



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

***ESTUDO DA POPULAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIAS
DE CADELAS.***

JOSÉ LUIZ JIVAGO DE PAULA RÔLO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA - DF

2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

***ESTUDO DA POPULAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIAS
DE CADELAS.***

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Madeira Lucci

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

BRASÍLIA-DF

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Luiz e Maria Aparecida, por serem os responsáveis pela minha existência, formação e por tudo que sou hoje.

"A vida sem ciência é uma espécie de morte. "

(Sócrates)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora Carolina Madeira Lucci, Chefia. Palavras são poucas para expressar a admiração e honra que tenho por ser seu aluno e fazer parte do ReproUnB. "Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."
(Cora Coralina)

Aos amigos do ReproUnB, que de uma forma ou outra ajudaram nesse trabalho. À Alice Campos e Osmar por ajudarem na parte da morfometria e população, Fernanda e Michelle que foram fundamentais para a execução da criopreservação e por sempre manter o ambiente alegre. E a Renata que dedicou muitas horas no final de semana para ajudar na MET. A verdadeira gratidão que tenho por essas pessoas não poderia ser escrita nem em um livro, quanto mais em poucas linhas. "Os laços de amizade são mais estreitos dos que os de sangue e da família." (Giovanni Boccaccio)

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial à Professora Doutora Sônia Bão, por todos os ensinamentos e pela infraestrutura disponibilizada para que o trabalho fosse executado. Ao Departamento de Genética e Morfologia, em especial ao Professor Ricardo Bentes e sua equipe, por sempre facilitar a execução do nosso projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, por ajudar ainda mais na minha formação profissional e a todos os professores que fazem parte do quadro.

À CAPES pela bolsa por um período do mestrado, à FINATEC, FAPDF, CNPq e FINEP pelo financiamento do projeto.

Aos meus amigos que sempre incentivaram o meu trabalho e torceram pra que tudo corresse bem. À minha família que soube compreender os momentos de ausência e falta de paciência.

E por último, mas não menos especial, à Ana Paula Strack, que além de ajudar na execução desse projeto, é uma das pessoas que fazem minha vida ter sentido e me ajuda a construir um dia melhor, todo dia. A outra pessoa é a minha filha Lara, que da experiência e inocência dos seus 3 anos de idade consegue resolver todos os meus problemas com um “eu te amo, Papai”. Muito obrigado. "A suprema felicidade da vida é a convicção de ser amado por aquilo que você é; ou, mais corretamente, de ser amado apesar daquilo que você é."
(Victor Hugo)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS REPRODUTIVOS EM CÃES DOMÉSTICOS.....	4
FOLICULOGÊNESE	6
CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS.....	10
A TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	11
CONGELAMENTO LENTO	13
VITRIFICAÇÃO	18
ESTUDOS DE CRIOPRESERVAÇÃO EM CANÍDEOS.....	21
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
FASE I: ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE CADELAS.....	26
FASE II: CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO OVARIANO DE CADELAS	29
RESULTADOS	34
FASE I: ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE CADELAS.....	34
FASE II: CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO OVARIANO DE CADELAS.....	38
DISCUSSÃO	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIÇÕES

CCOs – complexo cumulus-ovócito

CE – cultivo embrionário

CL – congelamento lento

d – dias

FIV – fertilização *in vitro*

FOPA – folículo ovariano pré-antral

h – horas

HE – hematoxilina e eosina

ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozoide

M – molar

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MIV – maturação *in vitro*

ML – microscopia de luz

TRA – técnicas de reprodução assistida

V – vitrificação

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi definir as características populacionais, morfológicas e ultraestruturais de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) e comparar o efeito das técnicas de criopreservação de congelamento lento (CL) e vitrificação (V) de tecido ovariano de cadela sobre a morfologia dos FOPA. A média da estimativa da população de FOPA de cadelas foi de 48541 ± 18366 , onde 94,25% eram primordiais (45145 ± 16076), 4,92% primários (2358 ± 1253) e 0,83% secundários (397 ± 351). A média de diâmetro do folículo, ovócito e núcleo do ovócito e número de células da granulosa de folículos primordiais foram $27,5 \pm 4,2 \mu\text{m}$, $21,7 \pm 2,7 \mu\text{m}$ e $11,3 \pm 1,6 \mu\text{m}$ e $6,0 \pm 1,8$ respectivamente. Para folículos primários foram, respectivamente, $42,6 \pm 12,5 \mu\text{m}$, $27,8 \pm 7,5 \mu\text{m}$, $13,7 \pm 2,6 \mu\text{m}$ e $15,0 \pm 7,0$. Para folículos secundários, foi $101,6 \pm 62,9 \mu\text{m}$ para diâmetro do folículo, $48,0 \pm 12,6 \mu\text{m}$ para diâmetro do ovócito, $18,7 \pm 4,2 \mu\text{m}$ para diâmetro do núcleo do ovócito e $61,5 \pm 63,5$ células da granulosa. A porcentagem total de FOPA morfolologicamente normais foi de $93,66 \pm 6,81\%$ para o grupo controle, $86,16 \pm 11,05\%$ para o CL e $68,14 \pm 12,75\%$ para a V. Para folículos primordiais a porcentagem de FOPA normais foi $96,69 \pm 4,72\%$ no controle, $89,51 \pm 10,39\%$ no CL e $75,32 \pm 9,23\%$ na V. Para folículos primários e secundários os valores foram, respectivamente, $94,80 \pm 6,91\%$ e $87,62 \pm 17,12\%$ para o controle, $86,8 \pm 12,15\%$ e $76,35 \pm 26,34\%$ para CL e $61,53 \pm 14,78$ e $52,25 \pm 22,13\%$ para a V. Não houve diferença significativa na porcentagem de FOPA morfolologicamente normais entre o CL e o grupo controle. Já na V essa porcentagem foi significativamente inferior aos outros 2 grupos ($P < 0,05$). A ultraestrutura de folículos pré-antrais de cadela mostrou ser semelhante à descrita para outras espécies. Após criopreservação por CL os folículos apresentaram danos ultraestruturais, enquanto após vitrificação os folículos primordiais e primários estavam bem preservados. No entanto, os

folículos secundários foram muito danificados em ambos os tratamentos. Em conclusão, este trabalho descreveu as características morfométricas, ultraestruturais e populacionais dos FOPA de cadela. A vitrificação foi mais eficiente em preservar a ultraestrutura dos folículos primordiais e primários que o congelamento lento. Os dois métodos de criopreservação testados apresentam resultados promissores, mas ainda precisam de aperfeiçoamento, especialmente em relação à preservação de folículos secundários.

ABSTRACT

The aim of this study was to define the population, morphological and ultrastructural characteristics of bitch preantral follicles (PAF) and to compare the effects of two cryopreservation techniques - slow freezing (SF) and vitrification (V) - of bitches ovarian tissue on the morphology of PAF. The average population of PAF was $48,541 \pm 18,366$, where 94.25% were primordial (45145 ± 16076), 4.92% primary (2358 ± 1253) and 0.83% secondary (397 ± 351). The average diameter of the follicle, oocyte and the oocyte nucleus and the number of granulosa cells for primordial follicles were $27.5 \pm 4.2\mu\text{m}$, $21.7 \pm 2.7\mu\text{m}$, $11.3 \pm 1.6\mu\text{m}$ and 6.0 ± 1.8 , respectively. For primary follicles the values were, respectively, $42.6 \pm 12.5\mu\text{m}$, $27.8 \pm 7.5\mu\text{m}$, $13.7 \pm 2.6\mu\text{m}$ and 15.0 ± 7.0 . For secondary follicles follicle diameter was $101.6 \pm 62.9\mu\text{m}$, oocyte diameter was $48.0 \pm 12.6\mu\text{m}$, nucleus diameter was $18.7 \pm 4.2\mu\text{m}$, and the number of granulosa cells was 61.5 ± 63.5 . The overall percentage of morphologically normal PAF was $93.66 \pm 6.81\%$ for the control group, $86.16 \pm 11.05\%$ for SF and $68.14 \pm 12.75\%$ for V. The percentage of normal primordial follicles was $96.69 \pm 4.72\%$ in control, $89.51 \pm 10.39\%$ in SF and $75.32 \pm 9.23\%$ in V. For primary and secondary follicles values were respectively $94.80 \pm 6.91\%$ and $87.62 \pm 17.12\%$ for control, $86.8 \pm 12.15\%$ and $76.35 \pm 26.34\%$ for SF and 61.53 ± 14.78 and $52.25 \pm 22.13\%$ for V. There was no significant difference on the percentage of normal PAF among SF and the control. However, V presented a significantly lower percentage of normal PAF than the other two groups ($P < 0.05$). The ultrastructure of bitch PAF was similar to that described for other species. After, SF follicles presented ultrastructural damage, while after V, primordial and primary follicles were well preserved. Secondary follicles, however, suffered many damages in both cryopreservation techniques. In conclusion, this work described the morphometric and

ultrastructural characteristics and the population of bitch PAF. Vitrification was more effective in preserving the ultrastructure of primordial and primary follicles than slow freezing. Both methods are promising, but need improvement, especially concerning secondary follicles preservation.

INTRODUÇÃO

A criobiologia tem revolucionado os estudos em reprodução pela possibilidade de ter aplicações clínicas na medicina reprodutiva e por permitir a preservação de material genético de animais de raças raras, em vias de extinção e de animais de interesse comercial. Técnicas de criobiologia vêm sendo usadas para armazenar sêmen, embriões, ovócitos maduros e, mais recentemente, folículos ovarianos pré-antrais. As primeiras tentativas de criopreservar FOPA foram feitas nos anos 50 (Parkes e Smith, 1953; Green *et al.*, 1956; Deanesly, 1957). Entretanto, somente nos anos 1990, a pesquisa envolvendo folículos ovarianos pré-antrais foi abordada com a possibilidade de se preservar os gametas femininos (para revisão vide Amorim *et al.*, 2003a).

Em contraste com a técnica bem estabelecida de criopreservação de espermatozoides de algumas espécies, a criopreservação de ovócitos é bastante difícil. Por um lado, ovócitos maduros são muito mais susceptíveis a danos durante o congelamento que ovócitos imaturos (Denschlag *et al.*, 2005). Além disso, há indícios de que folículos ovarianos primordiais sejam mais tolerantes à criopreservação, pelo seu tamanho pequeno e morfologia relativamente inespecífica (Paris *et al.*, 2004), além de serem quiescentes e com baixo metabolismo e não possuírem fuso meiótico (Gunasena *et al.*, 1997), nem zona pelúcida e grânulos da cortical (Akar e Oktay, 2005). Outra vantagem dos FOPA é que eles estão em maior quantidade no ovário e estão presentes em qualquer fase da vida do animal.

Uma vez que o tecido é colocado em nitrogênio líquido, presumivelmente é possível estocá-lo indefinidamente, permitindo o estabelecimento de bancos de tecido ou repositório de células germinativas e tecidos. Isto é de particular importância para espécies que estão se tornando menos comuns, já que o material congelado poderia ser

potencialmente usado subsequentemente em tecnologias de reprodução assistida (Paris *et al.*, 2004). A preservação com sucesso de tecido ovariano a baixas temperaturas por prolongados períodos de tempo é atualmente uma metodologia bem estabelecida para a espécie humana (Bosch *et al.*, 2004). O congelamento de tecido ovariano é um método simples e efetivo de conservar a linhagem germinativa feminina em vários estágios de desenvolvimento (Paris *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo características reprodutivas de cadelas domésticas ainda não foram totalmente descritos na literatura. Essa lacuna existente deve ser preenchida, pois o canino é uma espécie que vem apresentando um crescente investimento por parte de criadores de várias raças, proporcionando com a cinofilia um aumento significativo no fluxo de capital para melhora de plantéis e conservação de material genético de animais de alto valor zootécnico. Além disso, o cão é um modelo experimental muito importante para os canídeos silvestres ameaçados de extinção, fato esse que pode facilitar as pesquisas para conservação desses animais, uma vez que, a escassez e a dificuldade de manejo de animais silvestres tornam difíceis as pesquisas de base envolvendo os mesmos.

O desenvolvimento de biotécnicas de reprodução é fundamental para que possamos aproveitar todo o potencial reprodutivo tanto de animais domésticos e selvagens quanto de humanos. Entretanto, para que uma biotécnica seja bem aplicada se faz necessário o conhecimento prévio da fisiologia e das características morfofuncionais dos gametas da espécie a ser trabalhada. Este trabalho irá abordar as características populacionais, morfológicas e ultraestruturais dos folículos ovarianos pré-antrais da cadela, um animal doméstico comum, que apesar disso não apresenta muitos estudos em relação às suas características reprodutivas. Neste trabalho também foram realizados estudos sobre

criopreservação, no qual, os folículos pré-antrais de cadelas foram criopreservados e sua morfologia e ultraestrutura foram analisadas.

REVISÃO DE LITERATURA

IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS REPRODUTIVOS EM CÃES DOMÉSTICOS

Os cães têm uma relação única com os seres humanos. Eles foram a primeira espécie a ser domesticada, na Eurásia, há pelo menos, 15.000-40.000 anos (Boyko *et al.*, 2009). Até os dias de hoje, os cães (*Canis familiaris*) servem como animais de trabalho e companheiros valiosos, e foram criados para exibir mais diversidade fenotípica do que qualquer outro mamífero.

A cadela é monoestral poliovulatória não sazonal. O ciclo reprodutivo é dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro. O ciclo reprodutivo da cadela apresenta características peculiares em relação a outras espécies domésticas. Por exemplo, as concentrações sanguíneas de progesterona começam a subir poucos dias antes da ovulação (antes do pico pré-ovulatório de LH). Essa luteinização pré-ovulatória, com a concentração de progesterona no sangue elevada no momento da ovulação é típica dos Canídeos. Além disso, os ovócitos são ovulados em um estágio diploide imaturo (vesícula germinativa) e completam sua maturação meiótica na tuba uterina, onde podem sobreviver por vários dias (Betteridge, 1995).

Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) como maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos e criopreservação de gametas femininos, apresentam uma aplicação limitada na espécie canina quando comparadas com outras espécies domésticas e experimentais. No entanto, essas técnicas podem ser importantes para a melhora reprodutiva de cães de companhia e de trabalho, incluindo os cães guia para cegos. Embora os cães guia notavelmente contribuam para a melhora na qualidade de vida das pessoas com a capacidade visual diminuída, muitos países sofrem com a escassez de cães capacitados para esse serviço (Abe

et al., 2008). No Brasil, o número de cães guia é ínfimo diante do universo de pessoas que poderiam ser beneficiadas. O Conselho Brasileiro de Oftalmologia – CBO – revelou que existem aproximadamente 5.400.000 (cinco milhões e quatrocentas mil) pessoas com deficiência visual (cegas ou com baixa visão), considerando-se a população brasileira de 191.000.000 (cento e noventa e um milhões) de habitantes (IBGE, 2010). Enquanto isso há 2000 pessoas na fila de espera para obter um cão guia, com cujo auxílio apenas cerca de 70 pessoas podem contar atualmente no Brasil. Já foi descoberto que alguns genes (comunicação pessoal) estão relacionados a determinados comportamentos interessantes a cães-guias de cegos (Arata *et al.*, 2010), e embora a fêmea canina seja prolífica, não há fornecimento de um número de filhotes aptos tão grande quanto o necessário. Da mesma forma, criadores de cães de raças puras possuem dificuldades em aproveitar ao máximo o potencial genético dos animais. Desta forma, as técnicas de reprodução assistida, como a criopreservação de células germinativas, pode contribuir para multiplicação destes animais.

Além disso, a ordem Carnívora, onde são inseridos os canídeos, apresenta em sua totalidade 24% de espécies ameaçadas de extinção (Gittleman *et al.*, 2001). Canídeos como o lobo da Etiópia (*Canis siemensis*) estão rapidamente se encaminhando para uma extinção inevitável (Purvis *et al.*, 2001). No Brasil, das seis espécies nativas, 50% (cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas - *Atelocynus microtis*, lobo-guará - *Chrysocyon brachyurus*, e cachorro-vinagre - *Speothos venaticus*) estão próximas da ameaça de extinção e os outros 50% (cachorro-do-mato - *Cerdocyon thous*, graxaim - *Pseudalopex gymnocercus*, e raposa-do-campo - *Pseudalopex vetulus*) tem um status de menor preocupação (IUCN, 2011). Portanto, estudos com cães domésticos podem ser importantes pra preservação destas espécies devido a proximidade filogenética das mesmas.

FOLICULOGÊNESE

Ao nascer, o ovário mamífero contém um grande estoque de folículos, dos quais apenas um pequeno número é utilizado durante a vida reprodutiva da fêmea. O total da população folicular nos ovários de mamíferos consiste de uma grande reserva de folículos primordiais quiescentes e um número muito menor de folículos em fase de crescimento (Cahill e Mauleon, 1981).

Didaticamente, os folículos ovarianos podem ser divididos em classes, de acordo com suas características morfológicas. Folículos primordiais possuem os ovócitos circundados por uma camada de células da granulosa pavimentosas ou pavimentosas-cuboidais. Folículos primários possuem uma única camada de células da granulosa cuboidais ao redor do ovócito e folículos secundários apresentam duas ou mais camadas de células da granulosa cuboidais ao redor do ovócito (Hulshof *et al.*, 1994). Nessas três categorias, ainda não ocorre a formação do antro, e portanto os folículos são considerados pré-antrais. O antro é uma cavidade que começa a aparecer quando o folículo possui de 6 a 12 camadas de células da granulosa e nessa cavidade começa-se a acumular o líquido folicular, a partir desse momento o folículo é chamado de folículo antral (Ross e Pawlina, 2006).

A medida que o folículo antral aumenta de tamanho, o antro também aumenta, o ovócito fica excêntrico e é circundado por células que vão se tornar a *corona radiata* após a ovulação e mantém a ligação com o folículo pelas células do *cumulus oophorus*. Nessa fase o folículo atinge um tamanho em que a ovulação já é possível. Ele é chamado de folículo pré-ovulatório (Ross e Pawlina, 2006).

A população de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) foi estimada por diferentes autores em algumas espécies (Tabela 1), no entanto estes dados ainda não foram descritos

para cadelas. Além disso, a população de folículos ovarianos pré-antrais pode ser afetada por vários fatores, incluindo idade (Erickson, 1966a; Erickson, 1966b), raça (Cahill e Mauleon, 1981), a concentração hormonal e o estado reprodutivo (Erickson *et al.*, 1976).

Tabela 1. Revisão dos dados descritos na literatura sobre população de folículos ovarianos pré-antrais relatada em diferentes espécies

Espécie	População de Folículos Pré-antrais
Bovino	
<i>Bos indicus</i>	35.288 ¹ (meio ovário) 39,438 ²
<i>Bos taurus</i>	89,577 ²
Bubalino	19.819 ³
Ovino	76.753 ⁴
Caprino	37.646 ⁵
Humano	402 000 ⁶
Macaco-Prego (<i>Cebus apella</i>)	108.216 ⁷
Gato Doméstico	37.853 ⁸

¹ Lucci *et al.*, 2002 ² Silva-Santos *et al.*, 2011 ³ Mondadori *et al.*, 2010 ⁴ Land, 1970 ⁵ Lucci *et al.*, 1999 ⁶ Gougeon *et al.*, 1994 ⁷ Domingues *et al.*, 2003 ⁸ Carrijo Júnior *et al.*, 2010

Além disso, estudos da morfometria e ultraestrutura de folículos pré-antrais também já foram realizadas em outras espécies, como caprinos (Lucci *et al.*, 1999), bovinos (Kacinskis *et al.*, 2005), bubalinos (Mondadori *et al.*, 2010), suínos (Silva *et al.*, 2011) e felinos (Carrijo Júnior *et al.*, 2010).

Em cadelas, diferente de outras espécies, há poucos relatos a este respeito na literatura. Diagone *et al.*, (2008) fizeram a morfometria dos ovócitos inclusos em folículos ovarianos de cadelas, onde todas as classes foliculares são avaliadas (conforme a classificação de Ross e Pawlina, 2006) e obtiveram a média de diâmetro citoplasmático de: 33,37µm em folículos primordiais, 42,50µm em folículos primários unilaminares e 88,80µm para folículos primários multilaminares. Um estudo de Dolezel *et al.*, (2004) descreve a população folicular encontrada em uma área de 50 mm² de ovário. No entanto este dado não pode ser considerado uma estimativa populacional, visto que apenas uma pequena área

foi avaliada. Existe ainda um trabalho recente (Lopes *et al.*, 2009) que descreve a morfologia e a ultraestrutura que deve apresentar um folículo ovariano pré-antral normal, porém o enfoque deste trabalho não foi caracterizar os estágios de desenvolvimento folicular, e sim obter um padrão para ser utilizado como controle em um estudo de preservação de FOPA em curtos períodos de tempo, dando especial atenção aos folículos primordiais. Além disso, há um trabalho descrevendo a ultraestrutura de ovócitos de folículos antrais de cadelas que foram maturados *in vitro* (de Lesegno *et al.*, 2008). Desta forma, o estudo em cadelas apresenta lacunas, com poucos artigos publicados sobre o tema.

Uma das características principais da foliculogênese canina é a alta incidência de folículos poliovulares (Telfer e Gosden, 1987). Esta incidência é em média 40%, sendo particularmente elevada em ovários de cadelas mais jovens (68% e 62% para pré-púberes e cadelas com menos de 1 ano, respectivamente), e diminui com o avançar da idade (Payan-Carreira e Pires, 2008). O potencial de desenvolvimento desses folículos é obscuro. No estudo de Reynaud *et al.*, (2009a), em que um grande número de folículos pré-ovulatórios foram estudados, demonstrou-se que folículos poliovulares são também comumente observados em fases terminais de crescimento do folículo. Sua presença entre folículos com diâmetro ovulatório sugere que folículos poliovulares também ovulam. Dois estudos anteriores (Bysted *et al.*, 2001 e Reynaud *et al.*, 2005) também sugeriram que folículos poliovocitários podem ovular. No entanto, como observado em folículos secundários (Telfer e Gosden, 1987 e Barber *et al.*, 2001) mesmo quando vários ovócitos estão presentes em um mesmo folículo, esses ovócitos podem ser diferentes. De fato, neste estudo (Reynaud *et al.*, 2009a), os autores observaram também que outras diferenças na morfologia como, coloração do citoplasma, mucificação funcional do *cumulus* e aspectos nucleares evidenciam que podem existir ovócitos em um mesmo folículo em fases de desenvolvimento diferentes.

Assim, um único (possivelmente dois) ovócito por folículo poliovular pode ter a capacidade de ser fecundado e desenvolver. Os principais fatores envolvidos nessa seleção intrafolicular, dentre tantos, continuam sendo pesquisados, com muitas causas ainda desconhecidas (Reynaud *et al.*, 2009a).

De toda a população folicular presente no ovário, apenas cerca de 0,1% destes será ovulado (Nuttinck *et al.*, 1993), enquanto os demais folículos são “perdidos” via atresia durante o desenvolvimento folicular (Carroll *et al.*, 1990; Ojala *et al.*, 2002). A população folicular total no ovário de mamíferos consiste em uma grande reserva de folículos primordiais quiescentes, e um número muito menor de folículos em fase de crescimento (Cahill e Mauleon, 1981). A vantagem dos estudos envolvendo folículos pré-antrais é que eles estão disponíveis em maior quantidade no ovário e estão presentes em qualquer fase da vida do animal. Por estes motivos, os folículos ovarianos pré-antrais são considerados uma fonte estratégica de células germinativas para as técnicas de reprodução assistida.

CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS

Além de estarem em grande quantidade nos ovários, os folículos pré-antrais apresentam baixo metabolismo, não possuem zona pelúcida nem grânulos da cortical (Akar e Oktay, 2005) e apresentam uma pequena quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos, características que os tornam menos sensíveis ao frio. Além do mais, os ovócitos imaturos presentes nos folículos pré-antrais estão na fase de prófase e teoricamente têm um baixo risco de apresentar erros citogenéticos. Ademais, os folículos pré-antrais tem tempo para reparar os danos sub letais das organelas e de outras estruturas durante sua fase de crescimento (Oktay *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2000).

De fato, a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais tem sido muito estudada nos últimos anos para diversas espécies animais (para revisão vide Santos *et al.*, 2010). Para a criopreservação dos gametas femininos em folículos ovarianos pré-antrais pode-se utilizar o ovário inteiro, pequenos fragmentos do córtex ovariano ou usar apenas os folículos isolados, cada um com suas diferenças em relação ao processamento do material, mas com o mesmo objetivo: ajudar na conservação de espécies selvagens ameaçadas ou em risco de extinção, usando animais domésticos como modelos animais para o estudo dessas espécies, para um banco de gamoplasma de raças domésticas em risco de extinção e animais que apresentem um alto interesse econômico ou social, como os de criadores e animais de trabalho.

A TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação consiste na preservação de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou em sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os únicos estados físicos existentes abaixo de aproximadamente $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ são o cristalino e o vítreo e, em ambos, a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo do tempo de armazenamento), a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrem muito lentamente ou são paralisadas completamente (Kantha, 1985). Portanto, à temperatura do nitrogênio líquido, a viabilidade do material biológico durante o armazenamento pode ser estendida por longos períodos de tempo, com manutenção da estabilidade do material genético. A capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende de sua tolerância aos agentes crioprotetores, desidratação, resfriamento e re-aquecimento ou descongelamento (Santos, 2007).

O objetivo da criopreservação é garantir que as células cessem o metabolismo durante o período de estocagem, do qual possam ser resgatadas a fim de continuar o seu desenvolvimento normal. Entretanto, para que isso seja possível mesmo após longos períodos de conservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como a escolha do tipo e da concentração de crioprotetores, taxa de redução da temperatura de congelamento, manutenção da temperatura de estocagem, escolha do procedimento de descongelamento e técnicas utilizadas para assegurar a remoção do crioprotetor (Gordon, 2003).

Para que a criopreservação possa ter sucesso, é essencial o uso de agentes crioprotetores. Estas substâncias, quando adicionadas à solução de congelamento, protegem as células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. Em geral, agentes crioprotetores podem ser de dois tipos: intracelulares ou extracelulares.

Os crioprotetores intracelulares ou permeáveis são pequenas moléculas que penetram pelas membranas celulares e formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água intracelular, diminuindo a temperatura de congelamento da mistura e prevenindo a formação de cristais de gelo (Pereira e Marques, 2008). Dentre os agentes crioprotetores intracelulares pode-se citar o propilenoglicol (1,2-propanodiol; PROH), o etilenoglicol (EG), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol.

Os crioprotetores extracelulares não conseguem atravessar a membrana celular e permanecem no espaço extracelular, drenando a água livre de dentro da célula, causando a desidratação do espaço intracelular. Eles são usados, em geral, em combinação com um crioprotetor permeável, para aumentar a concentração total de crioprotetor dentro da

célula, e também prevenir a formação de cristais de gelo (Pereira e Marques, 2008). Os protocolos de congelamento e descongelamento geralmente utilizam uma alta concentração de crioprotetor extracelular durante a fase de descongelamento para auxiliar na saída do crioprotetor intracelular (Jain e Paulson, 2006). O crioprotetor extracelular mais comum é a sacarose, mas outros dissacarídeos, como a galactose e a trealose e outros agentes não permeáveis como as macromoléculas também podem ser usados (Eroglu *et al.*, 2003).

Atualmente, existem dois métodos para a criopreservação de gametas: o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetor, que são associados com toxicidade química e choque osmótico diminuídos, mas a habilidade de prevenir a formação de cristais de gelo a baixas concentrações é limitada. Com as técnicas de vitrificação, altas concentrações de crioprotetor inibem a formação de cristais de gelo e levam à formação de um estado semelhante ao do vidro, também chamado de estado vitrificado, no qual a água se solidifica, mas não se expande. Entretanto, a toxicidade do crioprotetor nessas concentrações é elevada e, conseqüentemente, a célula pode ficar exposta à solução crioprotetora apenas por um período de tempo muito curto. Além disso, um mínimo de volume da solução é necessário para que se atinja o estado vítreo (Arav *et al.*, 2002).

CONGELAMENTO LENTO

O congelamento lento é caracterizado pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de agente crioprotetor ($\cong 1,5$ mol/L) (Paynter, 2000), por um período que pode variar de 5 (Castro *et al.*, 2011) a 60 minutos (Candy *et al.*, 1997). Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de 2 °C/min até -4 a -9 °C, mantendo-se nesta temperatura por um curto período (10 a 15 min) para a estabilização térmica e

realização do *seeding*, o qual previne o super-resfriamento, o reaquecimento pelo calor latente, a formação desordenada de cristais de gelo e a extrema desidratação celular (Jondet *et al.*, 1984). Em seguida, a amostra continua sendo resfriada lentamente a uma velocidade de 0,3 °C/min. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80 °C), o material é estocado em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196 °C (Santos, 2007).

O método de congelamento lento depende de uma baixa concentração inicial de crioprotetor, que está associado com menor toxicidade enquanto as células se encontram na temperatura em que o metabolismo está ativo. O metabolismo celular é diminuído em cerca de 50% para cada redução de 10 °C na temperatura. A toxicidade é limitada porque as concentrações de crioprotetores e outros solutos aumentam somente após a célula ser mantida a temperaturas em que o metabolismo é muito lento (Jain e Paulson, 2006).

A uma temperatura de -6 °C, os cristais de gelo podem ser induzidos na solução através da introdução de um *seed*, um pequeno cristal de gelo que permite que outras moléculas de água se submetam à cristalização. O *seeding* geralmente é realizado ao tocar a parte externa do criotubo com um instrumento pré-resfriado, como uma pinça, que então induz a formação de um pequeno cristal de gelo na área em que o criotubo é tocado. A consequente formação de gelo libera uma energia conhecida como o calor latente de fusão. Portanto, as soluções são mantidas nesta temperatura durante algum tempo, em torno de 10 a 30 minutos para permitir o equilíbrio. Os cristais de gelo em crescimento excluem os solutos, aumentando, assim, sua concentração na solução restante. Deste modo o *seeding* é realizado em uma área distante do tecido, para que os cristais de gelo cresçam em direção a ele. Depois, a temperatura é reduzida gradualmente para uma temperatura final de -30 °C.

Durante este tempo, o cristal de gelo se propaga no meio extracelular de uma forma contínua, aumentando ainda mais a concentração de crioprotetores, particularmente no espaço intracelular, que já está desidratado pela utilização de crioprotetores não permeáveis. O ritmo muito lento de resfriamento (-0,3 °C por minuto) permite a difusão gradual de crioprotetor permeável para dentro das células, mantendo o equilíbrio com o espaço extracelular. A uma temperatura final de -30 °C, o crioprotetor ainda está bem acima de sua temperatura de congelamento (-40 °C a -59 °C), mas a sua concentração no meio líquido terá aumentado consideravelmente. A taxa metabólica das células já se encontra bastante lenta nessa temperatura, limitando ainda mais a toxicidade pelo aumento das concentrações de crioprotetores. O criotubo agora é mergulhado em nitrogênio líquido, e o restante da solução que não se solidificou é convertido para um estado sólido vitrificado (Jain e Paulson, 2006).

Embora a colocação de uma solução crioprotetora em células ou tecidos possa evitar a formação de gelo intracelular por meio da desidratação, ela também pode levar a um dano mecânico da célula e um estresse osmótico devido à alta concentração de solutos presentes nas porções de água que ainda não se congelaram (Mazur e Schneider, 1986). Consequentemente, a concentração do crioprotetor e o tempo de exposição do material ao crioprotetor antes do congelamento propriamente dito precisam ser balanceados para atingir uma desidratação suficiente e uma penetração eficiente do crioprotetor e ao mesmo tempo, reduzir os danos citotóxicos (Amorim *et al.*, 2006). Vários estudos já demonstraram que o tipo e a concentração do crioprotetor podem ser espécie-específicos (Candy *et al.*, 1997; Demirci *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2003a; Amorim *et al.*, 2003b; Lucci *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004b; Rodrigues *et al.*, 2004a; Santos *et al.*, 2006a; Borges *et al.*, 2009) e que a sobrevivência folicular também pode ser influenciada pela taxa de congelamento

(Demirci *et al.*, 2001; Neto *et al.*, 2008). Portanto, é essencial o estudo desses diversos parâmetros e suas influências antes da elaboração de um protocolo de criopreservação para determinada espécie (Santos *et al.*, 2010).

Durante o descongelamento, uma transição rápida da temperatura é recomendada para evitar a recristalização da água e a ocorrência de danos causados por cristais de gelo. Neste momento deve-se evitar o choque osmótico pelo crioprotetor intracelular, que agora está em uma concentração muito elevada no espaço intracelular. Portanto, um crioprotetor extracelular adicional é utilizado. À medida que o crioprotetor intracelular gradualmente se difunde para fora do citoplasma, a concentração do crioprotetor extracelular é diminuída proporcionalmente, até que o material é devolvido ao meio de cultura padrão (Jain e Paulson, 2006). Recentemente, Oskam *et al.*, (2010) demonstraram a importância da temperatura de descongelamento em fragmentos congelados de ovário ovino, enquanto Perdrix *et al.*, (2010) destacaram a preservação da morfologia normal do tecido ovariano humano após o descongelamento, aplicando diluições progressivas de crioprotetores.

Resultados promissores vêm sendo obtidos após a criopreservação de tecido ovariano de animais domésticos e selvagens usando protocolos de congelamento lento. De fato, a sobrevivência de folículos com a morfologia normal após o descongelamento; o crescimento folicular após o cultivo *in vitro*; a retomada da função endócrina e reprodutiva e a formação de folículos antrais após o xenotransplante e outros achados já foram descritos em várias espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Avanços no congelamento lento de folículos pré-antrais em animais domésticos e silvestres.

Fonte e Espécies	Análise pós-descongelamento	Principais resultados
Folículos isolados		
Gata ¹ ovelha ^{2,3,4} cabra ^{5,6}	Cultura <i>in vitro</i> (7d ¹ , 5d ^{2,3,4,6} , 24h ⁵)	Sobrevivência folicular ^{1,2,3,4,5,6}
Córtex ovariano		
Ovelha ^{4,7,24,26,28,29,30,31} coelha ^{8,9,27} gata ^{10,11} cabra ^{5,12,13,14,19,25,} vaca ^{15,16,17,20} porca ¹⁶ , macaca ^{18,21,22,36} égua ²³ , wombats ^{32,33,34} elefante ³⁵ sagui ³⁶	Análise histológica ^{7, 8,11,12,31} Análise Ultraestrutural ^{8,10,13,14,15,16,17,31} Análise de viabilidade (corante vital) ^{7,17,18} Cultura <i>in vitro</i> – 24 h ¹⁹ , 48h ²⁰ , 5d ^{4,5,18} Estudo das propriedades das membranas de transporte ^{21,22,23} Estudo da perfusão do crioprotetor ^{24,25} Isolamento de CCOs e MIV ²⁶ Autotransplante ¹² Autotransplante e MIV/FIV–ICSI/CE ²⁷ Autotransplante e acasalamento natural ^{9,28,29,30} Xenotransplante ^{11,32,33,34,35,36}	Morfologia normal ^{7,8,10,11,12} , degeneração folicular ³¹ Ultraestrutura normal ^{7,8,10,13,14,15,16,17,} Ultraestrutura danificada ³¹ Sobrevivência folicular ^{7,17,18} Sobrevivência e crescimento folicular ^{5,10,18,19,20} Propriedades afetadas pela espécie, solução e taxa de congelamento ²¹ Transporte de água afetado pelas condições de congelamento supra zero ^{22,23} Quantificação da quantidade de crioprotetor no tecido ovariano ²⁵ Ovócitos maduros ²⁶ Desenvolvimento folicular completo e retomada da função ovariana ¹² Desenvolvimento de blastocisto ²⁷ Retomada da função ovariana ²⁸ , prenhez ²⁹ e nascimento ^{9,30} Sobrevivência folicular ³² ; desenvolvimento de folículo antral ^{11,33,34,35,36} e recuperação da função endócrina ^{32,34}
Hemi-ovário		
Ovelha ^{37,38}	Autotransplante e acasalamento natural ^{37,38}	Nascimento ^{37,38}
Ovário inteiro		
Porca ³⁹ coelha ⁴⁰ ovelha ^{41,42,43,44} wallabies ⁴⁵	Análise Ultraestrutural ³⁹ Autotransplante vascular ^{40,41,42,43,44} e acasalamento ^{41,42,44} Xenotransplante ⁴⁵	Ultraestrutura normal ³⁹ Recuperação da função ovariana ^{40,41} , sobrevivência folicular ^{40,41} , maturação oocitária ^{42,43} , desenvolvimento embrionário ⁴² , retomada função ovariana(6 anos) ⁴⁴ e nascimento ⁴⁴ Desenvolvimento de folículo antral e recuperação de função endócrina ⁴⁵

¹Jewgenow *et al.*, 1998; ²Amorim *et al.*, 2003a ³Amorim *et al.*, 2003b; ⁴Santos *et al.*, 2007b; ⁵Rodrigues *et al.*, 2005; ⁶Rodrigues *et al.*, 2006; ⁷Santos *et al.*, 2006a; ⁸Deng *et al.*, 2007; ⁹Almodin *et al.*, 2004b; ¹⁰Lima *et al.*, 2006; ¹¹Bosch *et al.*, 2004; ¹²Santos *et al.*, 2009; ¹³Rodrigues *et al.*, 2004a; ¹⁴Rodrigues *et al.*, 2004a; ¹⁵Lucci *et al.*, 2004; ¹⁶Gandolfi *et al.*, 2006; ¹⁷Celestino *et al.*, 2008; ¹⁸Yeoman *et al.*, 2005; ¹⁹Santos *et al.*, 2006b; ²⁰Paynter *et al.*, 1999; ²¹Kardak *et al.*, 2007; ²²Li *et al.*, 2006; ²³Devireddy *et al.*, 2006; ²⁴Pinto *et al.*, 2008; ²⁵Luz *et al.*, 2009; ²⁶Al-aghbari e Menino, 2002; ²⁷Chao *et al.*, 2008; ²⁸Baird *et al.*, 2004; ²⁹Almodin *et al.*, 2004a; ³⁰Gosden *et al.*, 1994; ³¹Oskam *et al.*, 2010 ³²Wolvekamp *et al.*, 2001; ³³Cleary *et al.*, 2003; ³⁴Cleary *et al.*, 2004; ³⁵Gunasena *et al.*, 1998; ³⁶Candy *et al.*, 1995; ³⁷Salle *et al.*, 2003; ³⁸Salle *et al.*, 2002; ³⁹Imhof *et al.*, 2004; ⁴⁰Chen *et al.*, 2006; ⁴¹Bedaiwy *et al.*, 2003; ⁴²Arav *et al.*, 2010; ⁴³Arav *et al.*, 2005; ⁴⁴Imhof *et al.*, 2006; ⁴⁵Mattiske *et al.*, 2002.

CCOs: Complexo cumulus-ovócito; MIV:maturação in vitro; FIV:fertilização in vitro; ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozóide; CE: Cultivo embrionário; d: dias; h: horas. Fonte: Santos *et al.*, 2010(adaptado).

De uma forma geral, equipamentos programáveis sofisticados e caros são necessários para um procedimento de congelamento. Entretanto, o uso de dispositivos de congelamento controlado não está sempre disponível quando espécies ameaçadas são encontradas mortas no campo, o transporte dos ovários desses animais para um laboratório especializado pode resultar em uma degeneração celular devido à hipóxia causada pela demora entre a morte do animal e a criopreservação de tecido ovariano. Portanto, alternativas para a criopreservação em condições de campo vem sendo estudadas e disponibilizadas (Santos *et al.*, 2010).

VITRIFICAÇÃO

A vitrificação foi idealizada por Luyet em 1937. Depois de quase 50 anos, a vitrificação foi descrita como uma alternativa ao processo de congelamento lento (Rall e Fahy, 1985). A vitrificação é um processo termodinâmico no qual a viscosidade de um fluido é aumentada em várias ordens de magnitude, dando ao fluido as propriedades mecânicas de um sólido (Bautista e Kanagawa, 1998).

Quando uma solução aquosa é vitrificada pelo resfriamento ultra-rápido, cristais de gelo podem se formar. A probabilidade de formação de cristais de gelo é afetada por vários parâmetros termodinâmicos, incluindo volume da amostra e viscosidade da solução. Esta probabilidade é inversamente proporcional à viscosidade e diretamente proporcional ao volume. Nos protocolos comuns de criopreservação por vitrificação, a probabilidade de formação de cristais de gelo é diminuída por um aumento da viscosidade através da exposição do material biológico a altas concentrações do agente crioprotetor (geralmente entre 4 e 6 mol/L) por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), geralmente à

temperatura ambiente, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo (Santos *et al.*, 2008).

De acordo com Stachecki e Cohen (2004), a vitrificação possui dois aspectos básicos a serem levados em consideração. O primeiro consiste no fato de que as altas concentrações de agentes crioprotetores utilizadas aumentam os efeitos tóxicos e, em segundo lugar, apesar desse efeito durante o período de equilíbrio, a vitrificação, por ser um método de criopreservação ultra-rápido, aumenta as taxas de sobrevivência porque a passagem pela temperatura crítica, próxima de 0 °C é muito rápida. Para o ovário inteiro a vitrificação pode ser uma alternativa desejável, dada a complexidade dos tecidos e sistema vascular (Lornage e Salle, 2007).

Além da concentração de crioprotetores, o aumento da taxa de resfriamento também pode ser alcançado escolhendo cuidadosamente um processo de vitrificação adequado. Neste sentido, a forma como o material biológico é acondicionado para ser vitrificado possui importância para o sucesso da vitrificação. Para a vitrificação de tecido ovariano, duas das formas de acondicionamento que são utilizadas são canudos de plástico (Nagano *et al.*, 2007) e criotubos (Kagabu e Umezu, 2000; Bordes *et al.*, 2005). Entretanto, é importante lembrar que essas duas técnicas são compostas por materiais não condutivos (plástico), o que provavelmente influencia negativamente na taxa de resfriamento. Por isso, alguns estudos foram realizados para desenvolver sistemas que reduzissem o volume da solução de vitrificação o máximo possível e, conseqüentemente, aumentassem a taxa de resfriamento. Alguns exemplos desses sistemas são: vitrificação em superfície sólida (Santos *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2008) e o método da gotícula de tamanho reduzido (Yeoman *et al.*,

2005; Wang *et al.*, 2008). É importante ressaltar que alguns desses protocolos envolvem o contato direto do tecido ovariano com o nitrogênio líquido, e se o tecido estiver contaminado com algum agente patogênico, ele pode ser preservado no nitrogênio e manter-se contaminante após seu descongelamento (Santos *et al.*, 2010).

Embora a vitrificação de tecido ovariano não seja considerada um procedimento de rotina na medicina reprodutiva, alguns avanços importantes tem sido alcançados para folículos ovarianos pré-antrais em animais domésticos e selvagens (Tabela 3).

Tabela 3. Avanços na vitrificação de folículos pré-antrais em animais domésticos e silvestres.

Fonte e espécies	Tratamento e análise após o aquecimento	Principais resultados
Folículos Isolados		
Cabra ¹ dasiurídeos(marsupiais) ²	Cultivo in vitro ^{1,2} e viabilidade por coloração ^{1,2}	Sobrevivência folicular ^{1,2}
Córtex ovariano		
Porca ³ vaca ^{3,4} cabra ⁵ , macaca ⁶ ovelha ⁷ cadela ⁸	Análise histológica ^{3,5,8} e ultraestrutural ³ ; Viabilidade por coloração ^{4,6,7} e cultivo in vitro ^{5,6} ; Isolamento de folículos e cultivo in vitro-10d ⁷ Xenotransplante ⁸	Morfologia normal ^{3,4,5} e dano ultraestrutural ³ Sobrevivência folicular ^{4,5,6,7} ; Degeneração folicular ⁷ Sobrevivência folicular ⁸
Hemi-ovário		
Ovelha ⁹	Autotransplante e acasalamento ⁹	Nascimento ⁹
Ovário inteiro		
Ovelha ^{10,11}	Viabilidade por coloração ¹⁰ Análise histológica ^{10,11} Análise de progesterona ¹¹ Autotransplante vascular ¹¹	Viabilidade folicular ¹⁰ Fratura no vaso ovariano ¹⁰ Recuperação da função ovariana ¹¹ Perda total folicular ¹¹

¹Santos *et al.*, 2008; ²Czarny *et al.*, 2009; ³Gandolfi *et al.*, 2006; ⁴Kagawa *et al.*, 2009; ⁵Santos *et al.*, 2007a; ⁶Yeoman *et al.*, 2005; ⁷Al-aghbari e Menino, 2002; ⁸Ishijima *et al.*, 2006; ⁹Bordes *et al.*, 2005; ¹⁰Courbiere *et al.*, 2005; ¹¹Courbiere *et al.*, 2009.

d: dias. Fonte: (Santos *et al.*, 2010)(adaptado)

O congelamento lento e a vitrificação apresentam vantagens e desvantagens e a escolha da técnica muitas vezes pode ser influenciada por algumas dessas características. Por exemplo, o congelamento lento é um processo demorado e exige uma máquina de resfriamento especial, que possui um custo alto para aquisição. Já a vitrificação não

necessita de nenhum equipamento para o controle da temperatura e é um processo rápido e prático. Outras diferenças relacionadas aos dois procedimentos podem ser vistas na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre congelamento lento e a vitrificação em relação às injúrias causadas pelo método de criopreservação

Injúrias	Congelamento Lento	Vitrificação
Formação de cristais de gelo	+++	-
Injúrias osmóticas	+	+++
Injúrias tóxicas	+	+++
Danos de rompimento	++	++
Injúrias ao resfriamento	+++	+

+++ = risco alto; ++ = médio risco; + = risco baixo; - = não apresenta. Fonte: Siqueira Filho, 2009

Por serem procedimentos tão diferentes e apresentarem resultados variados quando usados em tipos celulares ou espécies diferentes, a comparação entre o congelamento lento e a vitrificação já tem sido estudada em algumas espécies como murinos (Aerts *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011), macacos rhesus (Ting *et al.*, 2011) e humanos (Martinez-Burgos *et al.*, 2011).

ESTUDOS DE CRIOPRESERVAÇÃO EM CANÍDEOS

Apesar da criopreservação de tecido ovariano ser largamente explorada em algumas espécies, como ovelhas (Gosden *et al.*, 1994), humanos (Newton *et al.*, 1996), vacas (Lucci *et al.*, 2004) e cabras (Rodrigues *et al.*, 2004a), os relatos de criopreservação de tecido ovariano em cadelas são poucos. Apenas Ishijima *et al.*, (2006) tem um estudo publicado. Neste trabalho, fragmentos de ovários de cadelas foram submetidos à vitrificação direta em nitrogênio líquido, após os tratamentos com crioprotetores, e depois transplantados. Como resultados, os autores relatam que todas as amostras analisadas apresentaram morfologia normal e compatível com o tecido fresco, que o transplante foi viável e que existe um

potencial para esta técnica, pois foi observada uma proliferação de células da granulosa em folículos primários transplantados. Os tecidos foram analisados por microscopia de luz.

Os estudos de criopreservação na espécie canina são reduzidos, sendo que dois são relacionados com a preservação por resfriamento (Lopes *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010). O resfriamento é uma técnica que possui o seu potencial limitado porque o tempo em que o material pode ficar estocado é muito pequeno comparado com a criopreservação. O estudo de Boutelle *et al.*, (2011) é um estudo promissor sobre vitrificação de ovócitos de canídeos selvagens. Apesar do trabalho de Ishijima *et al.*, (2006) ter relatado o efeito da vitrificação de ovários de cadelas sobre folículos pré-antrais, é importante ressaltar que ainda não há estudos sobre o congelamento lento clássico de ovários de cadelas. Além disso, a comparação da técnica de criopreservação de folículos por meio do congelamento lento e da vitrificação, embora já tenha sido reportada em murinos (Aerts *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011), macacos rhesus (Ting *et al.*, 2011) e humanos (Martinez-Burgos *et al.*, 2011) ainda não foi realizada em cadelas.

JUSTIFICATIVA

O presente trabalho pretende elucidar características importantes da reprodução de cadelas, como a população, morfometria e ultraestrutura dos folículos ovarianos pré-antrais, e comparar dois métodos de criopreservação dos mesmos em tecido ovariano. Como já mencionado, não existem muitos relatos a este respeito na literatura para a espécie canina. Características básicas dos aspectos reprodutivos de cadelas precisam ser conhecidas e trabalhadas para que mais informações sobre os canídeos estejam disponíveis na literatura.

A criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas também tem sido muito pouco estudada até o momento, o que deixa grandes lacunas no estudo da conservação de gametas femininos nesta espécie. Vale ressaltar também que não existe uma comparação entre as técnicas de crioproteção (congelamento lento e vitrificação) de tecido ovariano de cadelas e que esse estudo fornecerá informações sobre qual metodologia trará melhores resultados para os gametas femininos desta espécie. O presente trabalho avaliará também as características ultraestruturais de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas, o que é inovador, uma vez que não foram publicados estudos nessa área e muito menos estudos comparativos entre as duas técnicas utilizadas e seus efeitos na ultraestrutura dos folículos pré-antrais de cadelas. As análises ultraestruturais são fundamentais, pois nos mostram danos causados nas células que não podem ser vistos em microscopia de luz convencional.

Visto que o cão doméstico pode ser um modelo de estudo para canídeos selvagens, este trabalho oferece ainda a vantagem de servir como modelo para as pesquisas em preservação de material genético de animais que se encontram ameaçados de extinção que também são da família *Canidae*, como o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o cachorro do

mato vinagre (*Speothos venaticus*) e o cachorro do mato de orelhas curtas (*Atelocynus microtis*) além de ser também útil para a formação de um banco de germoplasma para cães guia de cego e para criadores de raças caninas em geral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Estudar e caracterizar a população de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas e a possibilidade de preservação dos ovócitos inclusos nestes folículos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar e caracterizar morfometricamente a população de folículos ovarianos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) de cadelas.

- Caracterizar ultraestruturalmente os folículos ovarianos pré-antrais de cadelas.

- Testar dois protocolos de criopreservação (congelamento lento e vitrificação) sobre a morfologia e a ultraestrutura dos folículos pré-antrais de cadela inclusos em fragmentos de tecido ovariano.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho apresentou duas fases distintas, na primeira fase foi feito o estudo populacional, morfológico e morfométrico dos folículos ovarianos pré-antrais de cadelas, e na segunda fase foi realizada a criopreservação dos folículos ovarianos pré-antrais de cadelas, utilizando o congelamento lento e a vitrificação.

FASE I: ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE CADELAS

Foram utilizados ovários oriundos de 10 cadelas hípidas, não prenhas, com idade entre 6 meses e 8 anos, de variadas raças (SRD, Cocker Spaniel, Labrador, Pinscher) submetidas à ovariectomia eletiva no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

Para a estimativa da população de folículos pré-antrais, um dos ovários de cada cadela foi fixado inteiro em solução Carnoy (60% de álcool absoluto, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético) por 3 horas, depois foram destinados aos procedimentos de desidratação (álcool em soluções crescentes, 80%, 90% e 100%), diafanização (em xilol) e inclusão em parafina (Histosec, Merck). De cada ovário foram feitos cortes semi-seriados na espessura de 5µm e um a cada 120 cortes foram montados em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Todos os folículos que apresentaram núcleo do ovócito visível foram contados e classificados como primordiais, primários ou secundários conforme suas características morfológicas. Os folículos primordiais são compostos de um ovócito rodeado por uma única camada de células da pré-granulosa achatadas (Gougeon, 1996; Van Den Hurk *et al.*, 1997). Folículos primários são constituídos por um ovócito rodeado por uma

única camada de células da granulosa cuboide. Os folículos secundários possuem pelo menos duas camadas de células da granulosa e já podem apresentar desenvolvimento das células da teca (Van Den Hurk e Zhao, 2005). A fim de estimar corretamente a população folicular, utilizou-se um fator de correção descrito por Gougeon e Chainy (1987), a saber:

$$N1 = \frac{N_o \times S_t \times T_s}{S_o \times d_n}$$

Onde: N1 = número calculado total de folículos de uma determinada classe; No = número de folículos observados no ovário; St = número total de secções no ovário; Ts = espessura da secção (μm); So = número total de secções observadas; dn = diâmetro médio do núcleo do folículo da classe em questão: primordiais, primários ou secundários.

Para estabelecer a morfometria folicular, foram utilizados 190 folículos pré-antrais (100 primordiais, 50 primários e 40 secundários), selecionados aleatoriamente nas mesmas lâminas usadas para estimar a população folicular. Por meio do programa IMAGE PRO PLUS 5.1, Media Cybernetics foram extraídas as medidas do diâmetro do folículo, do ovócito e do núcleo do ovócito, e o número de células da granulosa foi contado. Todas as medidas foram obtidas do maior e menor diâmetro e a média calculada para cada folículo. Todos os dados foram obtidos na secção equatorial do folículo (Figura 1).

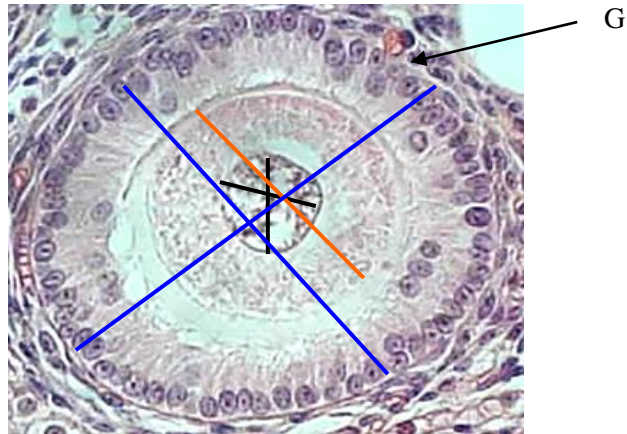


Figura 1. Demonstração das medidas do diâmetro do folículo (azul), ovócito (laranja) e núcleo do ovócito (preto). Todas as medidas foram obtidas do maior e menor diâmetro e a média calculada. O número de células da granulosa (G) foi contado na mesma secção.

Para caracterizar ultraestruturalmente os folículos, pequenos fragmentos do outro ovário de cada cadela foram fixados por 3 h em solução de Karnovsky modificada, (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio – 0,1M, pH 7,3), lavadas em tampão de cacodilato de Sódio 0,1 M, pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio 0,8% e 5 mM de CaCl_2 , contrastadas em acetato de uranila 0,5%, desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e infiltrados e incluídos em resina Spurr. Cortes semi-finos ($3\mu\text{m}$) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz para localização do ovócito. Os cortes ultrafinos (70nm) foram coletados em telinhas de cobre e após 24h foram observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (JEOL, Tóquio, Japão).

Análise estatística – As medidas de diâmetro folicular, ovocitário e nuclear, bem como o número de células da granulosa, foram comparadas entre as classes de folículos por Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

FASE II: CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIIS EM TECIDO

OVARIANO DE CADELAS

Procedência, coleta e transporte do tecido ovariano – Foram utilizados 10 ovários oriundos de 5 cadelas adultas, híginas com idade entre 6 meses e 7 anos. Os ovários foram coletados em procedimentos de ovariectomia eletiva, no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e em clínicas particulares do Distrito Federal, lavados e transportados em solução salina até o laboratório à temperatura de aproximadamente 36 °C.

Soluções crioprotetoras – A solução crioprotetora para o congelamento lento foi preparada em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino, adicionado de DMSO a 1,5 M e 0,4% de sacarose. Para a vitrificação foram utilizadas duas soluções: SV1, composta por DMSO 1 M em MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, e SV2, composta por DMSO 2 M + 1M de Acetamida + Propanodiol 3 M em MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino.

Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais *in situ* – No laboratório, de cada ovário foram retirados fragmentos de córtex ovariano medindo 1 mm x 1 mm x 5 mm que foram destinados aleatoriamente à fixação (controle), procedimento de congelamento lento ou vitrificação. A representação esquemática pode ser vista na Figura 2.

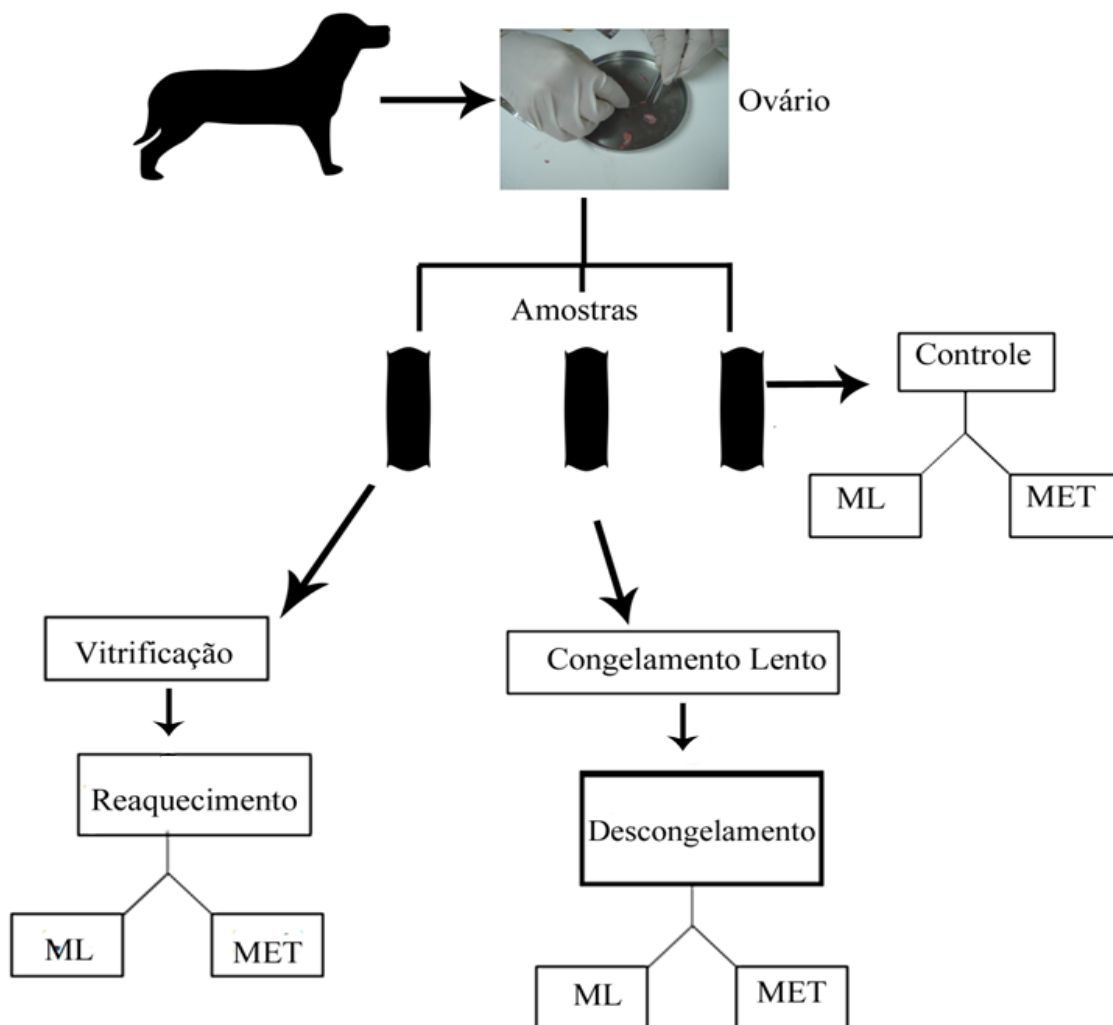


Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental seguido. ML: microscopia de luz, MET: microscopia eletrônica de transmissão.

Congelamento lento – Os fragmentos de córtex foram equilibrados em criotubos contendo 1 mL da solução crioprotetora a 10 °C por um período de 20 min. Ao término dos 20 min, os criotubos foram colocados em um congelador programável previamente resfriado a 10 °C e então resfriados a uma velocidade de 1 °C/min até -7 °C. O tecido ovariano foi mantido nesta temperatura durante a indução da formação de cristais de gelo (*seeding*). O *seeding* foi realizado manualmente, utilizando-se uma pinça pré-resfriada em nitrogênio líquido. Em seguida, a temperatura foi reduzida a 0,3 °C/min até atingir -30 °C, quando então os criotubos foram removidos do congelador e mergulhados em nitrogênio líquido (-196 °C), no qual foram estocados por um período mínimo de uma semana. Para o descongelamento,

os criotubos foram expostos à temperatura ambiente por 10 segundos, e então imersos em banho-maria a 38 °C por um período suficiente para ocorrer o seu descongelamento total. Para a remoção do crioprotetor, cada fragmento ovariano foi submetido, separadamente, a três lavagens sucessivas em MEM contendo concentrações decrescentes de sacarose (0,4%, 0,2% e sem sacarose), realizadas a intervalos de 5 min. Em seguida, os fragmentos ovarianos foram destinados à análise histológica e microscopia eletrônica de transmissão, conforme explicado adiante.

Vitrificação – O método utilizado para a vitrificação foi uma adaptação do método proposto por Ishijima *et al.*, (2006). Inicialmente os fragmentos foram mantidos na SV1 por 5 min e depois na SV2, por mais 5 min, sempre a 0 °C. O processo de vitrificação foi realizado em superfície sólida, onde o tecido ovariano é congelado através de contato direto com uma superfície sólida feita de material inoxidável, resfriada a uma faixa de temperatura aproximada -150 a -180 °C. Em seguida, as amostras de córtex foram acondicionadas em criotubos previamente resfriados em nitrogênio líquido, os quais foram então mergulhados em nitrogênio líquido e mantidos armazenados por no mínimo uma semana. Para o reaquecimento, os fragmentos ovarianos foram expostos à temperatura ambiente por 10 segundos e então imersos em banho-maria a 37 °C ao mesmo tempo em que 1,5 ml de uma solução aquecida (37 °C) de sacarose a 0,4% em MEM acrescido de 20% de soro fetal bovino foi adicionada ao criotubo, e assim mantidos por um período de 5 min. Para a remoção da solução crioprotetora, os fragmentos foram transferidos para outra solução igual mas com 0,2% de sacarose e após o mesmo intervalo de tempo, para MEM acrescido de 20% de soro fetal bovino, sem sacarose por mais 5 min. Em seguida, os fragmentos ovarianos foram

destinados à análise histológica e microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito abaixo.

Análise histológica e ultraestrutural de folículos ovarianos pré-antrais

No grupo controle e ao final de cada tratamento, cada fragmento foi dividido em duas partes: uma pequena amostra ($\sim 1\text{mm}^3$) foi fixada e processada para microscopia eletrônica de transmissão e o restante fixado e processado para microscopia de luz.

Análise histológica – As amostras de tecido processadas para microscopia de luz foram fixadas em Carnoy por 3 h. Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados, diafanizados, embebidos em parafina e seccionados à espessura de $5\mu\text{m}$. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas ao microscópio de luz (Leica DM500, Wetzlar, Germany). Os folículos observados foram contados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordial, primário ou secundário) e considerados como morfológicamente normais ou degenerados. Os folículos foram considerados degenerados quando apresentaram uma ou mais das seguintes características: citoplasma do ovócito retraído, células da granulosa dispersas ou desorganizadas, presença de vesículas, presença de corpos picnóticos no núcleo do ovócito e da granulosa. Só foram considerados para classificação os folículos cujos ovócitos apresentaram núcleo visível.

Análise ultraestrutural – Para esta análise, as amostras de tecido ovariano foram fixadas por 3 h em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio – 0,1M, pH 7,3), lavadas em tampão de Cacodilato de Sódio 0,1 M, pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio 0,8% (1:1) e 5 mM de CaCl_2 , contrastadas em acetato de uranila 0,5%, desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltrados e incluídos em resina Spurr. Cortes

semi-finos (3 μ m) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz para localização e classificação dos folículos. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em telinhas de cobre e após 24 h foram observados no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011, JEOL, Tóquio, Japão). Somente folículos considerados morfológicamente normais nos cortes semi-finos foram analisados.

Análise estatística – As porcentagens de folículos morfológicamente normais foram comparadas entre os tratamentos e o grupo controle (fixado imediatamente após a coleta). Os dados foram transformados para arcsen $\sqrt{\%}$ e submetidos à Análise de Variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scheffè. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Tabela 6. Parâmetros morfométricos (média \pm DP) de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas.

Classe folicular	Diâmetro (μm)			Número células da granulosa no corte equatorial
	folicular	ovócito	núcleo ovócito	
Folículos primordiais	27,5 \pm 4,2 ^a	21,7 \pm 2,7 ^a	11,3 \pm 1,6 ^a	6,0 \pm 1,8 ^a
Folículos primários	42,6 \pm 12,5 ^b	27,8 \pm 7,5 ^b	13,7 \pm 2,6 ^b	15,0 \pm 7,0 ^a
Folículos secundários	101,6 \pm 62,9 ^c	48,0 \pm 12,6 ^c	18,7 \pm 4,2 ^c	61,5 \pm 63,5 ^b

^{a,b,c} Números com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Na análise ultraestrutural, folículos primordiais apresentaram um ovócito com citoplasma homogêneo e núcleo grande e arredondado. A cromatina encontrava-se descondensada e um nucléolo foi geralmente observado. As organelas estavam homogeneamente distribuídas pelo citoplasma (Figura 4A). As organelas mais abundantes foram mitocôndrias arredondadas e poucas mitocôndrias alongadas podiam eventualmente ser vistas. Cisternas de retículo endoplasmático rugoso foram observadas, na maioria dos casos em associação com mitocôndrias (Figura 4B), mas também foram observadas isoladas no citoplasma. Algumas cisternas de Golgi eram às vezes observadas. As membranas celulares dos ovócitos e das células da granulosa estavam próximas, com um contato íntimo mantido por meio de invaginações. As células da granulosa eram achatadas e pequenas, com uma grande relação núcleo/citoplasma e poucas organelas (Figura 4C).

A ultraestrutura de folículos primários foi muito semelhante à observada no estágio primordial (Figura 4D). Os ovócitos eram em geral esféricos, mas ovócitos alongados foram observados em alguns casos. O núcleo, que se apresentava grande e excêntrico, tinha cromatina descondensada e um nucléolo também podia ser observado. Mitocôndrias arredondadas eram ainda as mais abundantes. O retículo endoplasmático e as cisternas de Golgi também estavam presentes (Figura 4D). Neste estágio as células da granulosa eram

cuboides e tinham núcleos redondos e apresentavam uma quantidade maior de organelas, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático.

Folículos secundários apresentavam uma zona pelúcida em formação ao redor do ovócito na qual microvilosidades podiam ser observadas projetando-se (Figura 4E). O núcleo ainda era grande e redondo e apresentava um nucléolo visível. Folículos secundários mais avançados apresentavam zona pelúcida completamente formada onde projeções das células da granulosa podiam ser visualizadas, além das microvilosidades do ovócito (Figura 4F). Mitocôndrias arredondadas e alongadas podiam ser observadas (Figura 4E e 4F). Cisternas de retículo endoplasmático eram abundantes e a associação entre mitocôndrias e retículo endoplasmático era comum. As vesículas eram abundantes comparadas aos estágios anteriores. Em folículos secundários, as células da granulosa eram cuboides e apresentavam muitas organelas. (Figura 4E).

Todos os folículos estavam circunscritos por uma membrana basal, a qual delimitava o estroma ovariano.

RESULTADOS

FASE I: ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIIS DE CADELAS

Para a estimativa da população folicular, os folículos foram classificados como primordiais, primários e secundários (Figura 3). O número de folículos pré-antrais por ovário de cadela está apresentado na Tabela 5.

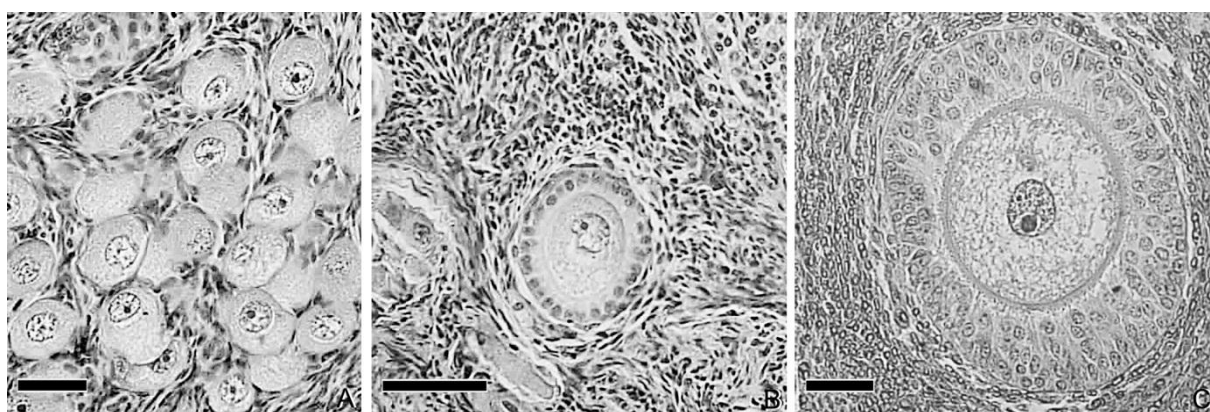


Figura 3. Fotomicrografias representativas de folículos primordiais (A), primários (B) e secundários (C) de cadelas. Barras= 20µm

Tabela 5. Número médio (\pm DP) e porcentagem de folículos pré-antrais de cada classe por ovário de cadela

Tipo	População
Folículos primordiais	45.145 \pm 16.076 (94,25%)
Folículos primários	2.358 \pm 1.253 (4,92%)
Folículos secundários	397 \pm 351 (0,83%)
Total	47.900 \pm 17.680

A média de diâmetro do folículo, ovócito e núcleo do ovócito, bem como do número de células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários de cadela estão na Tabela 6. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre as três classes para diâmetro do folículo, ovócito e núcleo do ovócito. No entanto, para o número de células da granulosa apenas folículos secundários apresentaram significativamente mais células ($P < 0,05$) do que folículos primários e primordiais (Tabela 6).

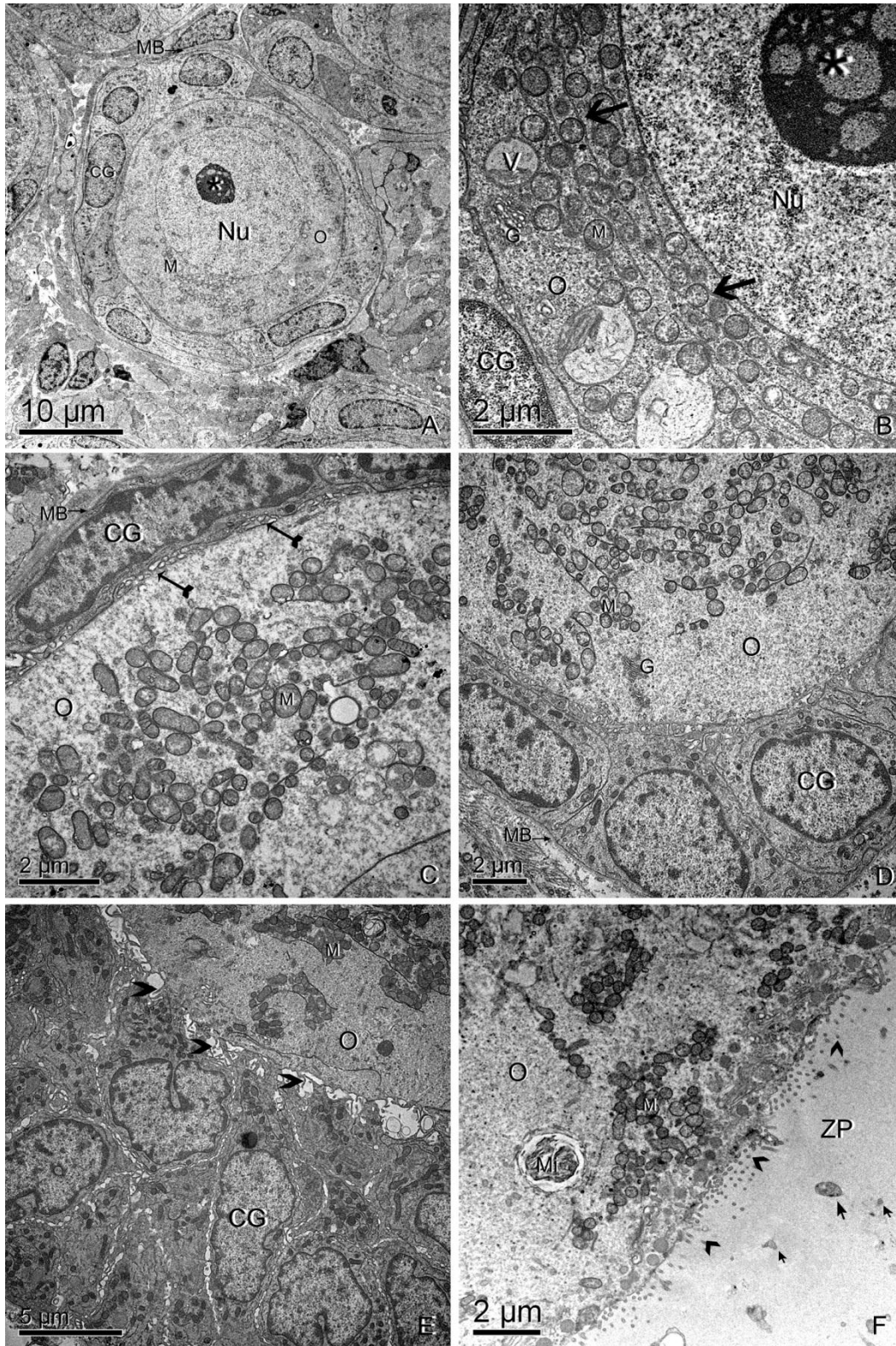


Figura 4. Fotomicrografias de folículos pré-antrais de cadela. (A) Visão geral de folículo primordial. (B) Detalhe do citoplasma do ovócito de folículo primordial onde se vê a associação das mitocôndrias com o retículo endoplasmático (setas). (C) Detalhe do contato entre ovócito e células da granulosa em folículos primordial. Observe as invaginações (flechas). (D) Folículo primário mostrando associação das mitocôndrias com o retículo endoplasmático como também visto em folículos primordiais. Observe a maior quantidade de organelas nas células da granulosa. (E) Folículo secundário com zona pelúcida em formação onde se projetam microvilosidades do ovócito (cabeça de seta). (F) Folículo secundário com zona pelúcida completamente formada onde se observam cortes parciais das projeções das células da granulosa (ponteyras). O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, ZP: zona pelúcida, M: mitocôndria, Mi: figura mielínica G: Golgi*, nucléolo MB: membrana basal, V: Vesícula.

FASE II: CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM TECIDO OVARIANO DE

CADELAS

Na microscopia de luz, foram avaliados 1747 folículos no total, sendo 831 no controle, 591 no congelamento lento e 325 na vitrificação. Após as avaliações dos folículos dos tratamentos e do controle, a porcentagem de folículos morfológicamente normais foi calculada (Tabela 7). A porcentagem de folículos morfológicamente normais, independente da classe folicular, foi significativamente inferior na vitrificação em relação ao controle e ao congelamento lento ($P < 0,05$), e não houve diferença significativa entre estes dois últimos grupos.

Tabela 7. Porcentagem (média \pm DP) de folículos pré-antrais morfológicamente normais em ovários frescos (controle), congelados ou vitrificados.

Classe	Controle	Congelamento Lento	Vitrificação
Primordiais	96,69 \pm 4,72 ^a	89,51 \pm 10,39 ^a	75,32 \pm 9,23 ^b
Primários	94,80 \pm 6,91 ^a	86,8 \pm 12,15 ^a	61,53 \pm 14,78 ^b
Secundários	87,62 \pm 17,12 ^a	76,35 \pm 26,34 ^a	52,25 \pm 22,13 ^b
TOTAL	93,66 \pm 6,81 ^a	86,16 \pm 11,05 ^a	68,14 \pm 12,75 ^b

^{a,b} Números com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

No congelamento lento, a morfologia da maioria dos folículos ao microscópio de luz era semelhante ao grupo controle, onde um ovócito com o núcleo bem definido e citoplasma homogêneo estava completamente circundado por células da granulosa (Figura 5 A-C). Na vitrificação, uma porcentagem maior de folículos degenerados pode ser observada ao microscópio de luz (Tabela 7), mas de um modo geral, tanto no congelamento lento quanto na vitrificação, as características de degeneração mais comumente observadas foram núcleo picnótico (Figura 5D) e desintegração total do ovócito (Figura 5E). No tecido ovariano vitrificado, uma característica interessante observada foi o descolamento do estroma ovariano de muitos folículos (Figura 5F), especialmente secundários. No entanto, na grande maioria das vezes, o folículo em si apresentava morfologia normal e foi classificado como tal.

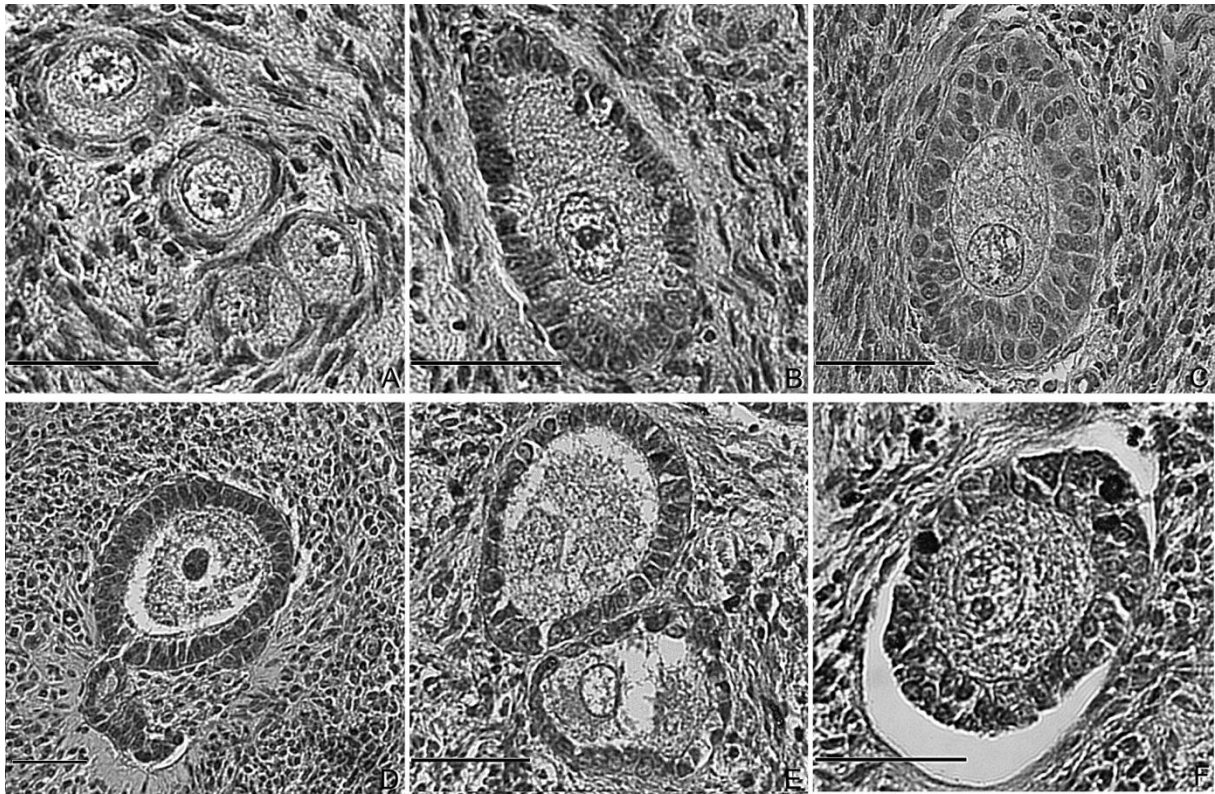


Figura 5. Folículos primordiais (A), Primário (B) e Secundário (C) morfologicamente normais do grupo congelamento lento. Folículo primário apresentando núcleo picnótico após congelamento lento (D). Folículos primários com ovócito totalmente desintegrados após vitrificação (E). Folículo secundário morfologicamente normal apresentando descolamento do estroma após vitrificação (F). Barras=20 μ m.

A análise ultraestrutural mostrou resultados divergentes da análise por microscopia de luz, evidenciando que folículos vitrificados mantiveram a estrutura subcelular mais próxima do grupo controle do que os folículos que passaram pelo congelamento lento. Nos folículos primordiais (Figura 6A) e primários (Figura 6B) que foram submetidos ao congelamento lento pudemos observar regiões com baixa densidade de organelas, presença de vesículas, descolamento das células da granulosa, perda de junções entre a célula da granulosa, desintegração do núcleo das células da granulosa. Presença de mitocôndrias inchadas (Figura 6C) e retração do ovócito. O núcleo do ovócito apresentava um contorno anguloso, com muitas endentações (Figura 6A, B e C) e eventualmente ruptura da membrana nuclear (Figura 6C). Nos folículos secundários além das alterações anteriores também foi notada a perda total da estrutura citoplasmática (Figura 6 D e E). Alguns folículos

secundários apresentaram aspecto retraído semelhante a uma desidratação do tecido (Figura 6F). É importante lembrar que apenas folículos considerados morfológicamente normais nos cortes semifinos foram avaliados ao MET.

Folículos primordiais (Figura 7 A e B) e primários (Figura 7 C e D) vitrificados apresentaram ultraestrutura semelhante a do controle (vide Figura 4), com justaposição entre o ovócito e as células da granulosa, mitocôndrias arredondas e íntegras e frequentemente em associação com retículo endoplasmático. Em um único folículo foi possível observar um discreto rompimento da membrana nuclear (não mostrado). No entanto, em ovócitos de folículos secundários vitrificados foi observada presença de vesículas pequenas e grandes, núcleo deformado (Figura 7E) e mitocôndrias inchadas e sem cristas (Figura 7F). Foi observada ainda extensa degeneração das células da granulosa (Figura 7E).

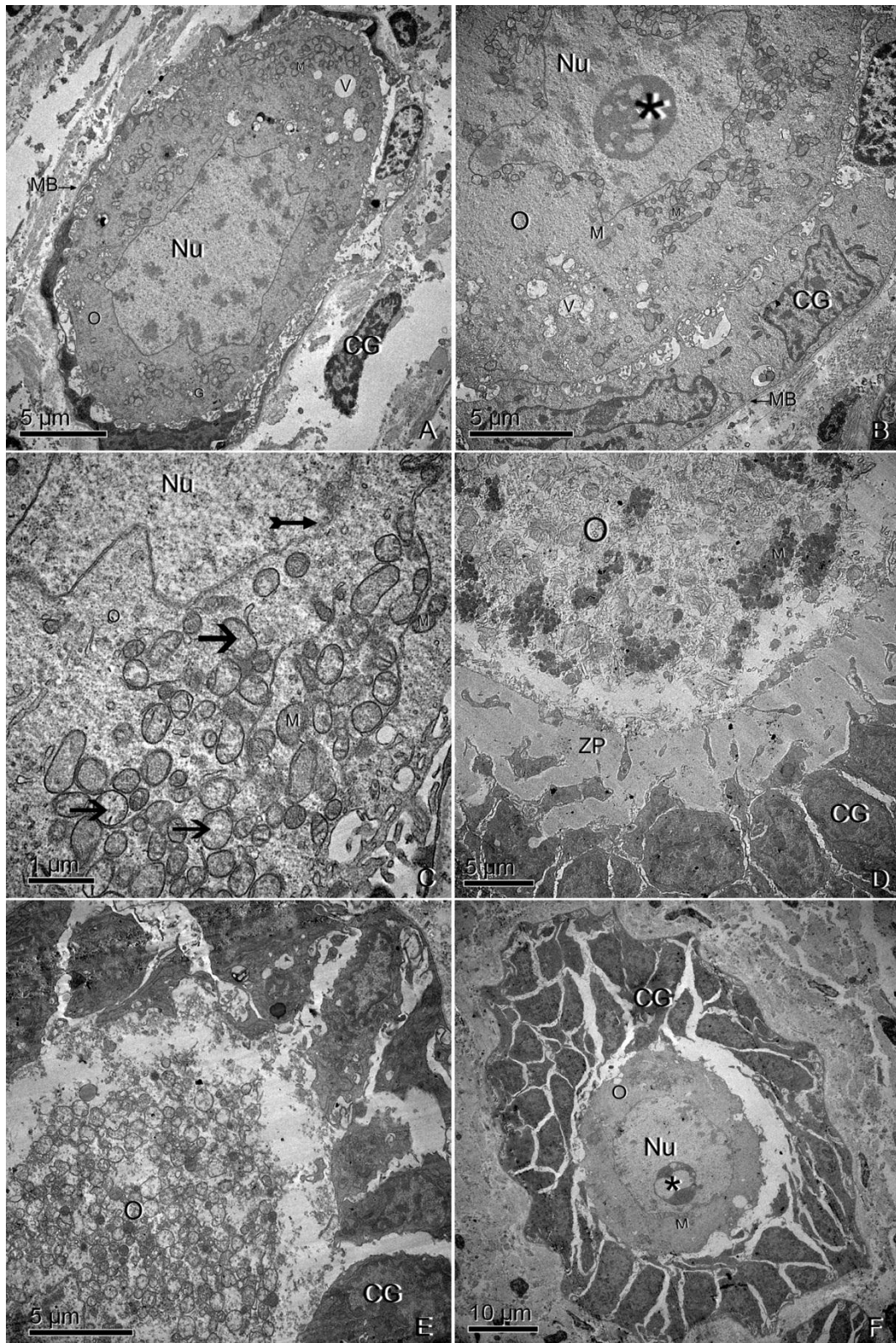


Figura 6. Fotomicrografias de folículos pré-antrais submetidos ao congelamento lento. (A) Visão geral de folículo primordial. (B) Visão geral de folículo primário. (C) Detalhe do citoplasma do ovócito de folículo primário. (D e E) Folículos secundários. Notar o descolamento das células da granulosa, presença de vesículas no citoplasma do ovócito (A e B), mitocôndrias inchadas (setas) (C), núcleo com contorno irregular (A-C), ruptura da membrana nuclear (flecha) (C) e perda total da estrutura citoplasmática (D e E). (F) Folículo secundário de aspecto retraído, mostrando perda de contato entre o ovócito e as células da granulosa e entre estas. O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, ZP: zona pelúcida, M: mitocôndria, *: nucléolo, MB: membrana basal, V: vesícula.

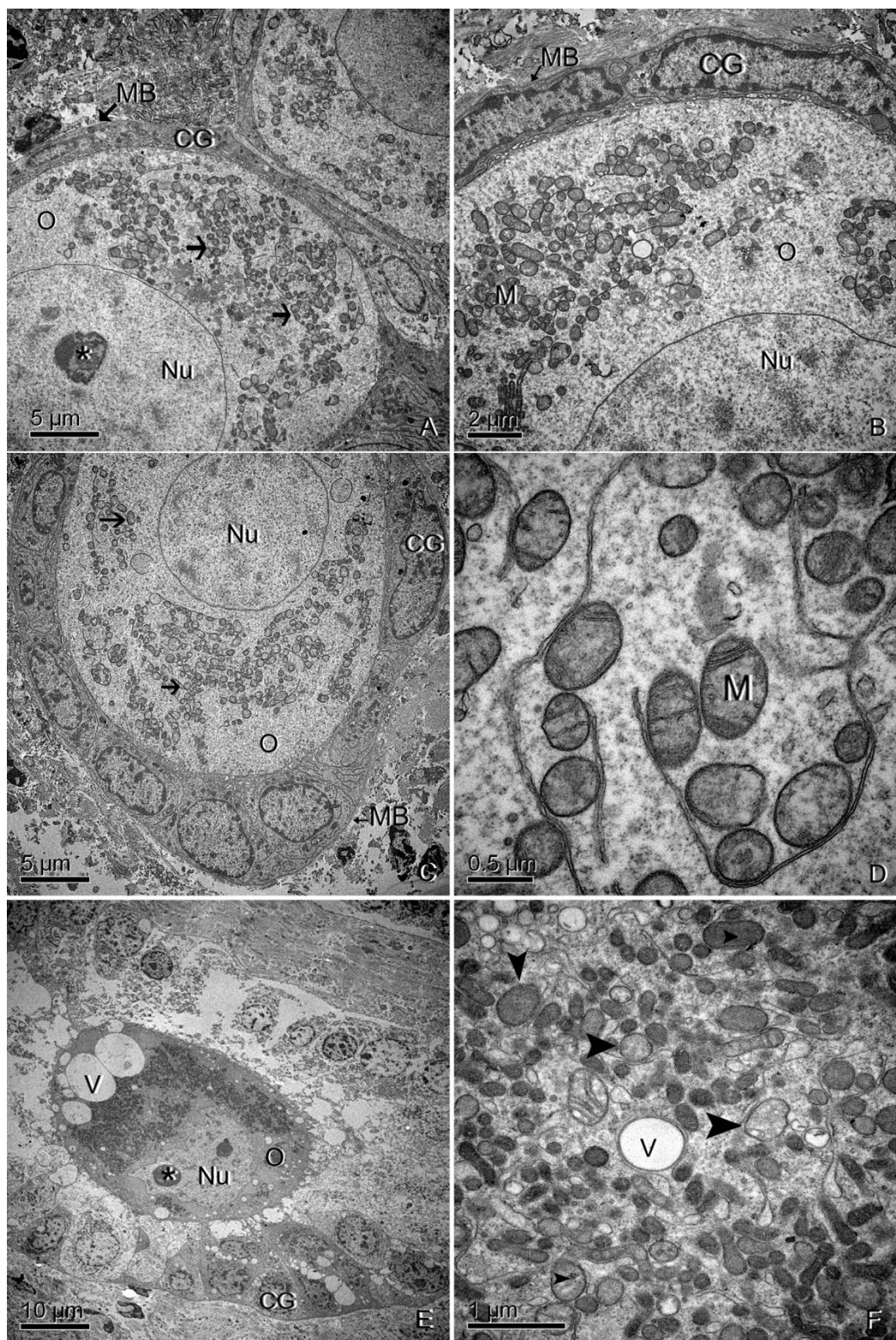


Figura 7. Fotomicrografias de folículos pré-antrais submetidos a vitrificação. (A) Visão geral de folículos primordiais. (B) Detalhe do citoplasma do ovócito de folículo primordial. (C) Visão geral de folículo primário. (D) Detalhe do citoplasma do ovócito de folículo primário. Notar a ultraestrutura bem preservada do ovócito, com núcleo de contorno regular, mitocôndrias arredondadas em associação com retículo endoplasmático (setas), homogeneamente distribuídos pelo citoplasma, semelhante ao observado em folículos do grupo controle. (E) Folículo secundário degenerado, mostrando extensa degeneração das células da granulosa e ovócito com grandes vesículas no citoplasma e núcleo deformado. (F) Detalhe do citoplasma ovócito de folículo secundário mostrando a maioria das mitocôndrias inchadas e sem cristas (cabeça de seta). O: ovócito, CG: célula da granulosa, Nu: núcleo, M: mitocôndria, *: nucléolo, MB: membrana basal, V: Vesícula.

DISCUSSÃO

A estimativa da população de folículos ovarianos pré-antrais já foi reportada em outras espécies como: bovinos 750.000 (Erickson *et al.*, 1976), bubalinos 19.819 (Mondadori *et al.*, 2010), ovinos 76.753 (Land, 1970), caprinos 37.646 (Lucci *et al.*, 1999), macaco-prego (*Cebus apella*) 108.216 (Domingues *et al.*, 2003) e no felino doméstico 37.853 (Carrijo Júnior *et al.*, 2010), mas essa estimativa de população em tecido ovariano oriundo de cadelas até o presente momento não foi reportada. Um estudo (Dolezel *et al.*, 2004) relata a contagem da população contida em uma área de 50 mm² de tecido ovariano de cadelas, e já demonstrou uma grande quantidade de folículos em uma pequena área (567). No entanto, este dado não pode ser extrapolado para o ovário inteiro. Observamos em nosso estudo que a média da população folicular de um ovário inteiro de cadelas é de aproximadamente 47.900 folículos pré-antrais. A quantidade média de folículos primordiais encontrados em nosso trabalho foi de aproximadamente 94,25% da população folicular total. Essa alta proporção de folículos primordiais também foi reportada em ovinos (Land, 1970), bovinos (Lucci *et al.*, 2002) e em gatas (Carrijo Júnior *et al.*, 2010). Embora outros estudos como em caprinos (Lucci *et al.*, 1999) não apresentem uma proporção tão alta para os folículos primordiais, eles continuam sendo os que estão em maior quantidade (67,8%). A grande diferença se mostra em bubalinos (Mondadori *et al.*, 2010) onde aproximadamente 17,5% da população total é de primordiais, e a grande maioria (74%) são folículos primários.

A morfometria de FOPA de cadela foi descrita em dois trabalhos anteriores (Durrant *et al.*, 1998; Diagone *et al.*, 2008). Nossos dados são semelhantes ao descrito por Durrant *et al.*, (1998) para folículos primordiais (~25µm de diâmetro). A comparação para folículos primários e secundários não foi possível visto que nesse estudo os folículos primários e

secundários foram agrupados em uma única classe (folículo pré-antral avançado). Por outro lado, nossos resultados foram bem diferentes dos descritos por Diagone *et al.*, (2008), que relataram medidas sempre maiores que as obtidas no presente estudo. Contudo, uma hipótese não pode ser formulada sobre o porque desta diferença. Diferenças na morfometria folicular dentro de uma mesma espécie entre trabalhos publicados existem para gatas domésticas (Reynaud *et al.*, 2009b; Carrijo Júnior *et al.*, 2010). Neste caso, os dados do presente estudo são semelhantes aos descritos por Carrijo Júnior *et al.* (2010), mas menores do que as apresentadas por Reynaud *et al.*, (2009b). Comparando ainda com outras espécies, as medidas obtidas para cadelas são semelhantes às relatadas para bovinos (Kacinskis *et al.*, 2005), porém maiores que as descritas para bubalinos (Mondadori *et al.*, 2007). O conhecimento da morfometria folicular é importante para o acompanhamento do desenvolvimento folicular em técnicas como o cultivo de folículos pré-antrais e a maturação de ovócitos *in vitro*.

A ultraestrutura dos folículos primordiais observada em nosso trabalho é semelhante a descrita para cadelas por Lopes *et al.*, (2009). Lopes *et al.* também descrevem um aspecto geral dos folículos, mas não descrevem detalhadamente quais as características de cada classe. Em nosso trabalho, todas as classes de FOPA de cadelas foram descritas. Além disso, de um modo geral a ultraestrutura dos FOPA de cadela é semelhante à de algumas outras espécies (bovino, bubalino, caprino). Mitocôndrias arredondadas foram as organelas mais vistas nas três classes foliculares estudadas. Isso também é observado em FOPA de búfalos (Mondadori *et al.*, 2007), bovinos (Kacinskis *et al.*, 2005), felinos (Carrijo Júnior *et al.*, 2010) e suínos (Silva *et al.*, 2011). Fair *et al.*, (1997) sugerem que as mitocôndrias redondas sejam organelas imaturas das quais as outras formas derivam. As mitocôndrias alongadas só são visualizadas em maior quantidade a partir do folículo secundário, possivelmente porque a

derivação mitocondrial ainda não é tão necessária, visto que ovócitos caninos são ovulados imaturos, em estágio de vesícula germinativa (Prófase I), enquanto em outras espécies, os ovócitos são ovulados em Metáfase II (Luvoni *et al.*, 2005).

Além da caracterização folicular, este estudo descreve os efeitos da criopreservação de FOPA de cadelas. Alguns outros estudos envolvendo conservação (mas não criopreservação) de tecido ovariano foram realizados em caninos, Lima *et al.*, 2010) observaram a morfologia dos FOPA contidos no tecido ovariano, submetidos à temperatura de 0 °C até 36 horas. O estudo identificou que há uma queda gradual na porcentagem de FOPA morfológicamente normais conforme a progressão do tempo. Outro estudo de preservação por resfriamento (Lopes *et al.*, 2009), onde os FOPA foram submetidos a vários tratamentos com meios de cultivo, temperatura e tempos de incubação diferentes mostrou, por que os folículos apresentaram ultraestrutura semelhante ao controle e viabilidade de aproximadamente 60% em tratamentos com baixas temperaturas (4 °C) por até 24 horas. Isso mostra que FOPA de cadela apresentam resistência quando submetidos a baixas temperaturas.

Este estudo relata pela primeira vez o resultado do congelamento lento de ovários de cadelas usando DMSO como crioprotetor, o que resultou em 86% de FOPA morfológicamente normais após o descongelamento. O congelamento lento já vem sendo realizado em outras espécies, como em porcas, em cuja espécie Borges *et al.*, (2009) obtiveram taxas de FOPA morfológicamente normais de 72% utilizando DMSO. Em um estudo em caprinos (Rodrigues *et al.*, 2004a), também utilizando DMSO como crioprotetor para o congelamento lento, as porcentagens de folículos morfológicamente normais foram menores que 48%. É interessante observar nesse caso que o crioprotetor tem uma interação espécie-específica, pois apesar de utilizarmos um mesmo crioprotetor (DMSO) com

protocolo semelhante ao dos experimentos citados, a porcentagem dos FOPA normais no presente estudo foi sempre maior (86%). Neto *et al.*, (2008) compararam a associação de crioprotetores permeáveis com não permeáveis em ovários de coelhas e, quando o DMSO foi utilizado, foi obtida uma taxa de aproximadamente 50% de FOPA morfológicamente normais. Já em ovinos (Amorim *et al.*, 2007), o congelamento lento de folículos primordiais isolados utilizando o DMSO resultaram em 87% de folículos morfológicamente normais utilizando a coloração de azul de tripan para avaliar a viabilidade dos mesmos, uma taxa semelhante à encontrada em nosso estudo. Lucci *et al.*, (2004) testaram DMSO em duas concentrações no congelamento lento de folículos de bovinos zebuínos. A criopreservação com o DMSO na mesma concentração utilizada em nosso trabalho (1,5M) apresentou uma taxa um pouco menor de FOPA normais (74%) em relação ao presente trabalho, enquanto em uma concentração maior (3M) foi obtida taxa semelhante (88%).

Em nosso estudo, os folículos avaliados no congelamento lento não apresentaram grandes alterações morfológicas na microscopia de luz, entretanto, na ultraestrutura foram encontrados danos mitocondriais, além de baixa densidade de organelas presentes no citoplasma do ovócito, retração do ovócito e perda de células da granulosa. Danos semelhantes foram reportados quando foi avaliada a ultraestrutura de FOPA de ovinos criopreservados (Santos *et al.*, 2006a). Lucci *et al.*, (2004) em bovinos, observaram a perda de algumas células da granulosa, mas com o ovócito apresentando características normais, o que também foi observado no presente trabalho. A perda de algumas células da granulosa podem ser compensadas com o posterior desenvolvimento folicular (Lucci *et al.*, 2004). As diferenças que encontramos nas análises histológicas e ultraestruturais no congelamento lento possivelmente ocorreram porque o tempo de processamento da amostra para o congelamento lento é muito longo, aproximadamente duas horas e trinta minutos, e as

alterações ocorrem em um nível ultraestrutural, lesando mais o ovócito e as células da granulosa, e como na MET o poder de resolução é maior, é esperado que se encontrem mais danos que não são identificáveis no microscópio de luz. Essa diferença também já foi reportada por Silva *et al.*, (2001); Santos *et al.*, (2006a); Borges *et al.*, (2009).

A vitrificação de FOPA caninos não apresenta muitos estudos, sejam para folículos isolados ou em tecido ovariano, sendo que o primeiro relato foi feito por Ishijima *et al.*, 2006, onde o enfoque foi o sucesso no transplante após a criopreservação. Este trabalho não traz dados sobre a percentagem ou número de FOPA que mantiveram sua morfologia normal após a criopreservação. A vitrificação do tecido ovariano nesse caso foi executada em contato direto com o nitrogênio. Em nosso estudo, efetuamos a vitrificação em superfície sólida, uma técnica proposta por Dinnyes *et al.*, (2000) que apresentou boas taxas de sobrevivência para ovócitos bovinos vitrificados. Abe *et al.*, (2008) vitrificaram complexos cumulus-ovócitos (obtidos de folículos antrais) caninos e observaram taxas próximas a 60% de normalidade na morfologia dos ovócitos submetidos aos diferentes tratamentos testados no estudo. Desta forma, este é o primeiro estudo a relatar numericamente o efeito da vitrificação de tecido ovarianos de cadela sobre a morfologia dos FOPA. Em bovinos e humanos (Kagawa *et al.*, 2009) o tecido ovariano vitrificado por imersão direta no nitrogênio apresentou uma alta taxa de ovócitos viáveis (89% para as duas espécies) observados por microscopia de fluorescência. Também em humanos (Huang *et al.*, 2008) utilizando a vitrificação em superfície sólida, a avaliação histológica mostrou que 85% dos folículos primordiais criopreservados apresentavam morfologia semelhante ao controle. Nos dois casos, as taxas obtidas foram superiores às de nosso trabalho, o que pode ser utilizado como um parâmetro no aperfeiçoamento de nosso protocolo de vitrificação. Em caprinos (Carvalho *et al.*, 2011) utilizando vários métodos para avaliar a eficácia da vitrificação, os

melhores resultados foram obtidos na vitrificação por superfície sólida (72% de folículos morfologicamente normais), resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo (68%).

Em nosso trabalho, a ultraestrutura dos FOPA vitrificados apresentou características semelhantes ao controle nos folículos primordiais e primários, sendo que os folículos secundários sofreram danos acentuados. Da mesma forma, Zhou *et al.*, (2010) vitrificaram tecido ovariano humano e observaram uma grande alteração na distribuição das organelas citoplasmática e a presença de vesículas, mas aproximadamente 70% dos folículos vitrificados apresentaram ultraestrutura semelhante ao controle.

Quando comparamos os métodos de congelamento lento e vitrificação observamos que o congelamento lento apresentou uma porcentagem maior de FOPA morfologicamente normais que a vitrificação, porém a ultraestrutura dos FOPA vitrificados estava mais íntegra que a dos FOPA submetidos ao congelamento lento. Neste mesmo sentido, Aerts *et al.*, (2008) testaram a viabilidade de folículos pré-antrais de murinos submetidos à vitrificação em superfície sólida e congelamento lento e observaram, por meio de análises histológicas e imunohistoquímica que o congelamento lento e a vitrificação foram inferiores em relação ao grupo controle. Porém, na avaliação histológica, o congelamento lento apresentou maior integridade morfológica que a vitrificação embora não tenha diferido significativamente na imunohistoquímica. Estudos comparativos entre as técnicas de congelamento lento e vitrificação também foram feitos em macacos rhesus (Ting *et al.*, 2011) avaliando o efeito para folículos secundários. Os autores reportaram que o tratamento de vitrificação apresentou uma maior integridade dos folículos do que o congelamento lento. No presente trabalho os folículos secundários em ambos os tratamentos apresentaram mais danos que folículos primordiais e primários. Em camundongos (Kim *et al.*, 2011) fizeram a avaliação ultraestrutural dos folículos submetidos aos dois protocolos de criopreservação e mostraram

que nos dois protocolos os folículos ovarianos apresentaram lesões semelhantes na ultraestrutura, como deformidades mitocondriais e uma grande quantidade de vacúolos.

Uma possibilidade da diferença ultraestrutural encontrada nos dois tratamentos é de que uma vez que a vitrificação é um procedimento que ocorre rapidamente, as lesões encontradas na microscopia de luz e na ultraestrutura ocorrem simultaneamente, e que esses danos já danificam o folículo com maior intensidade. No congelamento lento, por ser um procedimento mais demorado, os danos ocorrem gradualmente, o que possivelmente impossibilita a distinção de um folículo degenerado no aspecto da microscopia de luz, mas que tem a sua ultraestrutura comprometida, pelo fato de ele sofrer um congelamento que dura aproximadamente duas horas e meia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das características reprodutivas de canídeos é muito importante. Um animal que possivelmente foi o primeiro domesticado pelo humano, mas no que concerne aos estudos de reprodução, ainda não conseguiu a atenção merecida.

As biotécnicas da reprodução em canídeos podem ajudar na preservação das espécies selvagens e de algumas raças domésticas que correm risco de extinção, auxiliar na manutenção de material genético de animais com alto valor zootécnico e de interesse social, como os cães-guia.

Em nosso trabalho, pudemos verificar o verdadeiro potencial reprodutivo da cadela, que apresenta uma grande quantidade de folículos ovarianos pré-antrais que não são utilizados em sua totalidade durante a vida reprodutiva, e que por meio de técnicas de reprodução assistida podem ser melhor aproveitadas. Também foram abordados aspectos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais dos folículos ovarianos pré-antrais, facilitando futuros estudos na avaliação dos folículos.

Este também foi o primeiro trabalho que envolveu o congelamento lento e ainda a comparação de dois métodos de criopreservação em tecido ovariano de cadelas. Pudemos concluir que as dois métodos apresentaram resultados promissores, mas que ainda necessitam de mais aperfeiçoamento. A vitrificação preserva melhor a ultraestrutura dos folículos primordiais e primários que o congelamento lento. Uma especial atenção pode ser dada aos folículos secundários, que em ambas as técnicas apresentaram maior sensibilidade, com uma taxa baixa de normalidade em sua morfologia.

Mais estudos são necessários nessa área, avaliar os folículos criopreservados, por meio de cultivo *in vitro*, testes de viabilidade, transplantes, métodos que possam dar informações sobre o comportamento desses folículos, a possibilidade deles se desenvolverem, chegarem à maturidade, capacidade de possuir ovócitos fertilizáveis e por fim gestações e nascimentos de filhotes saudáveis, pois essa é a finalidade principal das técnicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, Y., Suwa, Y., Suzuki, H., 2008. Vitrification of canine embryos at various developmental stages. *Biology of Reproduction*. 152-152.
- Aerts, J. M. J., De Clercq, J. B. P., Andries, S., Leroy, J. L. M. R., Van Aelst, S., Bols, P. E. J., 2008. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology*. 57, 163-169.
- Akar, M., Oktay, K., 2005. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16, 374-380.
- Al-aghbari, A. M., Menino, A. R., 2002. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*. 71, 101-110.
- Almodin, C. G., Minguetti-Camara, V. C., Meister, H., Ceschin, A. P., Kriger, E., Ferreira, J. O. H. R., 2004a. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertility and Sterility*. 81, 160-164.
- Almodin, C. G., Minguetti-Camara, V. C., Meister, H., Ferreira, J. O. H. R., Franco, R. L., Cavalcante, A. A., Radaelli, M. R. M., Bahls, A. S., Moron, A. F., Murta, C. G. V., 2004b. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Human Reproduction*. 19, 1287-1293.
- Amorim, C. A., Rodrigues, A. P. R., Rondina, D., Goncalves, P. B. D., De Figueiredo, J. R., Giorgetti, A., 2003a. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertility and Sterility*. 79, 682-686.
- Amorim, C. A., Rondina, D., Lucci, C. M., Giorgetti, A., de Figueiredo, J. R., D Goncalves, P. B., 2007. Cryopreservation of sheep primordial follicles. *Reproduction in Domestic Animals*. 42, 53-57.
- Amorim, C. A., Rondina, D., Lucci, C. M., Goncalves, P. B. D., de Figueiredo, J. R., Giorgetti, A., 2006. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. *Fertility and Sterility*. 85, 1077-1081.
- Amorim, C. A., Rondina, D., Rodrigues, A. P. R., Costa, S. H. F., Goncalves, P. B. D., de Figueiredo, J. R., Giorgetti, A., 2003b. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology*. 60, 735-742.
- Arata, S., Momozawa, Y., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2010. Important Behavioral Traits for Predicting Guide Dog Qualification. *Journal of Veterinary Medical Science*. 72, 539-545.
- Arav, A., Gavish, Z., Elami, A., Natan, Y., Revel, A., Silber, S., Gosden, R. G., Patrizio, P., 2010. Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries. *Reproductive Biomedicine Online*. 20, 48-52.
- Arav, A., Revel, A., Nathan, Y., Bor, A., Gacitua, H., Yavin, S., Gavish, Z., Uri, M., Elami, A., 2005. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Human Reproduction*. 20, 3554-3559.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H., 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187, 77-81.
- Baird, D. T., Campbell, B., de Souza, C., Telfer, E., 2004. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 113, S55-S59.
- Barber, M. R., Lee, S. M., Steffens, W. L., Ard, M., Fayrer-Hosken, R. A., 2001. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*. 55, 1705-1717.
- Bautista, J. A. N., Kanagawa, H., 1998. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 45, 183-191.

- Bedaiwy, M. A., Jeremias, E., Gurunluoglu, R., Hussein, M. R., Siemianow, M., Biscotti, C., Falcone, T., 2003. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertility and Sterility*. 79, 594-602.
- Betteridge, K. J., 1995. Phylogeny, Ontogeny and Embryo-Transfer. *Theriogenology*. 44, 1061-1098.
- Bordes, A., Lornage, J., Demirci, B., Franck, M., Courbiere, B., Guerin, J. F., Salle, B., 2005. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Human Reproduction*. 20, 2745-2748.
- Borges, E. N., Silva, R. C., Futino, D. O., Rocha, C. M. C., Amorim, C. A., Bao, S. N., Lucci, C. M., 2009. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*. 59, 195-200.
- Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H. J., Miller, D. M., Winger, J. D., Massey, J. B., Lamb, S. V., Brackett, B. G., 2004. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*. 61, 581-594.
- Boutelle, S., Lenahan, K., Krisher, R., Bauman, K. L., Asa, C. S., Silber, S., 2011. Vitrification of oocytes from endangered Mexican gray wolves (*Canis lupus baileyi*). *Theriogenology*. 75, 647-654.
- Boyko, A. R., Boyko, R. H., Boyko, C. M., Parker, H. G., Castelhana, M., Corey, L., Degenhardt, J. D., Auton, A., Hedimbi, M., Kityo, R., Ostrander, E. A., Schoenebeck, J., Todhunter, R. J., Jones, P., Bustamante, C. D., 2009. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 13903-8.
- Bysted, B. V., Dieleman, S. J., Hyttel, P., Greve, T., 2001. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *Advances in Reproduction in Dogs, Cats and Exotic Carnivores*. 181-186.
- Cahill, L. P., Mauleon, P., 1981. A Study of the Population of Primordial and Small Follicles in the Sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 61, 201-206.
- Candy, C. J., Wood, M. J., Whittingham, D. G., 1995. Follicular Development in Cryopreserved Marmoset Ovarian Tissue after Transplantation. *Human Reproduction*. 10, 2334-2338.
- Candy, C. J., Wood, M. J., Whittingham, D. G., 1997. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*. 110, 11-19.
- Carrijo Júnior, O. A., Marinho, A. P. S., Campos, A. A., Amorim, C. A., Bao, S. N., Lucci, C. M., 2010. Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cells Tissues Organs*. 191, 152-160.
- Carroll, J., Whittingham, D. G., Wood, M. J., Telfer, E., Gosden, R. G., 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 90, 321-7.
- Carvalho, A. A., Faustino, L. R., Silva, C. M. G., Castro, S. V., Luz, H. K. M., Rossetto, R., Lopes, C. A. P., Campello, C. C., Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P. R., Costa, A. P. R., 2011. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*. 76, 933-941.
- Castro, S. V., de Carvalho, A. A., da Silva, C. M. G., Faustino, L. R., Campello, C. C., Lucci, C. M., Bao, S. N., de Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P. R., 2011. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and in vitro culture of ovarian tissue. *Cell and Tissue Research*. 346, 283-292.
- Celestino, J. J. D., dos Santos, R. R., Lopes, C. A. P., Martins, F. S., Matos, M. H. T., Melo, M. A. P., Bao, S. N., Rodrigues, A. P. R., Silva, J. R. V., de Figueiredo, J. R., 2008. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*. 108, 309-318.
- Chao, L., Deng, X. H., Wang, X., Fu, Q. Z., Xu, A. R., Hao, C. Y., Yu, H. L., Yu, X., 2008. Normal developmental competence to the blastocyst stage is preserved in rabbit ovarian tissue following cryopreservation and autografting to the mesometrium. *Reproduction Fertility and Development*. 20, 466-473.

- Chen, C.-H., Chen, S.-G., Wu, G.-J., Wang, J., Yu, C.-P., Liu, J.-Y., 2006. Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after frozen banking at -196°C . *Fertility and Sterility*. 86, 1059-1066.
- Cleary, M., Paris, M. C. J., Shaw, J., Jenkin, G., Trounson, A., 2003. Effect of ovariectomy and graft position on cryopreserved common wombat (*Vombatus ursinus*) ovarian tissue following xenografting to nude mice. *Reproduction Fertility and Development*. 15, 333-342.
- Cleary, M., Shaw, J. M., Jenkin, G., Trounson, A. O., 2004. Influence of hormone environment and donor age on cryopreserved common wombat (*Vombatus ursinus*) ovarian tissue xenografted into nude mice. *Reproduction Fertility and Development*. 16, 699-707.
- Courbiere, B., Caquant, L., Mazoyer, C., Franck, M., Lornage, J., Salle, B., 2009. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertility and Sterility*. 91, 2697-2706.
- Courbiere, B., Massardier, J., Salle, B., Mazoyer, C., Guerin, J. F., Lornage, J., 2005. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertility and Sterility*. 84, 1065-1071.
- Czarny, N. A., Harris, M. S., Rodger, J. C., 2009. Dissociation and preservation of preantral follicles and immature oocytes from female dasyurid marsupials. *Reproduction Fertility and Development*. 21, 640-648.
- de Leseigno, C. V., Reynaud, K., Pechoux, C., Chebrou, M., Chastant-Maillard, S., 2008. Ultrastructural evaluation of in vitro-matured canine oocytes. *Reproduction Fertility and Development*. 20, 626-639.
- Deanesly, R., 1957. Egg Survival in Immature Rat Ovaries Grafted after Freezing and Thawing. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 147, 412-&.
- Demirci, B., Lornage, J., Salle, B., Frappart, L., Franck, M., Guerin, J. F., 2001. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertility and Sterility*. 75, 754-762.
- Deng, X. H., Xu, A. R., Chao, L., Yu, H. L., Zhen, J. H., Hashimoto, S., Morimoto, Y., 2007. Effect of different sites for cryopreserved ovarian tissue implantation in rabbit. *Human Reproduction*. 22, 662-668.
- Denschlag, D., Knobloch, C., Kockrow, A., Baessler, A., Goebel, H., Wellens, E., Haberstroh, J., Tempfer, C., Keck, C., 2005. Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue in sheep. *Fertility and Sterility*. 83, 501-503.
- Devireddy, R. V., Li, G., Leibo, S. P., 2006. Suprazero cooling conditions significantly influence subzero permeability parameters of mammalian ovarian tissue. *Molecular Reproduction and Development*. 73, 330-341.
- Diagone, K. V., Vicente, W. R. R., Pacheco, M. R., Mateus, O., 2008. Oocyte morphometry in female dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). *Anatomia Histologia Embryologia*. 37, 81-85.
- Dinnyes, A., Dai, Y. P., Jiang, S., Yang, X. Z., 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*. 63, 513-518.
- Dolezel, R., Kyliankova, R., Kummer, V., Maskova, J., Stara, P., Vitasek, R., 2004. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. *Acta Veterinaria Brno*. 73, 37.
- Domingues, S. F. S., Ferreira, H. S., Muniz, J. A. P. C., Lima, A. K. F., Ohashi, O. M., Figueiredo, J. R., Silva, L. D. M., 2003. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*. 55, 301-308.
- Durrant, B. S., Pratt, N. C., Russ, K. D., Bolamba, D., 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*. 49, 917-932.
- Erickson, B. H., 1966a. Development and Radio-Response of Prenatal Bovine Ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 11, 97-&.
- Erickson, B. H., 1966b. Development and Senescence of Postnatal Bovine Ovary. *Journal of Animal Science*. 25, 800-&.

- Erickson, B. H., Reynolds, R. A., Murphree, R. L., 1976. Ovarian Characteristics and Reproductive-Performance of Aged Cow. *Biology of Reproduction*. 15, 555-560.
- Eroglu, A., Lawitts, J. A., Toner, M., Toth, T. L., 2003. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*. 46, 121-134.
- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Greve, T., Boland, M., 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195, 327-336.
- Gandolfi, F., Paffoni, A., Brambilla, E. P., Bonetti, S., Brevini, T. A. L., Ragni, G., 2006. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertility and Sterility*. 85, 1150-1156.
- Gittleman, J. L., Funk, S. M., MacDonald, D. W., Wayne, R. K., 2001. Why 'carnivore conservation'? *Carnivore Conservation*. 5, 1-+.
- Gordon, I. R., 2003. Laboratory production of cattle embryos: I. Gordon. CABI Pub.
- Gosden, R. G., Baird, D. T., Wade, J. C., Webb, R., 1994. Restoration of Fertility to Oophorectomized Sheep by Ovarian Autografts Stored at -196-Degrees-C. *Human Reproduction*. 9, 597-603.
- Gougeon, A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 17, 121-155.
- Gougeon, A., Chainy, G. B. N., 1987. Morphometric Studies of Small Follicles in Ovaries of Women at Different Ages. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81, 433-442.
- Gougeon, A., Ecochard, R., Thalabard, J. C., 1994. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biology of Reproduction*. 50, 653-663.
- Green, S. H., Smith, A. U., Zuckerman, S., 1956. The Numbers of Oocytes in Ovarian Autografts after Freezing and Thawing. *Journal of Endocrinology*. 13, 330-334.
- Gunasena, K. T., Lakey, J. R. T., Villines, P. M., Bush, M., Raath, C., Critser, E. S., McGann, L. E., Critser, J. K., 1998. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*. 53, 265-275.
- Gunasena, K. T., Lakey, J. R. T., Villines, P. M., Critser, E. S., Critser, J. K., 1997. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biology of Reproduction*. 57, 226-231.
- Huang, L., Mo, Y., Wang, W., Li, Y., Zhang, Q., Yang, D., 2008. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 139, 193-198.
- Hulshof, S. C. J., Figueiredo, J. R., Beckers, J. F., Bevers, M. M., Vandenhurk, R., 1994. Isolation and Characterization of Preantral Follicles from Fetal Bovine Ovaries. *Veterinary Quarterly*. 16, 78-80.
- IBGE, 2010. Censo Demográfico. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Imhof, M., Bergmeister, H., Lipovac, M., Rudas, M., Hofstetter, G., Huber, J., 2006. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertility and Sterility*. 85, 1208-1215.
- Imhof, M., Hofstetter, G., Bergmeister, H., Rudas, M., Kain, R., Lipovac, M., Huber, J., 2004. Cryopreservation of a whole ovary as a strategy for restoring ovarian function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 21, 459-465.
- Ishijima, T., Kobayashi, Y., Lee, D. S., Ueta, Y. Y., Matsui, M., Lee, J. Y., Suwa, Y., Miyahara, K., Suzuki, H., 2006. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 52, 293-299.
- IUCN, UCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. 2011.
- Jain, J. K., Paulson, R. J., 2006. Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*. 86, 1037-46.
- Jewgenow, K., Penfold, L. M., Meyer, H. H. D., Wildt, D. E., 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 112, 39-47.

- Jondet, M., Dominique, S., Scholler, R., 1984. Effects of Freezing and Thawing on Mammalian Oocyte. *Cryobiology*. 21, 192-199.
- Kacinskis, M. A., Lucci, C. M., Luque, M. C. A., Bao, S. N., 2005. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 87, 45-57.
- Kagabu, S., Umezu, M., 2000. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Experimental Animals*. 49, 17-21.
- Kagawa, N., Silber, S., Kuwayama, M., 2009. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*. 18, 568-577.
- Kardak, A., Leibo, S. P., Devireddy, R., 2007. Membrane transport properties of equine and macaque ovarian tissues frozen in mixtures of dimethylsulfoxide and ethylene glycol. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme*. 129, 688-694.
- Kartha, K. K., 1985. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press.
- Kim, G. A., Kim, H. Y., Kim, J. W., Lee, G., Lee, E., Ahn, J. Y., Park, J. H., Lim, J. M., 2011. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. *Theriogenology*. 75, 1045-1051.
- Land, R. B., 1970. Number of Oocytes Present at Birth in Ovaries of Pure and Finnish Landrace Cross Blackface and Welsh Sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 21, 517-&.
- Li, G., Thirumala, S., Leibo, S. P., Devireddy, R. V., 2006. Subzero water transport characteristics and optimal rates of freezing rhesus monkey (*Macaca mulatta*) ovarian tissue. *Molecular Reproduction and Development*. 73, 1600-1611.
- Lima, A. K. F., Silva, A. R., Santos, R. R., Sales, D. M., Evangelista, A. F., Figueiredo, J. R., Silva, L. D. M., 2006. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*. 66, 1664-1666.
- Lima, G. L., Costa, L. L. M., Cavalcanti, D. M. L. P., Rodrigues, C. M. F., Freire, F. A. M., Fontenele-Neto, J. D., Silva, A. R., 2010. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP (R))-based medium. *Theriogenology*. 74, 146-152.
- Lin, T. C., Yen, J. M., Kuo, T. C., Gong, K. B., Hsu, K. H., Hsu, T. T., 2008. 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*. 8.
- Lopes, C. A. P., dos Santos, R. R., Celestino, J. J. D., Melo, M. A. P., Chaves, R. N., Campello, C. C., Silva, J. R. V., Bao, S. N., Jewgenow, K., de Figueiredo, J. R., 2009. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*. 115, 201-214.
- Lornage, J., Salle, B., 2007. Ovarian and oocyte cryopreservation. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 19, 390-394.
- Lucci, C. M., Amorim, C. A., Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. R., Bao, S. N., Silva, J. R. V., Goncalves, P. B. D., 1999. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science*. 56, 223-236.
- Lucci, C. M., Kacinskis, M. A., Lopes, L. H. R., Rumpf, R., Bao, S. N., 2004. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*. 61, 1101-1114.
- Lucci, C. M., Rumpf, R., Figueiredo, J. R., Bao, S. N., 2002. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*. 57, 1467-83.
- Luvoni, G. C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D., 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 63, 41-59.
- Luz, V. B., Santos, R. R., Pinto, L. C., Soares, A. A., Celestino, J. J., Mafezoli, J., Campello, C. C., Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P., 2009. Dimethyl sulfoxide perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. *Fertility and Sterility*. 91, 1513-5.

- Martinez-Burgos, M., Herrero, L., Megias, D., Salvanes, R., Montoya, M. C., Cobo, A. C., Garcia-Velasco, J. A., 2011. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertility and Sterility*. 95, 374-377.
- Mattiske, D., Shaw, G., Shaw, J. M., 2002. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction*. 123, 143-153.
- Mazur, P., Schneider, U., 1986. Osmotic Responses of Preimplantation Mouse and Bovine Embryos and Their Cryobiological Implications. *Cell Biophysics*. 8, 259-285.
- Mondadori, R. G., Luque, M. C. A., Santin, T. R., Bao, S. N., 2007. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 97, 323-333.
- Mondadori, R. G., Santin, T. R., Fidelis, A. A. G., Porfirio, E. P., Bao, S. N., 2010. Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-antral Follicle Population and Ultrastructural Characterization of Antral Follicle Oocyte. *Reproduction in Domestic Animals*. 45, 33-37.
- Nagano, M., Atabay, E. P., Atabay, E. C., Hishinuma, M., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2007. Effects of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on in vitro viability of mouse preantral follicles. *Biomedical Research-Tokyo*. 28, 153-160.
- Neto, V., Buff, S., Lornage, J., Bottollier, B., Guerin, P., Joly, T., 2008. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertility and Sterility*. 89, 1348-1356.
- Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V., Gosden, R., 1996. Ovary and ovulation: Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*. 11, 1487-1491.
- Nuttinck, F., Mermillod, P., Massip, A., Dessy, F., 1993. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. *Theriogenology*. 39, 811-21.
- Oktaç, K., Newton, H., Aubard, Y., Salha, O., Gosden, R. G., 1998. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertility and Sterility*. 69, 1-7.
- Oskam, I. C., Asadi, B. A., Santos, R. R., 2010. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. *Fertility and Sterility*. 93, 2764-6.
- Otala, M., Erkkilä, K., Tuuri, T., Sjöberg, J., Suomalainen, L., Suikkari, A. M., Pentikainen, V., Dunkel, L., 2002. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproduction*. 8, 228-236.
- Paris, M. C., Snow, M., Cox, S. L., Shaw, J. M., 2004. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? *Theriogenology*. 61, 277-91.
- Parkes, A. S., Smith, A. U., 1953. Regeneration of Rat Ovarian Tissue Grafted after Exposure to Low Temperatures. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 140, 455-&.
- Payan-Carreira, R., Pires, M. A., 2008. Multiocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. *Theriogenology*. 69, 977-982.
- Paynter, S. J., 2000. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Update*. 6, 449-456.
- Paynter, S. J., Cooper, A., Fuller, B. J., Shaw, R. W., 1999. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: Structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology*. 38, 301-309.
- Perdrix, A., Mace, B., Milazzo, J. P., Liard-Zmuda, A., Baron, M., Rives, N., 2010. Ovarian tissue thawing: A comparison of two conditions. *Fertility and Sterility*. 93, 307-310.
- Pereira, R. M., Marques, C. C., 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*. 9, 267-277.
- Pinto, L. C., Santos, R. R., Faustino, L. R., da Silva, C. M. G., Luz, V. B., Maia Junior, J. E., Soares, A. A. X., Celestino, J. J. H., Mafezoli, J., Campello, C. C., Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P. R., 2008.

- Quantification of Dimethyl Sulfoxide Perfusion in Sheep Ovarian Tissue: A Predictive Parameter for Follicular Survival to Cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*. 6.
- Purvis, A., Mace, G. M., Gittleman, J. L., 2001. Past and future carnivore extinctions: a phylogenetic perspective. *Carnivore Conservation*. 5, 11-34.
- Rall, W. F., Fahy, G. M., 1985. Ice-Free Cryopreservation of Mouse Embryos at -196-Degrees-C by Vitrification. *Nature*. 313, 573-575.
- Reynaud, K., de Lesegno, C. V., Chebrou, M., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S., 2009a. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*. 72, 1120-1131.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrou, M., de Lesegno, C. V., Chastant-Maillard, S., 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*. 130, 193-201.
- Reynaud, K., Gicquel, C., Thoumire, S., Chebrou, M., Ficheux, C., Bestandji, M., Chastant-Maillard, S., 2009b. Folliculogenesis and Morphometry of Oocyte and Follicle Growth in the Feline Ovary. *Reproduction in Domestic Animals*. 44, 174-179.
- Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., Costa, S. H. F., Matos, M. H. T., Santos, R. R., Lucci, C. M., Bao, S. N., Ohashi, O. M., Figueiredo, J. R., 2004a. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*. 84, 211-227.
- Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., Costa, S. H. F., Matos, M. H. T., Santos, R. R., Lucci, C. M., Bao, S. N., Ohashi, O. M., Figueiredo, J. R., 2004b. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*. 61, 1009-1024.
- Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., Costa, S. H. F., Santos, R. R., Lucci, C. M., Nunes, J. F., Figueiredo, J. R., 2005. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Ruminant Research*. 56, 103-111.
- Rodrigues, A. P. R., Costa, S. H. F., Santos, R. R., Amorim, C. A., Lucci, C. M., Bao, S. N., Nunes, J. F., Rondina, D., Figueiredo, J. R., 2006. In vitro culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. *Cell Preservation Technology*. 4, 290-298.
- Ross, M. H., Pawlina, W., 2006. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Berthollet, C., Lornage, J., 2003. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*. 80, 172-177.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R. C., Guerin, J. F., Lornage, J., 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility*. 77, 403-408.
- Santos, R. R., 2007. *Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation*. Ridderprint, Ridderkerk.
- Santos, R. R., Amorim, C., Cecconi, S., Fassbender, M., Imhof, M., Lornage, J., Paris, M., Schoenfeldt, V., Martinez-Madrid, B., 2010. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*. 122, 151-163.
- 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., 2009. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility*. 91, 1455-8.
- Santos, R. R., Rodrigues, A. P. R., Costa, S. H. F., Silva, J. R. V., Matos, M. H. T., Lucci, C. M., Bao, S. N., van den Hurk, R., Figueiredo, J. R., 2006a. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 91, 249-263.
- Santos, R. R., Tharasanit, T., Figueiredo, J. R., van Haeften, T., van den Hurk, R., 2006b. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell and Tissue Research*. 325, 523-531.

- Santos, R. R., Tharasanit, T., Van Haeften, T., Figueiredo, J. R., Silva, J. R. V., Van den Hurk, R., 2007a. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*. 327, 167-176.
- 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., 2007b. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Animal Reproduction Science*. 99, 53-64.
- Santos, R. R., van Haeften, T., Roelen, B. A. J., Knijn, H. M., Colenbrander, B., Gadella, B. M., van den Hurk, R., 2008. Osmotic tolerance and freezability of isolated caprine early-staged follicles. *Cell and Tissue Research*. 333, 323-331.
- Shaw, J. M., Oranratnachai, A., Trounson, A. O., 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*. 53, 59-72.
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., Sturion, L., Melo-Sterza, F. A., Seneda, M. M., 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*. 76, 1051-1057.
- Silva, J. R. V., Bao, S. N., Lucci, C. M., Carvalho, F. C. A., Andrade, E. R., Ferreira, M. A. L., Figueiredo, J. R., 2001. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. *Animal Reproduction Science*. 66, 209-223.
- Silva, R. C., Bao, S. N., JL, P. R. J., Lucci, C. M., 2011. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution. *Theriogenology*.
- Siqueira Filho, E., Pressão hidrostática: efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Vol. Master. Universidade de Brasília, Brasília, 2009, pp. 98.
- Stachecki, J. J., Cohen, J., 2004. An overview of oocyte cryopreservation. *Reproductive Biomedicine Online*. 9, 152-163.
- Telfer, E., Gosden, R. G., 1987. A Quantitative Cytological Study of Polyovular Follicles in Mammalian Ovaries with Particular Reference to the Domestic Bitch (*Canis-Familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 81, 137-147.
- Ting, A. Y., Yeoman, R. R., Lawson, M. S., Zelinski, M. B., 2011. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Human Reproduction*. 26, 2461-2472.
- Van Den Hurk, R., Bevers, M. M., Beckers, J. F., 1997. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*. 47, 73-82.
- Van Den Hurk, R., Zhao, H., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63, 1717-1751.
- Wang, Y., Xiao, Z., Li, L., Fan, W., Li, S. W., 2008. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction*. 23, 2256-2265.
- Wolvekamp, M. C. J., Cleary, M. L., Cox, S. L., Shaw, J. M., Jenkin, G., Trounson, A. O., 2001. Follicular development in cryopreserved Common Wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. *Animal Reproduction Science*. 65, 135-147.
- Yeoman, R. R., Wolf, D. P., Lee, D. M., 2005. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility and Sterility*. 83, 1248-1254.
- Zhou, X. H., Wu, Y. J., Shi, J., Xia, Y. X., Zheng, S. S., 2010. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*. 60, 101-105.