológica foi aplicada para avaliar a morfologia folicular e a densidade de células do estroma. Os folículos pré-antrais foram classificados como morfológicamente normais baseado na integridade do oócito, células da granulosa e membrana basal. A média da densidade do estroma foi calculada no controle, bem como após exposição e criopreservação. Para análise adicional da viabilidade folicular, foram utilizados marcadores como a calceína-AM e o etídio homodímero. Embora somente a exposição do tecido ovariano caprino a 1,0 M de EG por 5 min tenha resultado em uma taxa de folículos normais similar ao controle, não houve efeito significativo da concentração de EG, tempo de exposição e espécie nas percentagens de folículos pré-antrais normais criopreservados. A densidade do estroma foi reduzida em todos os tratamentos após criopreservação, exceto no tecido ovariano caprino previamente exposto à 1,0 M de EG por 5 min. Quando a viabilidade folicular foi considerada, observamos que esta foi melhor preservada quando a criopreservação do tecido ovariano foi previamente exposto a 1,0 M de EG por 5 (ovelha e cabra) e 10 min (cabras).

Palavras-chave: Folículos pré-antrais. Etilenoglicol. Tempo de exposição; Concentração; Morfologia

**Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation:
Effects on follicular viability and stromal cells density**

L.R. Faustino^{a*}, R.R. Santos^b, C.M.G. Silva^a, L.C. Pinto^a, J.J.H. Celestino^a, C.C. Campello^a,
J.R. Figueiredo^a, A.P.R. Rodrigues^a

^a Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles – LAMOFOPA, Faculty of
Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Department of Equine Sciences, Veterinary Pharmaceuticals, Pharmacology and Toxicology
Division, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

* Corresponding author: Universidade Estadual do Ceará (UECE) – Faculdade de Veterinária
– Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) – Laboratório de
Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA); Av. Paranjana, 1700,
Campus do Itaperi; Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60740-000; Tel.: +55 85 3101 9852; Fax:
55 85 3101 9840;
E-mail address: lrfaustino@gmail.com (Luciana Rocha Faustino)

Abstract

Ovarian cortical fragments from sheep and goat were exposed to 1.0 or 1.5 M ethylene glycol (EG) for 5, 10 or 20 min, either followed or not by cryopreservation. Histological analysis was applied to evaluate follicular morphology and stromal cells density. Preantral follicles were classified as morphologically normal based on the integrity of the oocyte, granulosa cells and basement membrane. Mean stromal cells density was calculated in controls, as well as after exposure and cryopreservation. To further evaluate follicular viability, markers such as calcein-AM and ethidium-homodimer were used. Although only exposure of goat ovarian tissue to 1.0 M EG for 5 min resulted in a rate of normal follicles similar to control, there was no significant effect of EG concentration, exposure time, and species on the percentages of normal cryopreserved preantral follicles. Stromal density was reduced in all treatments after cryopreservation, except for goat ovarian tissue previously exposed to 1.0 M EG for 5 min. Follicular viability was better maintained when cryopreserved ovarian tissue had been previously exposed to 1.0 M EG for 5 min (sheep and goats) and 10 min (goats).

Key-words: preantral follicles; stroma; cryopreservation; histology; viability

1. Introduction

Cryopreservation of preantral follicles enclosed in ovarian cortical tissue consists in a strategic way to preserve female gametes. Due to morphological and physiological characteristics, caprine and ovine have been used as models to develop cryopreservation protocols for human ovarian tissue [1,2].

Although several groups have reported the recovery of the gonadal function in goats [2] and live births in sheep [3,4,5] after auto-transplantation of cryopreserved ovarian tissue, such results are not yet obtained on a regular basis. Furthermore, preservation of follicular viability after ovarian cortex cryopreservation does not imply always in the full preservation of cortical tissue. In previous studies, we have shown that follicular survival was reduced after *in vitro* culture of cryopreserved goat [6] and sheep [7] ovarian tissue, when compared to fresh ovarian cortex. Recently, Marsella and co-workers [8] have shown strong arguments that not only the ovarian follicles, but also the stromal cells, are affected by the cryopreservation procedures. This may explain the increased rates of follicular degeneration during *in vitro* culture due to the lack of healthy stromal cells to support follicular development after freezing-thawing. Therefore, preservation of stromal cells is a requirement to improve the overall ovarian tissue cryopreservation process.

Likewise, an efficient cryopreservation protocol may depend not only on the type of cell to be preserved [9], but also be specie-specific. For instance, in earlier studies we have obtained different results when applying the same cryopreservation protocol (i.e. same exposure time and temperature, same cryoprotectants and concentrations, and same cryopreservation curve) to goat [10,11] and sheep [12] ovarian tissue. However, both studies were performed separated, making it difficult to compare those data properly.

The present study was carried out to verify the effect of the exposure and freezing of goat and sheep ovarian tissue on follicular viability and stromal cells density. In addition, a permeable cryoprotectant (ethylene glycol - EG) was tested in different exposure times (5, 10 and 20 min) and concentrations (1.0 M and 1.5 M).

2. Materials and Methods

2.1. Source and preparation of ovarian tissue

Eight pair of ovaries from adult mixed-breed goats (*Capra hircus*) and eight pair of adult mixed-breed sheep (*Ovis aries*) were obtained at a local slaughterhouse. Ovaries were washed once in 70% alcohol, and twice in HEPES-buffered MEM (HMEM; Sigma Chemical Co., St Louis, USA) supplemented with 0.1% (v:v) penicillin/streptomycin (Sigma). The material was transported in thermos flasks at 20°C to the laboratory within 1 h after slaughter. At the laboratory, the cortex from each pair of ovaries was then removed and cut into small fragments (3x3x1 mm), which were randomly distributed over the experiments.

2.2. Experimental design

2.2.1. Histology of preantral follicles and ovarian stroma from goats and sheep

Thirteen fragments from each pair of ovaries of five goats and five sheep were kept in Petri dishes containing HMEM for manipulation. One fragment (control) per ovarian pair was fixed in Carnoy for 12 h for routine histological studies. The remaining 12 fragments were exposed to 1.0 or 1.5 M EG (Dinâmica Produtos Químicos Ltda., São Paulo, Brazil) for 5, 10

or 20 min followed or not by cryopreservation (see below) before being fixed in Carnoy. Fixed ovarian fragments were dehydrated, embedded in paraffin wax and serially sectioned at 7 μm . Every fifth section was mounted and stained with periodic acid Schiff (PAS)-hematoxylin. All sections were examined by using a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at a magnification of x 400.

Follicles were classified as preantral if they had no antrum. This included oocytes surrounded by one layer of flattened or one or more layers of cuboidal granulosa cells. Only preantral follicles in which the oocyte nucleus could be observed in the section were counted. Follicular quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte, granulosa cells, and basement membrane. Preantral follicles were histologically classified as (1) normal, if they contained an intact oocyte and intact granulosa cells, (2) degenerate, if they contained a pyknotic oocyte nucleus, shrunken ooplasm, accompanied or not by disorganized granulosa cells (e.g. enlargement in volume with or without detachment from the basement membrane). The presence of at least one of these mentioned features was indicative of atresia. A minimum of 150 follicles per treatment, per species, was evaluated.

Ovarian stroma density was evaluated by counting the stromal cells per 100 μm^2 . For each treatment, ten fields per slide were assessed and the mean number of stromal cells per field was calculated.

2.2.2. *Viability analysis of preantral follicles*

The effect of cryopreservation on the viability of preantral follicles was studied. Based on histological analysis, no further work was performed with 1.5 M EG. After dissection of the ovaries from three goats and three sheep, four fragments were obtained from each ovarian pair. One fragment (control) was immediately submitted to follicular isolation according to

procedures described for goat [13] and sheep [14], while the remaining fragments were exposed to 1.0 M EG for 5, 10 or 20 min and cryopreserved before follicular isolation. Only preantral follicles presenting normal morphology under an inverted light microscope were submitted to viability analysis. The viability of goat and sheep preantral follicles was analyzed by using live (calcein-AM) and dead (ethidium homodimer-1) cell markers as described by Santos et al. [15]. Preantral follicles were classified as viable if the cytoplasm of oocytes and granulosa cells was stained positively with calcein-AM (green) and chromatin was not stained with ethidium homodimer (red), otherwise they were considered non-viable if stained with ethidium homodimer-1 (Fig. 1).

2.3. Exposure and freeze-thaw procedures

Twelve ovarian fragments, per goat and per sheep, were individually placed in 2 mL maxi-straws (MINITUB do Brasil Ltda., Porto Alegre, Brazil) containing 1.8 mL of HMEM⁺ (HMEM + 10% fetal bovine serum; Laborclin, Pinhais, Brazil), either supplemented or not by 1.0 or 1.5 M EG. Exposure of ovarian fragments to the mentioned solutions was performed at 20°C for 5, 10 or 20 min. After exposure, six ovarian fragments were cryopreserved as described below. The other six fragments were submitted to cryoprotectant removal by a three-step equilibration (5 min each) in (i) HMEM⁺ + 0.5 M sucrose, (ii) HMEM⁺ + 0.25 M sucrose, and finally (iii) HMEM⁺ alone before routine histological analysis.

For freezing, maxi-straws were placed in a programmable freezer (Freeze Control, CryoLogic Pty Ltd., Australia) and cooled at 2°C/min from 20°C to −7°C; ice-induction (seeding) was manually performed by touching the straws with forceps pre-cooled in liquid nitrogen. After seeding, the straws were held at this temperature (−7°C) for 10 min and then

cooled at 0.3°C/min to -40°C and finally at 10°C/min to -70°C, after which the samples were plunged immediately into liquid nitrogen (-196°C) and stored for 1 week.

When required, the straws were thawed in air for 1 min at room temperature (~25°C) and then immersed in a water bath at 37°C until the cryopreservation medium had completely melted. The cryoprotectant was removed as described above for only exposed ovarian tissue, and ovarian fragments were fixed for histological examination.

2.4. Statistical analysis

Percentages of morphologically normal follicles and stroma cells density after exposure followed or not by cryopreservation were initially submitted to Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests to confirm normal distribution and homogeneity of variances, respectively. Analysis of variance was then carried out using the GLM procedure of SAS (1999) and Dunnett's test was applied to compare EG-treated groups against control. Student-Newman-Keuls (SNK) test was applied to compare different EG concentrations, times and procedures (exposure only or exposure followed by cryopreservation) and percentages of viable follicles recorded after validation test with fluorescent markers were analyzed by Chi-square test. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$ and results were expressed as mean $\pm$ SD.

3. Results

3.1. Percentages of morphologically normal goat and sheep preantral follicles

Histological analysis showed that morphologically normal (Fig. 2) and atretic preantral follicles (Fig. 3) were found after both exposure and cryopreservation procedures, as well as in ovarian fragments from the controls.

Table 1 shows the percentages of morphologically normal goat and sheep preantral follicles in ovarian fragments from control, and in those fragments submitted to EG exposure followed or not by cryopreservation. Percentages of morphologically normal goat (80.68%) and sheep (84.66%) preantral follicles in control groups were similar. Ovarian tissue exposure to EG, followed or not by cryopreservation resulted in a significant decrease in the percentages of morphologically normal preantral follicles when compared to control, except when goat ovarian tissue was exposed to 1.0 M EG for 5 min.

Increase in the exposure time, within each used concentration of EG (1.0 and 1.5 M), did not affect significantly the percentages of morphologically normal sheep preantral follicles. Unlikely, goat ovarian tissue exposed to 1.0 M EG for 20 min presented a significantly decrease in the percentage of morphologically normal preantral follicles when compared to 1.0 M EG exposure for 5 min. In addition, increase in EG concentration from 1.0 to 1.5 M did reduce significantly only the percentages of goat preantral follicles when exposure was performed for 5 min. When comparisons between goat and sheep follicles within the same exposure conditions were performed, no significant differences were observed, except after exposure to 1.5 M EG for 5 min that resulted in a lower percentage of normal goat preantral follicles when compared to sheep values (Table 1).

There was no significant effect of cryoprotectant concentration and exposure time on the percentages of normal cryopreserved goat and sheep preantral follicles. However, it was observed a significant reduction of normal goat (1.0 M EG for 5 and 10 min) and sheep (1.0 M EG in all exposure times and 1.5 M EG for 5 and 20 min) preantral follicles after cryopreservation when compared to exposure alone. No differences between goat and sheep

were observed when the percentages of cryopreserved normal preantral follicles were compared (Table 1).

3.2. Histological analysis of the ovarian stroma

Fig. 4 illustrates stromal tissue in the controls, after exposure and cryopreservation of goat and sheep ovarian tissue. Exposure to EG did not affect stroma cellular density. It was observed a significant decrease in stroma density after cryopreservation in both species, except when goat ovarian tissue was previously exposed to 1.0 M EG for 5 min. An exposure time effect was observed when goat ovarian tissue was cryopreserved in presence of 1.0 M EG for 20 min, resulting in lower stromal density than tissue exposed to 1.0 M EG for 5 or 10 min. When compared to exposure, freezing-thawing did reduce stromal cells density in goat and sheep tissue previously exposed to 1.0 M EG (10 and 20 min) and 1.5 M EG (5 min) (Fig. 5).

3.3. Assessment of follicular viability in goat and sheep

In total, viability was assessed in 360 preantral follicles per specie. Fig. 6 shows the percentages of viable preantral follicles. Among the groups that were evaluated, exposure to 1.0 M EG for 5 min in both species, and for 10 min, only goat, followed by cryopreservation, had the highest viability percentages, which were similar to those in non-frozen controls. As showed by histological analysis in the previous experiment, no differences between goat and sheep were observed when the percentages of cryopreserved viable preantral follicles were compared, except after exposure to 1.0 M EG for 10 min followed by cryopreservation.

4. Discussion

In the present study we have compared the effect of goat and sheep ovarian tissue cryopreservation not only on the follicular viability and morphology, but also on the stroma density. After testing the EG as cryoprotectant in two different concentrations (1.0 M or 1.5 M) and three different exposure times (5, 10 or 20 min), we have demonstrated that short-term exposure (5 min) to 1.0 M EG is sufficient to maintain follicular viability and stromal cells density in goat and sheep ovarian tissue after cryopreservation.

Except when used at 1.0 M for 5 min (only goat), exposure to EG did reduce the percentages of normal preantral follicles when compared to control. Toxicity of 1.5 M EG has been shown in goat [10] and sheep [7,16] ovarian tissue. In the present study we have observed that even in a lower concentration (1.0 M), EG impairs follicular morphology if exposure is performed for 10 or 20 min.

There was no difference of the percentages of morphologically normal preantral follicles when sheep and goat ovarian tissue were compared after exposure to EG, except after exposure to 1.5 M EG for 5 min. Interestingly, preantral follicles from both species did behave differently during exposure to 1.0 M EG. For instance, differently from goats, increase in the exposure time to 1.0 M EG from 5 to 20 min did not affect the percentages of normal sheep preantral follicles. We suggest that 1.0 M EG penetrates sheep ovarian tissue easier than goat ovarian tissue. This can be confirmed by the absence of time effect when ovarian fragments were exposed to 1.5 M EG. Pinto et al. [17] have reported a time effect when sheep ovarian tissue was exposed to DMSO, which may be due to the used cryoprotectant. According to Mazoochi et al. [18], the cyto-architecture of the mammalian ovary varies among species, which may also affect cell survival to cryopreservation procedures.

Furthermore, Chi et al. [19] have shown that cryoprotectant permeation may vary among species.

Cryopreservation did reduce the percentages of normal follicles in goat (1.0 M EG for 5 and 10 min) and sheep (1.0 M and 1.5 M EG for 5 and 20 min) when compared to exposure. However, when comparison was performed among freezing-thawing treatments no difference in the percentages of morphologically normal preantral follicles was observed. Recently, the toxicity of a cryoprotectant has been pointed as the main limiting factor for the successful preservation of living systems [20]. Our findings indicate that exposure to 1.0 M EG for 5 and 10 min, did allow sufficient cryoprotectant penetration into goat and sheep ovarian tissue without reaching the same toxic levels described after exposure to 1.0 M EG for 20 min.

Only cryopreservation did reduce stroma cellular density in both species and all treatments when compared to control, except in goat ovarian tissue previously exposed to 1.0 M EG for 5 min. We believe that as expected for follicular development [21], cryopreservation of ovarian follicles is dependent on the bi-directional contact between germinal and somatic cells. Cell-cell interaction, e.g. gap junctions and adhesions, alters cryopreservation response [22] and might have affected not only follicular morphology but also stromal cells. In previous reports, plasma membrane lyses of stromal cells [8] as well as necrosis of stromal cells accompanied by empty areas in the stromal tissue [23] have been related to cryopreservation. However, in both cases, the quality of the stromal cells was not evaluated immediately after exposure. In the present study, we have shown that although exposure did not result in reduced stromal cells density when compared to control, in some cases cell density was similar to values observed after cryopreservation. We suggest that an initial loss of stromal density may be caused by the cryoprotectant toxicity and not only by the freezing process.

According to Maltaris et al. [24] histological examination only shows a fraction of cryoinjuries and does not give detailed information about cells viability. To confirm our findings related to follicular morphology, only morphologically normal follicles at light microscopy were evaluated. A viability assay to evaluate ovarian follicles using calcein-AM and ethidium homodimer was employed. Such a method has been often performed to evaluate follicular viability in domestic mammals [25] and human [26], and allow a proper evaluation of follicular function. Unlikely morphological analysis, it was observed that follicular viability was maintained only in cryopreserved preantral follicles previously exposed to 1.0 M EG for 5 (sheep) and 10 (goat and sheep) min.

This is the first study comparing goat and sheep ovarian tissue cryopreservation. Although a same protocol applying short-term exposure (5 min) at a low concentration of EG (1.0 M) may be used in sheep and goats, there are species-specific differences related to the cryopreservation of ovarian tissue from these small ruminants. In addition, stromal cells density is negatively affected by cryopreservation. Further studies related to stromal cells and ovarian follicles survival after cryopreservation of ovarian tissue are crucial to understand the freezing-thawing procedures at cellular and molecular levels.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq and FUNCAP, Brazil. Luciana Rocha Faustino is a recipient of a grant from FUNCAP. The authors thank Dr. Maria Fátima da Silva Teixeira for the logistical support and Msc. Rafael Rossetto for his help in the images layout.

Conflict of interest

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

References

- [1] Salle B, Demirci B, Franck M, Berthollet C, Lornage J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertil Steril* 2003;80:172-7.
- [2] Santos RR, Knijn HM, Vos PL, Oei CH, Van Loon T, Colenbrander B, Gadella BM, Van den Hurk R, Roelen BA. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertil Steril* 2009;91:1455-8.
- [3] Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod* 1994;9:597-603.
- [4] Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002;77:403-8.
- [5] Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril* 2006;85:1208-15.
- [6] Rodrigues APR, Costa SHF, Santos RR, Amorim CA, Lucci CM, Bão SN, Nunes JF, Rondina D, Figueiredo JR. In vitro culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. *Cell Pres Tech* 2006;4:290-67.
- [7] Santos RR, Van den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR. Effect of cryopreservation on viability, activation and

- growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Reprod Sci* 2007;99:53-64.
- [8] Marsella T, Sena P, Xella S, La Marca A, Giulini S, De Pol A, Volpe A, Marzona L. Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing. *Reprod BioMed Online* 2008;16:257-67.
- [9] Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod BioMed Online* 2004;9:680-91.
- [10] Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Báo SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology* 2004a;61:1009-24.
- [11] Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Báo SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and prapanediol. *Anim Reprod Sci* 2004b;84:211-27.
- [12] Santos RR, Rodrigues APR, Costa SHF, Matos MHT, Báo SN, Lucci CM, Van den Hurk R, Figueiredo JR. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2006a;91:249-63.
- [13] Lucci CM, Amorim CA, Báo SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JRV, Gonçalves PBD. Effect of the interval of sections of ovarian tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 1999;56:39-49.
- [14] Amorim CA, Lucci CM, Rodrigues APR, Carvalho FCA, Figueiredo JR, Rondina D, Cecchi R, Giorgetti A, Martini A, Gonçalves PBD. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology* 2000;53:1251-62.

- [15] Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haeften T, Van den Hurk R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res* 2006b;325:523-31.
- [16] Tsuribe PM, Gobbo CAM, Landim-Alvarenga FC. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. *Fertil Steril* 2009;91:1976-83.
- [17] Pinto LC, Santos RR, Faustino LR, Silva CMG, Luz VB, Maia Jr JE, Soares AAX, Celestino JJH, Mafezoli, J, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Quantification of dimethyl sulfoxide perfusion in sheep ovarian tissue: a predictive parameter for follicular survival to cryopreservation. *Biopreserv Biobank* 2008;6:269-76.
- [18] Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla J. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008;90:1480-86.
- [19] Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS, Chung KS. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod* 2002;17:2146-51.
- [20] Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 2009;doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.05.005.
- [21] Cecconi S. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and perspective. *J Reprod Dev* 2002;48:431-45.
- [22] Liu BL, McGrath JJ. Effects of freezing on the cytoskeleton, focal adhesions and gap-junctions in murine osteoblast cultures. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2005;5:4896-9.

- [23] Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;doi:10.1093/humrep/dep079.
- [24] Maltaris T, Dragonas C, Hoffmann I, Muller A, Beckmann MW, Dittrich R. Simple prediction of the survival of follicles in cryopreserved human ovarian tissue. *J Reprod Develop* 2006;52:577-82.
- [25] Aerts JM, Martinez-Madrid B, Flothmann K, De Clerq JB, Van Aelst S, Bols PE. Quantification and viability assessment of isolated bovine primordial and primary ovarian follicles retrieved through a standardized biopsy pick-up procedure. *Reprod Domest Anim* 2008;43:360-6.
- [26] Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonckt A, Defrère S, Van Eyck AS, Donnez J. Ficoll density gradient method for recovery of isolated human primordial follicles. *Fertil Steril* 2004;82:1648-53.

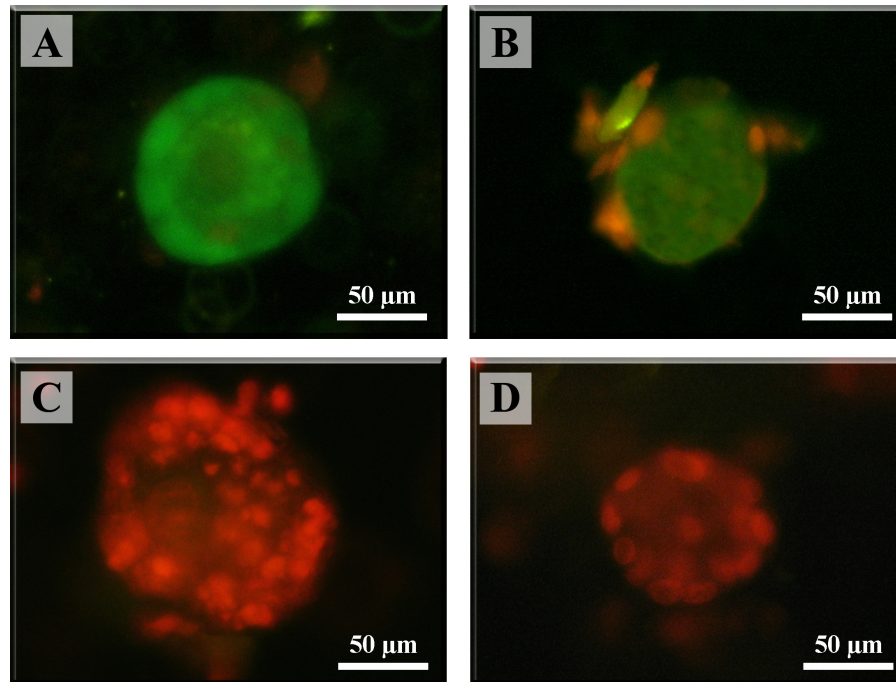


Fig. 1. Viability assessment of goat (A and C) and sheep (B and D) preantral follicles based on labeling of live cells with calcein-AM (green fluorescence) and dead cells with ethidium homodimer (red fluorescence). A and B: Representative images of viable goat and sheep preantral follicles, respectively. C and D: Representative images of non-viable goat and sheep preantral follicles, respectively.

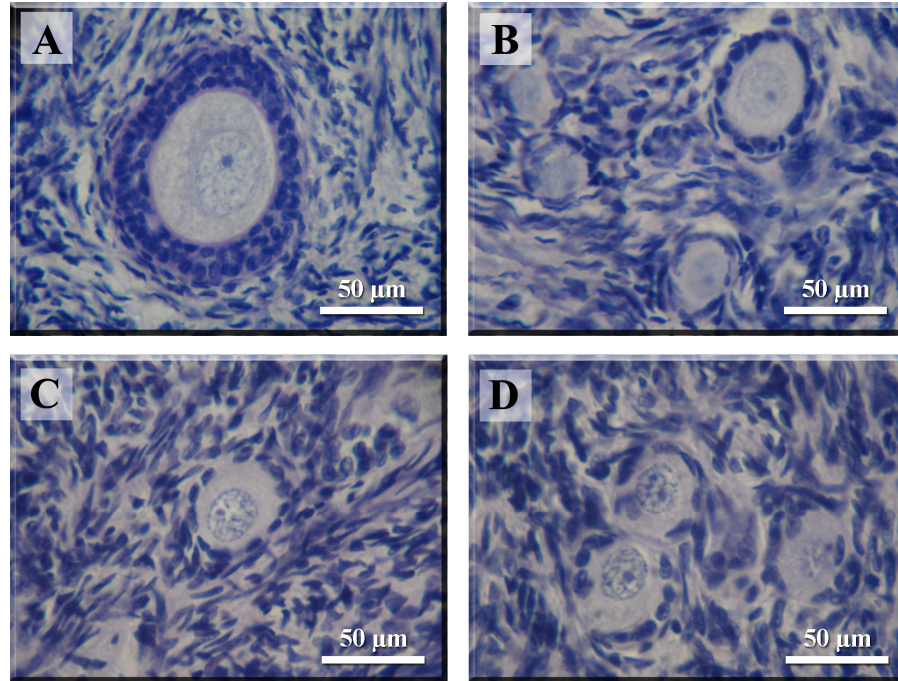


Fig. 2. Histological sections of goat and sheep normal preantral follicles. A and B: Morphologically normal goat follicles after exposure to 1.0 M EG for 5 min and to 1.5 M EG for 20 min, respectively. C and D: Morphologically normal sheep follicles after exposure to 1.0 M EG for 5 min and to 1.5 M EG for 20 min, respectively.

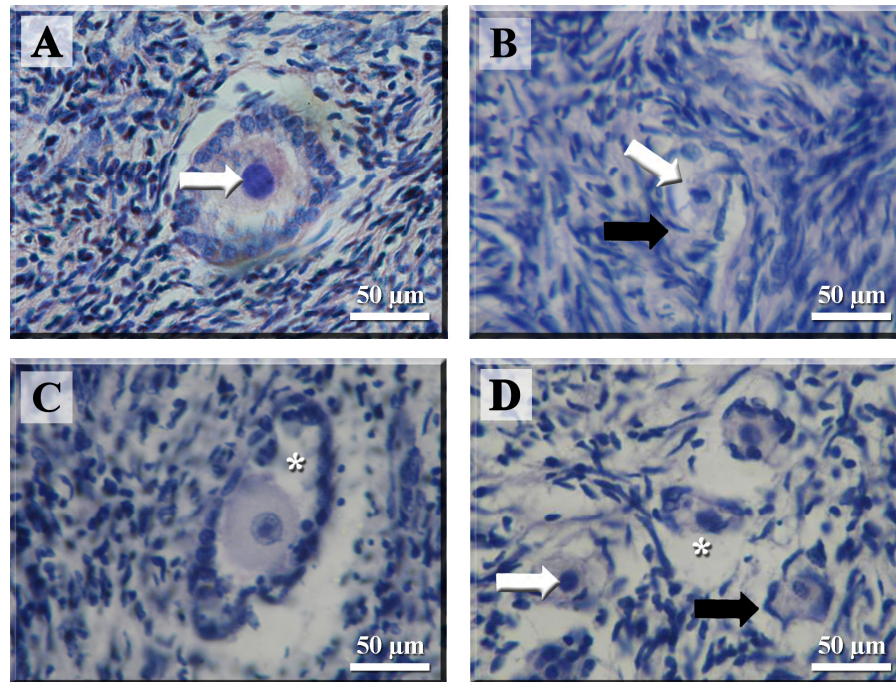


Fig. 3. Histological sections of goat and sheep atretic preantral follicles. A and B: Atretic goat follicles after exposure to 1.5 M EG for 5 and 20 min, respectively. C and D: Atretic sheep follicles after exposure to 1.5 M EG for 5 and 20 min, respectively. White arrows,, black arrows and asterisk indicate pyknotic nucleus, disorganization of granulosa cells and oocyte retraction, respectively.

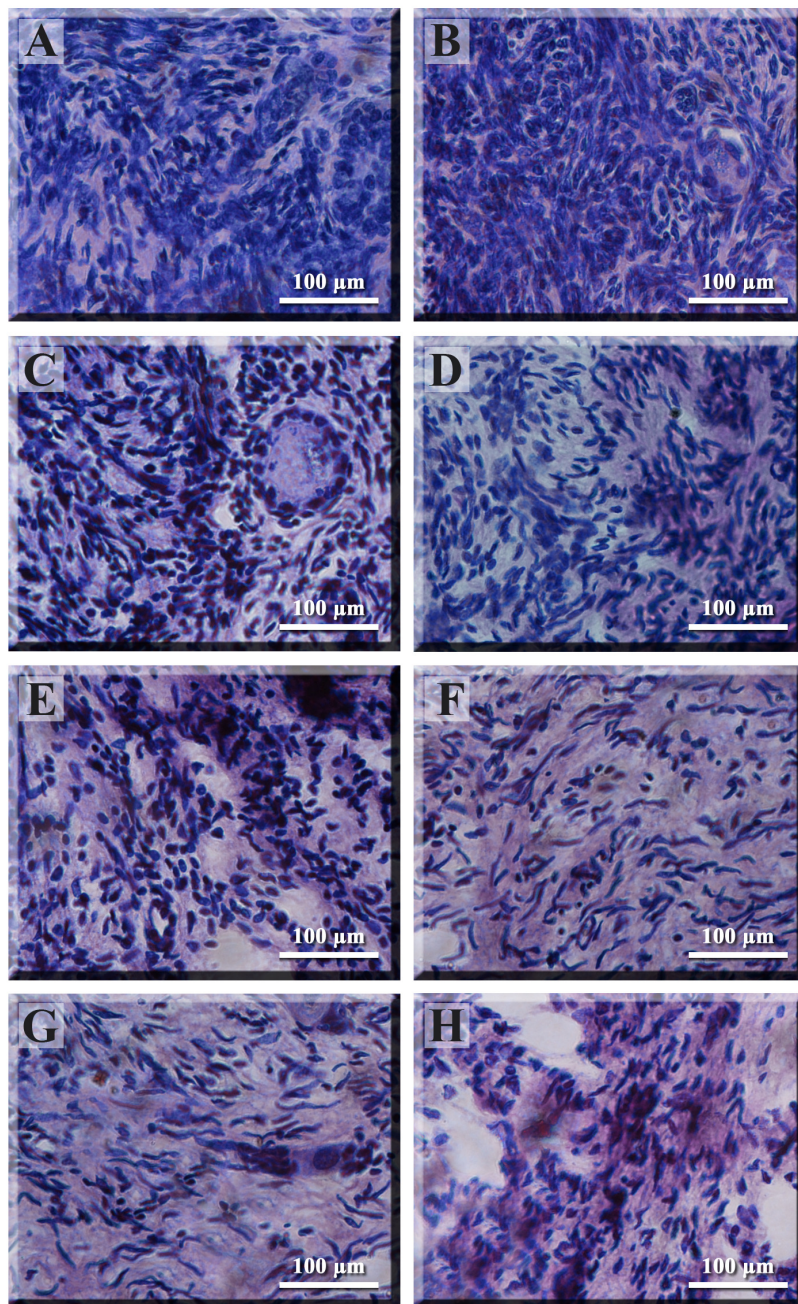


Fig. 4. Representative images of fresh (non-exposed and non-cryopreserved) goat (A) and sheep (B) ovarian cortex showing a dense stroma. Reduced stromal cells density was observed after goat ovarian tissue exposure to 1.5 M EG for 5 min (C), 10 min (E) and 20 min (G), followed by cryopreservation. A similar reduction was observed when sheep ovarian tissue was cryopreserved in any of the tested treatments, for e.g. 1.0 M EG for 5 min (D), 10 min (F) and 20 min (H).

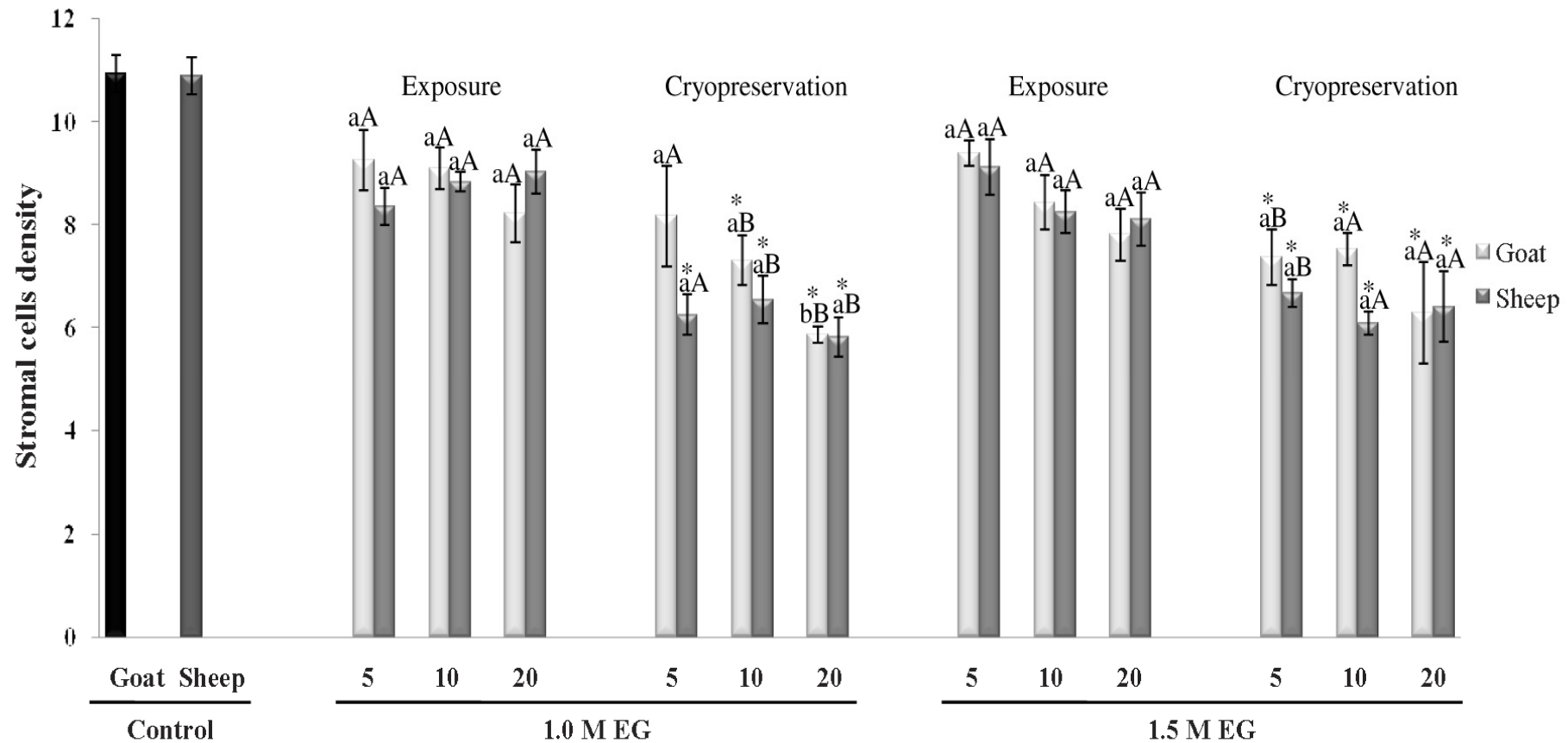


Fig. 5. Stromal cells density (cells/100 μm²) in control, exposed and cryopreserved ovarian tissue from goat (light grey) and sheep (dark grey).

*Differs significantly from control ($P < 0.05$); a, b: values differ significantly among the exposure times within the same tested EG concentration and procedure (exposure or cryopreservation); A, B: values differ significantly between procedure in the same exposure time and EG concentration.

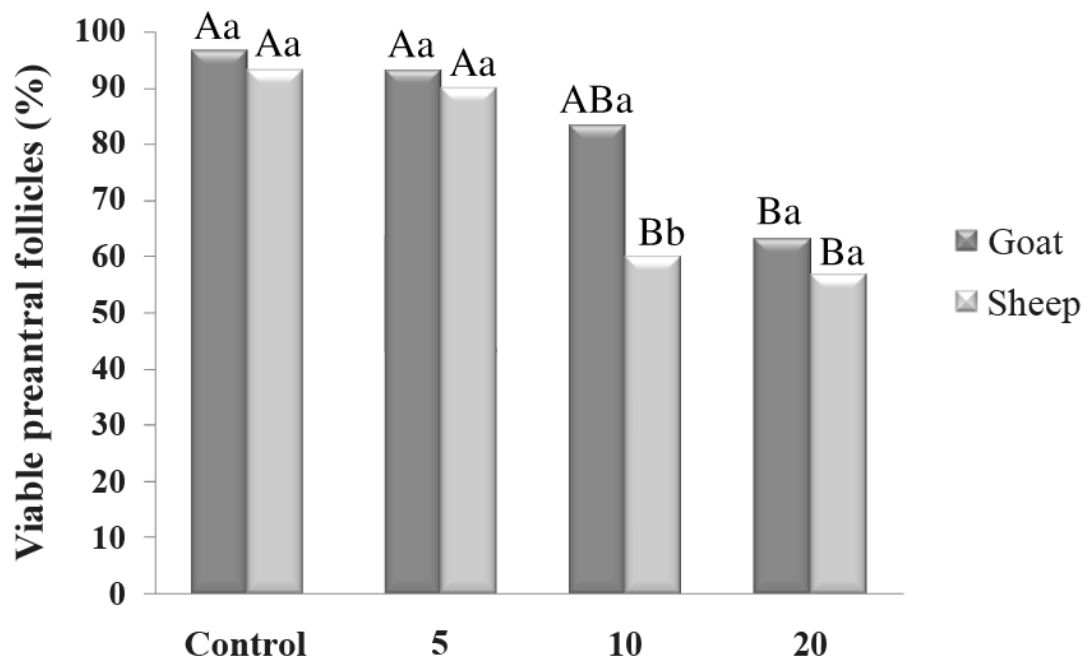


Fig. 6. Percentage of viable preantral follicles (calcein-AM positive and ethidium-homodimer negative) in ovarian fragments from goat (dark grey) and sheep (light grey) non-cryopreserved (control) and cryopreserved in 1.0 M EG for 5, 10 or 20 min ($n = 30$ follicles per treatment). A, B: values differ significantly among treatment for each species ($P < 0.05$); a, b: values differ significantly between species within the same treatment ($P < 0.05$).

Table 1. Percentage of morphologically normal goat and sheep preantral follicles in control (non-exposed) ovarian fragments and in fragments only exposed to EG for 5, 10 or 20 min at different concentrations (1.0 or 1.5 M) or exposed and subsequently cryopreserved ($n = 150$ follicles per treatment).

Species	Ethylene glycol							Procedure
	Control	5 min		10 min		20 min		
		1.0 M	1.5 M	1.0 M	1.5 M	1.0 M	1.5 M	
Caprine	80.68±4.34	71.34±9.02 ^{aA}	58.02±2.95 ^{*B♦}	60.66±6.41 ^{*ab}	52.66±6.43 [*]	55.32±9.62 ^{*b}	53.34±7.82 [*]	Exposure
		48.00±9.02 ^{*α}	56.00±10.39 [*]	47.34±10.36 ^{*α}	54.68±8.69 [*]	48.00±7.68 [*]	48.00±6.92 [*]	Cryopreservation
Ovine	84.66±5.09	68.00±6.51 [*]	69.34±7.62 [*]	61.30±8.37 [*]	61.32±8.35 [*]	65.34±5.57 [*]	62.68±7.97 [*]	Exposure
		44.68±8.37 ^{*α}	53.32±4.70 ^{*α}	47.32±8.30 ^{*α}	55.98±3.67 [*]	42.00±6.92 ^{*α}	45.32±9.62 ^{*α}	Cryopreservation

* Differs significantly from control ($P < 0.05$); a, b: values differ significantly among the exposure times within the same EG concentration tested; A, B: values differ significantly among the EG concentrations tested (1.0 and 1.5 M) within the same exposure time ($P < 0.05$); α : values differ significantly between the procedure (exposure and cryopreservation) within the same exposure times and EG concentrations ($P < 0.05$); ♦: values differ significantly between the species (caprine and ovine) within the same exposure times and EG concentrations.

7 CONCLUSÕES

Apesar de diferentes respostas ao procedimento de criopreservação do tecido ovariano caprino e ovino, uma melhor crioproteção dos folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano foi obtida utilizando um curto período de exposição (5 min) e baixa concentração de EG (1,0 M) em ambas as espécies.

Ao contrário da simples exposição do tecido ovariano ao EG, a criopreservação propriamente dita altera a densidade das células do estroma caprino e ovino.

8 PERSPECTIVAS

O protocolo de criopreservação apresentado no presente trabalho poderá ser utilizado de forma rotineira para a preservação de folículos pré-antrais inclusos em pequenos fragmentos de ovário de cabras e ovelhas de alto valor genético ou de raças em vias de extinção, visando a constituição de bancos de germoplasma animal. No entanto, para que essa técnica seja utilizada de forma eficiente, estudos para comprovar a capacidade do folículo de crescer e se desenvolver *in vitro* até sua maturação, após a congelação/descongelação, são de extrema necessidade.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J. M. J.; DE CLERCQ, J. B. P.; ANDRIES, S.; LEROY, J. L. M. R.; VAN AELST, S.; BOLS, P. E. J. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology*, v. 57, p. 163-169, 2008a.

AERTS, J. M.; MARTINEZ-MADRID, B.; FLOTHMANN, K.; DE CLERQ, J. B.; VAN AELST, S.; BOLS, P. E. Quantification and viability assessment of isolated bovine primordial and primary ovarian follicles retrieved through a standardized biopsy pick-up procedure. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 360-366, 2008b.

ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, v. 9, p. 815-827, 1994.

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

ANDERSEN, C. Y.; ROSENDAHL, M.; BYSKOV, A. G.; LOFT, A.; OTTOSEN, C.; DUEHOLM, M.; SCHMIDT, K. L. T.; ANDERSEN, A. N.; ERNST, E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 23, p. 2266-2272, 2008.

ARAV, A.; REVEL, A.; NATHAN, Y.; BOR, A.; GACITUA, H.; YAVIN, S.; GAVISH, Z.; URI, M. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Human Reproduction*, v. 20, p. 3554-3559, 2005.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanism of cryoprotectant action. In: K. Bowler, B. J. Fuller, eds. *Temperature and Animal Cells*. Cambridge: The Company of Biologists Ltd., 1987. p. 395-406.

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

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

BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FUTINO, D. O.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*, 2009 (no prelo).

BOSCH, P.; HERNANDEZ-FONSECA, H. J.; MILLER, D. M.; WININGER, J. D.; 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. 581-594, 2004.

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

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 05-13, 2006.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reproduction*, v. 10, p. 2334-2338, 1995.

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

CECCONI, S. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and perspective. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 48, p.431-452, 2002.

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

CHI, H. J.; KOO, J. J.; KIM, M. Y.; JOO, J. Y.; CHANG, S. S.; CHUNG, K. S. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Human Reproduction*, v. 17, p. 2146-2151, 2002.

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

CORMACK, D. H. O sistema reprodutor feminino. In: D.H. Cormack, *Ham Histologia*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 485-508.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 36, p. 03-09, 2001.

DEANESLY, R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *Journal of Endocrinology*, v. 11, p. 197-200, 1954.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *The Oncologist*, v. 12, p. 1437-1442, 2007.

DEMIRCI, B.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J. F.; LORNAGE, J. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep. *Fertility and Sterility*, v. 77, p. 595-600, 2002.

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

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*, v. 16, p. 1405-1410, 2004.

ELMOAZZEN, Heidi Yakout. Parameters affecting water permeability across biological cell membranes. 2000. 141f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering and Experimental Pathology) – University of Alberta, Edmonton, 2000.

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

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

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

FABBRI, R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. *Cell and Tissue Banking*, v. 7, p. 113-122, 2006.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, 2009 (in press).

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: P. B. D. Gonçalves, J. R. Figueiredo, V. J. F. Freitas. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 303-327.

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

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 9, p. 680-691, 2004.

GANDOLFI, F.; PAFFONI, A.; BRAMBILLA, E. P.; BONETTI, S.; BREVINI, T. A. L.; RAGNI, G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertility and Sterility*, v. 85, p. 1150-1156, 2006.

GOOK, D. A.; EDGAR, D. H.; BORG, J.; ARCHER, J.; LUTJEN, P. J.; MCBAIN, J. C. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Human Reproduction*, v. 18, p. 1772-1781, 2003.

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

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

GREEN, S. H.; SMITH, A. U.; ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in ovarian autographs after freezing and thawing. *Journal of Endocrinology*, v. 13, p. 330-334, 1956.

GUNASENA, K. T.; VILLINES, P. M.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Human Reproduction*, v. 12, p. 101-106, 1997.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v. 16, p. 57-63, 2008.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: B. Hafez, E. S. E. Hafez, *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 13-29.

HAIDARI, K.; SALEHNIA, M.; VALOJERDI, M. R. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. *Fertility and Sterility*, v. 90, p. 2389-2397, 2008.

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

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA, K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, v. 86, p. 1182-1192, 2006.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; KRAUSZ, T.; ABIR, R.; MARGARA, R.; TREW, G. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectant. *Human Reproduction*, v. 11, p. 1268-1272, 1996.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R. M. L. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction*, v. 12, p. 1032-1036, 1997.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 10, p. 729-734, 2005.

HUANG, J. Y. J.; CHEN, H.; TAN, S. L.; CHIAN, R. Effects of osmotic stress and cryoprotectant toxicity on mouse oocyte fertilization and subsequent embryonic development in vitro. *Biopreservation and Biobanking*, v. 4, p. 149-160, 2006.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 162-178, 2005.

IMHOF, M.; BERGMEISTER, H.; LIPOVAC, M.; RUDAS, M.; HOFSTETTER, G.; HUBER, J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertility and Sterility*, v. 85, p. 1208-1215, 2006.

JAIN, J. K.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*, v. 86, p. 1037-1046, 2006.

KARLSSON, J. O. M.; CRAVALHO, E. G.; TONER, M. Intracellular ice formation: causes and consequences. *Cryo-Letters*, v. 14, p. 323-336, 1993.

KARLSSON, J. O. M.; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, v. 17, p. 243-256, 1996.

KAROW, A. M. Cryobiology 2001 for mammalian embryologist. Augusta, Georgia, USA (Xytex Corporation). Disponível em: <<http://www.xytexinternational.com/pdf/cryobiology>>. Acesso em: 17 fev. 2009.

KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEIKHI, M.; VOLPE, A.; HREINSSON, J.; HOVATTA, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 2009 (*in press*).

KLEEGERGER, C. A.; LYLES, R. H.; MARGOLICK, J. B.; RINALDO, C. R.; PHAIR, J. P.; GIORGI, J. V. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 6, p. 14-19, 1999.

LIN, T.; YEN, J.; KUO, T.; GONG, K.; HSU, K.; HSU, T. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnology*, v. 8, p. 38-50, 2008.

LIU, B. L.; MCGRATH, J. J. Effects of freezing on the cytoskeleton, focal adhesions and gap-junctions in murine osteoblast cultures. *Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, v.5, p. 4896-4899, 2005.

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

LIU, L.; WOOD, G. A.; MORIKAWA, L.; AYEARST, R.; FLEMING, C.; MCKERLIE, C. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Human Reproduction*, v. 23, p. 122-128, 2008.

LOVELOCK, J. E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochimica et biophysica acta.*, v. 10, p. 414-426, 1953.

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

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

LUZ, V. B.; SANTOS, R. R.; PINTO, L. C.; SOARES, A. A. X.; CELESTINO, J. J. H.; MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. DMSO perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. *Fertility and Sterility*, v. 91, p. 1513-1515, 2009.

MALTARIS, T.; DIMMLER, A.; MÜLLER, A.; BINDER, H.; HOFFMANN, I.; KOHL, J.; SIEBZEHNRUÜBL, E.; BECKMANN, M. W.; DITTRICH, R. The use of an open-freezing system with self-seeding for cryopreservation of mouse ovarian tissue. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, p. 250-254, 2005.

MALTARIS, T.; DRAGONAS, C.; HOFFMANN, I.; MULLER, A.; BECKMANN, M. W.; DITTRICH, R. Simple prediction of the survival of follicles in cryopreserved human ovarian tissue. *The Journal of Reproduction and Development*, v. 52, p. 577-582, 2006.

MANDELBAUM, J.; JUNCA, A. M.; PLACHOT, M.; ALNOT, M. O.; ALVAREZ, S.; DEBACHE, C.; SALAT-BAROUX, J.; COHEN, J. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. *Human Reproduction*, v. 2, p. 709-715, 1988.

MARSELLA, T.; SENA, P.; XELLA, S.; LA MARCA, A.; GIULINI, S.; DE POL, A.; VOLPE, A.; MARZONA, L. Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 16, p. 257-267, 2008.

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

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFREÈRE, S.; VAN EYCK, A. S.; DONNEZ, J. Ficoll density gradient method for recovery of isolated human primordial follicles. *Fertility and Sterility*, v. 82, p. 1648-1653, 2004b.

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

MAZOOCHI, T.; SALEHNIA, M.; VALOJERDI, M. R.; MOWLA, J. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 90, p. 1480-1486, 2008.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, v. 71, p. 345-355, 1972.

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

MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophysics*, v. 6, p. 197-213, 1984.

MCGEE, H. A. JR.; MARTIN, W. J. Cryochemistry. *Cryogenics*, v. 2, p. 01-11, 1962.

MEIROW, D.; LEVRON, J.; ELDAR-GEVA, T.; HARDAN, I.; FRIDMAN, E.; ZALEL, Y.; SCHIFF, E.; DOR, J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, v. 353, p. 318-321, 2005.

MEIROW, D.; LEVRON, J.; ELDAR-GEVA, T.; HARDAN, I.; FRIDMAN, E.; YRMINI, Z.; DOR, D. Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth. *Fertility and Sterility*, v. 87, p. 418-418, 2007.

MERYMAN, H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review Biophysics*, v. 3, p. 341-363, 1974.

NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 11, p. 1487-1491, 1996.

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

NEWTON, H.; ILLINGWORTH, P. In vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 16, p. 423-429, 2001.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUBARD, Y. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertility and Sterility*, v. 354, p. 01-07, 1998.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*, v. 13, p. 1133-1138, 1998.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *The New England Journal of Medicine*, v. 342, p. 1919, 2000.

PAYNTER, S. J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Update*, v. 6, p. 449-456, 2000.

PINTO, L. C.; SANTOS, R. R.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; LUZ, V. B.; MAIA JÚNIOR, J. E.; SOARES, A. A. X.; CELESTINO, J. J. H.; MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Quantification of dimethyl sulfoxide perfusion in sheep ovarian tissue: a predictive parameter for follicular survival to cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, v. 6, p. 269-276, 2008.

QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, v. 22, p. 128-146, 1985.

RADFORD, J. Restoration of fertility after treatment for cancer. *Hormone Research*, v. 59, p. 21-23, 2003.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, v. 24, p. 387-402, 1985.

REVEL, A.; ELAMI, A.; BOR, A.; YAVIN, S.; NATAN, Y.; ARAV, A. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertility and Sterility*, v. 82, p. 1714-1715, 2004.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 61, p. 1009-1024, 2004a.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 211-227, 2004b.

RODRIGUES, A. P. 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.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; NUNES, J. F.; RONDINA, D.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. *Biopreservation and Biobanking*, v. 4, p. 290-267, 2006.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 644-645, 2002.

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

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

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

SANTOS, Regiane Rodrigues. Criopreservação de folículos pré-antrais ovinos. 2005. 182f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 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, 2006a.

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

SANTOS, R. R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 53-64, 2007a.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*, v. 327, p. 167-176, 2007b.

SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A. P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, p. 09-15, 2008.

SANTOS, R. R.; KNIJN, H. M.; VOS, P. L.; OEI, C. H.; VAN LOON, T.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; VAN DEN HURK, R.; ROELEN, B. A. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility*, v. 91, p. 1455-1458, 2009.

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

SEGINO, M.; IKEDA, M.; HIRAHARA, F.; SATO, K. In vitro development of cryopreserved mouse ovarian tissue. *Reproduction*, v. 130, p. 187-192, 2005.

SHAW, J. M. In: A. Trounson, D. Gardner. *In Vitro Fertilization*. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1993. Chap.11.

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

SILVA, José Roberto Viana. Growth factors in goat ovaries and the role of activina-A in the development of early-staged follicles. 2005. 142f. Thesis (Ph.D. in Morphology and Animal Reproduction) – Utrecht University, Utrecht, 2005.

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

STEPONKUS, P. L.; WEIST, S. C. Plasma membrane alterations following cold acclimation and freezing. In: P. H. Li, A. Sakai, *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress-Mechanisms and Crop Implications*. New York: Academic Press, 1978. p. 75-91.

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

SZÉLL, A.; SHELTON, J. N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, p. 699-703, 1986.

TAMILMANI, G.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; MUTHARAO, M.; RAO, V. H. Nuclear maturation of ovine oocyte in cultured preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 60, p. 295-305, 2005.

TAYLOR, M. J.; BUSZA, A. L. A convenient, non-invasive method for measuring the kinetics of permeation of dimethyl sulphoxide into isolated corneas using NMR spectroscopy. *Cryo-Letters*, v. 13, p. 273-282, 1992.

THOMAS, N.; BUSZA, A.; COOPER, A.; PAYNTER, S.; FULLLER, B.; SHAW, R. Measurement of permeating levels of cryoprotectant during ovarian tissue cryopreservation using H-NMR spectroscopy in human and porcine ovaries. *Cryo-Letters.*, v. 18, p. 179-184, 1997.

TSURIBE, P. M.; GOBBO, C. A. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. *Fertility and Sterility*, v. 91, p. 1976-1983, 2009.

VAN DEN BROECKE, R.; LIU, J.; HANDYSIDE, A.; VAN DER ELST, J.C.; KRAUSZ, T.; DHONT, M.; WINSTON, R. M.; HOVATTA, O. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 97, p. 193-201, 2001.

YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility and Sterility*, v. 83, p. 1248-1254, 2005.

ANEXO A (Composição do soro fetal bovino)



Corpo Técnico:
Dr. Carlos H. M. Mariano - CRM/PR 0007 - Diretor Técnico
Dr. Carlos A. Paszkowski - CRF/PR 3874
Dra. Márcia S. Romanel - CRF/PR 14.037

Dra. Eliete H. Uemura - CRF/PR 4811 - Responsável Técnica
Dra. Ana Lucia Monteiro - CRF/PR 5072

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Produto: **SORO FETAL BOVINO**

Código: 630101

Lote: 70815013

Data de Fabricação: 15/08/2007 Data de Validade: 04/08/2009

Registro na ANVISA: 100.970.10-106

1. Aparência física

Meio líquido translúcido, com coloração levemente amarelada, homogêneo e livre de precipitados ou partículas visíveis.

2. Análise bioquímica

	Metodologia	Dosagem
Ácido Úrico	Uricase - Peroxidase	1,50 mg / dl
Colesterol	Oxidase - Peroxidase	31,8 mg / dl
Creatinina	Jaffé modificado	3,4mg / dl
Glicose	Oxidase - Peroxidase	65,8 mg / dl
Hemoglobina		0,026 g / dl
Potássio	Fotometria de chama	11,0 mEq / l
Proteína Total	Eletroforese	3,73 g / dl
<i>Albumina</i>	Eletroforese	2,53 g / dl
<i>Alfa 1</i>	Eletroforese	1,17 g / dl
<i>Alfa 2</i>	Eletroforese	0,11 g / dl
<i>Beta</i>	Eletroforese	0,27 g / dl
<i>Gama</i>	Eletroforese	0,01 g / dl
Sódio	Fotometria de chama	120,0 Eq / l
Triglicéridos	GPO Trinder	59 mg / dl
Ureia	UV - Bun	41,0 mg / dl

Produto certificado segundo a Norma ISO 13485

Certificação em Boas Práticas de Fabricação e Controle pela ANVISA

Participante do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da SBPC (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica)

Participante do Programa Nacional de Controle de Qualidade da SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas)

R. Cassimiro de Abreu, 521
CEP 83321-210 Pinhais /PR

SAC 0800 - 410 - 027
Home page www.laborclin.com.br
e-mail sac@laborclin.com.br

C.O.C. 78.619.1130001-31
Inscrição Estadual 13.700.129-28
Reg. ANVISA. 100070

Página 1 de 2 Data: 11/9/2007

ANEXO A (Composição do soro fetal bovino)



Corpo Técnico:
 Dr. Carlos H. M. Viana - CRMVPR 9007 - Diretor Técnico
 Dr. Carlos A. Pastorelli - CRFPR 5874
 Dra. Melissa S. Romanelli - CRFPR 14.087

Dra. Elza H. Uemura - CRFPR 4211 - Responsável Técnica
 Dra. Ana Lucia Monteiro - CRFPR 5872

3. Análise enzimática

	Metodologia	Dosagem
Fosfatase Alcalina	Cinético AACC - 37°C	325 U / l
SGPT	Cinético IFCC - 37°C	6,9 U / l
SGOT	Cinético IFCC - 37°C	27,9 U / l

4. Análise física

Osmolaridade	240 - 340 mOsm / KgH ₂ O	304,2 mOsm / KgH ₂ O
--------------	-------------------------------------	---------------------------------

5. Análise em culturas celulares "IN VITRO"

Linhagens celulares utilizadas: Vero (ATCC CCL - 81) células de rim de macaco verde africano. Hep 2 (ATCC CCL - 23) células de carcinoma de laringe humana.
 Resultado: a eficiência de crescimento da amostra de soro Fetal Bovino foi avaliada na concentração de 10% em meio de Eagle no cultivo das linhagens celulares Hep 2 e Vero. Após 4 repiques consecutivos observamos que o número de células triplicou a cada 72 horas. Não foi observado efeito citopático.

6. Controle de esterilidade

72 horas em temperatura de 35 a 37°C: ausência de microorganismos.
 30 dias em temperatura de 25 a 30°C: ausência de microorganismos.

7. Pesquisa de micoplasma

Ausência de micoplasma (testado em U10, MLA e A7).

8. Conclusão:

O desempenho do lote analisado foi considerado em conformidade com o esperado frente aos quesitos acima apresentados, sendo portanto considerado **Aprovado** para uso.

OB8: Produto destinado ao uso diagnóstico IN VITRO.

Este certificado antes de ser digitado e impresso foi conferido e aprovado pelo Supervisor do Laboratório de Controle de Qualidade, Melissa S. Romanelli - CRFPR 14.087

Produto certificado segundo a Norma ISO 13485

Certificação em Boas Práticas de Fabricação e Controle pela ANVISA.

Participante do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da SBPC (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica)

Participante do Programa Nacional de Controle de Qualidade da SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas)

R. Casemiro da Abreu, 521
 CEP 83321-210 Pinheiro Açu

SAC 0800 - 410 - 027
 Home page: www.laborclin.com.br
 e-mail: sac@laborclin.com.br

C.G.C. 78.819.113/0001-31
 Inscrição Estadual 13.700.129-28
 Reg. ANVISA: 100670

Página 2 de 2 Data: 11/9/2007