



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Comparação Entre o Congelamento Lento e a Vitriificação na

Criopreservação de Tecido Ovariano de Suínos

DANIELA CARRILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

***Comparação Entre o Congelamento Lento e a Vitrificação na
Criopreservação de Tecido Ovariano de Suínos***

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF

2013

DEDICATÓRIA

A todos os animais, especialmente aos suínos que foram a fonte do meu estudo e que me ensinaram o imenso valor da vida em seus momentos mais difíceis. A eles que me fizeram entender o amor através de seus grunhidos e olhares inocentes, dedico parte do meu ser.



“Quando o sol acena bate em mim

Diz valer a pena ser assim

Que no fundo é simples ser feliz

Difícil é ser tão simples”

O Teatro Mágico (Nas Margens de Mim)

AGRADECIMENTOS

Ao eterno Criador. “O céu estrelado sobre mim e a lei moral dentro de mim.”

Immanuel Kant

À minha orientadora, Carolina Madeira Lucci (Carol) que me proporcionou a realização deste trabalho e construiu comigo cada etapa. A você, que de uma maneira tão especial consegue aproximar competência e carinho nos seus ensinamentos, minha admiração e meu respeito, sempre. “Enchendo a minh’alma daquilo que outrora eu deixei de acreditar.” O Teatro Mágico (O Anjo Mais Velho)

À minha mãe Odete de Jesus Carrilho que ao longo deste trabalho me ajudou em todas as minhas dificuldades, por sua fé imutável e seu amor incondicional. “A medida do amor é amar sem medida.” Victor Hugo

Ao meu pai Maurílio Carrilho Silva (in memorian) pelo seu legado de amor, pelos maravilhosos princípios que fizeram de mim o que sou hoje e especialmente, por ter me ensinado a acreditar em grandes sonhos. “A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.” Francisco Cândido Xavier

Aos meus avós: José (Nenê) e Romilda, vó Aparecida e vô Carlito (in memorian) pelo aconchego, ajuda e atenção sempre. Aos meus tios: Gislene e Elias, por me acolherem durante muitos meses em Brasília, e às minhas primas Mariane e Flávia por nossa constante união desde a infância. “Pra você guardei o amor que nunca soube dar. O amor que tive e vi sem me deixar. Sentir sem conseguir provar. Sem entregar e repartir” Nando Reis (Pra Você Guardei o Amor)

À minha irmã Dayanne (Niguinha) e à minha sobrinha Gabriela por me encherem de alegria e de saudade. “Caminha noutra altura; voa por cima dos gelos, dos salpicos das ondas, das pedras aguçadas. Vai por cima de um mundo muito pequeno, nas asas de um fogo, em mãos de fadas.” Paulo Geraldo

Ao meu querido Fábio Resende Franco, por me ajudar a superar a dor da distância e pelo seu exemplo de dedicação que me inspira todo dia. “Que o nó que emperra e barra a vida à vera; é o mesmo que nos ata um ao outro em comunhão; que surge a indecisão que dilacera; e ela regenera a esperança sem razão.” 5 à Seco (Impasse)

Ao meu amigo-irmão Sidney que, por seu espírito livre, é uma entre pouquíssimas pessoas que deveras me compreende. “Não digas nada! Nem mesmo a verdade. Há tanta suavidade em nada se dizer e tudo se entender... De sentir e de ver.” Fernando Pessoa (Não Digas Nada!)

Às minhas amigas Ellen e Janice, pela fundamental ajuda na execução desse trabalho, pelo prazer de nossa convivência e principalmente, pela amizade. “Eu não preciso de ti. Tu não precisas de mim. Mas se tu me cativares, e se eu te cativar... Ambos precisaremos um do outro... A gente só conhece bem as coisas que cativou.” Antoine de Saint-Exupéry (O Pequeno Príncipe)

À Professora Doutora Sônia Bão e aos meus queridos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica que colaboraram de maneira fundamental para que este trabalho fosse executado. Aos colegas e professores do Laboratório de Genética Toxicológica (GTox) e do Laboratório de Morfologia e Morfogênese, pelo apoio em diversas etapas desse projeto. “Imagine que não há posses, eu me pergunto se você

pode, sem a necessidade de ganância ou fome, uma irmandade dos homens. Imagine todas as pessoas, compartilhando todo o mundo.” John Lennon (Imagine)

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por contribuir na minha formação como mestre e às secretárias Daniele e Ana pela cordialidade e por se disporem sempre, a nos auxiliar. “Nunca deixar de ter vontade para empreender e executar todas as coisas que julgar serem as melhores. Isso é seguir perfeitamente a virtude.” René Descartes

À CAPES pela bolsa durante todo o período do mestrado, à FINATEC, FAPDF, CNPq e FINEP pelo financiamento do projeto. “O dinheiro não traz felicidade – para quem não sabe o que fazer com ele” Machado de Assis

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.	Ovócitos e Folículos Ovarianos	3
2.2.	Criopreservação de Células Germinativas Femininas - Ovócitos maduros x Folículos pré-antrais (FPA)	7
2.3.	Crioprotetores.....	10
2.4.	Técnicas de Criopreservação.....	11
2.4.1.	Congelamento Lento	11
2.4.2.	Vitrificação	13
2.4.3.	Congelamento Lento x Vitrificação.....	16
2.5.	Avanços na Criopreservação de FPA.....	17
3.	JUSTIFICATIVA.....	22
4.	OBJETIVOS	24
4.1.	Objetivo Geral	24
4.2.	Objetivos Específicos	24
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1.	Coleta e Preservação do Tecido Ovariano.....	25
5.2.	Procedimentos de Criopreservação.....	26
5.2.1.	Congelamento Lento e Descongelamento do Tecido Ovariano.....	26

5.2.2. Vitrificação e Reaquecimento do Tecido Ovariano	28
5.2.3. Avaliação por Microscopia de Luz	29
5.2.4. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
5.3. Análise Estatística	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Avaliação por Microscopia de Luz	32
6.2. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
9. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE ABREVIÇÕES

CL – Congelamento Lento

CPS – Closed Pulled Straws

DMSO – Dimetilsulfóxido

EG – Etileno Glicol

FMN – Folículos Morfologicamente Normais

FPA – Folículos Pré-antrais

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GLI – Glicerol

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HE – Hematoxilina e Eosina

LH – Hormônio Luteinizante

M – Molar

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

ML – Microscopia de Luz

mM – mili Molar

N₂ – Nitrogênio

OPS – Open Pulled Straws

PROH – Propanodiol

PVP – Poli Vinil Pirrolidona

SCID – Severe combined immunodeficient

SE – Solução de Equilíbrio

SFB – Soro Fetal Bovino

SV – Solução de Vitrificação

V₁ – Vitrificação1

V₂ – Vitrificação2

RESUMO

Os avanços nas tecnologias reprodutivas têm aumentado o aproveitamento do material genético de animais de interesse zootécnico ou ameaçados de extinção. A criopreservação de ovócitos imaturos inclusos no tecido ovariano é uma alternativa para a preservação de diversas espécies, particularmente em suínos, visto que ovócitos maduros desse grupo são extremamente sensíveis a baixas temperaturas. A escolha da técnica de criopreservação (congelamento lento ou vitrificação) interfere na eficiência de preservação do material, por isso, são necessários estudos que visem o desenvolvimento de protocolos de conservação das células germinativas inclusas em folículos pré-antrais (FPA) suínos. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de técnicas de criopreservação, congelamento lento e vitrificação, na morfologia de FPA inclusos no tecido ovariano de suínos. Os fragmentos do tecido ovariano foram submetidos a dois protocolos de vitrificação (V_1 e V_2) e um de congelamento lento (CL), vitrificados em superfície sólida ou congelados em um freezer programável. Na V_1 , os fragmentos foram imersos em uma solução de equilíbrio (SE) de DMSO 1,0 M e uma solução de vitrificação (SV) de DMSO 2,0 M + acetamida 1,0 M + propanodiol 3,0 M. Para a V_2 , utilizou-se SE contendo etilenoglicol 0,6 M e SV contendo etilenoglicol 5,6 M + polivinilpirrolidona 0,45 M e 13,7% sacarose. Para o CL, os fragmentos foram colocados em criotubos com solução de etilenoglicol 1,5 M e 0,4% sacarose. As amostras foram congeladas pelo método lento ou vitrificadas em superfície sólida e todos os fragmentos foram armazenados em nitrogênio líquido. Após o reaquecimento ou descongelamento, as amostras foram fixadas e processadas para microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os dados das porcentagens de folículos morfologicamente normais (FMN) foram submetidos ao teste de Tukey. As médias de FMN foram

97,1±2,6 para o controle, 96,1±3,0 para a V₁, 81,1±14,8 para a V₂ e 86,7±7,3 para o CL. As porcentagens de FMN no CL e na V₂ foram estatisticamente menores (P<0,05) que a do controle e a da V₁, a qual por sua vez foi estatisticamente igual ao controle. Para a análise ultraestrutural, foram avaliados apenas FPA caracterizados como morfológicamente normais nos cortes semi-finos, e somente dos melhores tratamentos. A ultraestrutura celular de FPA criopreservados pelo método V₁ apresentou vários sinais de degeneração, enquanto FPA congelados pela técnica CL apresentaram morfologia normal, semelhante ao controle. Em conclusão, a técnica de CL foi mais eficiente para preservar folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de suínos, entretanto o aperfeiçoamento da técnica de vitrificação para tecido ovariano suíno ainda é necessário.

Palavras-chave: ultraestrutura, superfície sólida, folículos pré- antrais

ABSTRACT

Advances in reproductive technologies have increased the use of genetic material from animals of zootechnical interest or endangered species. Cryopreservation of oocytes enclosed in ovarian tissue is an alternative for preservation of many species, particularly pigs, since mature oocytes of this group are extremely sensitive to low temperatures. The choice of technique for cryopreservation (slow freezing or vitrification) interferes with the efficiency of preservation of the material, thus, studies are needed for the development of protocols for conservation of germ cells enclosed in preantral follicles (PAF) of pigs. The aim of our study was to compare the effect of cryopreservation techniques, slow freezing and vitrification, on morphology of PAF included in the ovarian tissue of pigs. The fragments of ovarian tissue were submitted to two vitrification protocols (V_1 and V_2) and one slow freezing (SF) protocol, vitrified on solid surface or frozen in a programmable freezer. In V_1 , fragments were immersed in an equilibrium solution (ES) of DMSO 1.0 M and a vitrification solution (VS) of DMSO 2.0 M + acetamide 1.0 M + propanediol 3.0 M. For V_2 , ES contained 0.6 M and VS contained ethylene glycol 5.6 M + polyvinylpyrrolidone 0.45 M and 13.7% sucrose. For the SF, fragments were placed in cryotubes with solution of 1.5 M ethylene glycol and 0.4% sucrose. Samples were slow cooled or vitrified by solid surface vitrification and all fragments were stored in liquid nitrogen. After reheating or defrosting, samples were fixed and processed for light microscopy and transmission electron microscopy. Data for the percentage of morphologically normal follicles (MNF) were subjected to Tukey's test. Mean MNF were 97.1 ± 2.6 for control, 96.1 ± 3.0 for V_1 , 81.1 ± 14.8 for V_2 and 86.7 ± 7.3 for SF. The percentages of MNF

in SF and in V₂ were lower (P <0.05) than in the control and in V₁, which was statistically equal to control. For ultrastructural analysis, were evaluated only PAF characterized as morphologically normal in the semithin sections and only the best treatments. The cellular ultrastructure of PAF cryopreserved by V₁ method showed various signs of degeneration, while PAF frozen by SF technique showed normal morphology, similar to control. In conclusion, the SF technique was more efficient to preserve preantral follicles enclosed in ovarian tissue of pigs; however, the improvement of vitrification technique for porcine ovarian tissue is still needed.

Keywords: ultra-structure, solid-surface, preantral follicles

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias na área da reprodução desenvolveram-se largamente nos últimos anos e têm possibilitado o aproveitamento do material genético de animais de interesse zootécnico ou ameaçados de extinção. Entre essas biotécnicas, a criopreservação de células germinativas é uma alternativa para conservação de espécies (Holt *et al.*, 1996; Wildt, 2000). Através desse método, tecidos biológicos permanecem fisiologicamente inertes, de forma que os processos celulares ficam em níveis basais pela manutenção do material em temperaturas criogênicas, como a do nitrogênio líquido, a -196°C (Bakhach, 2009).

Em suínos, os ovócitos maduros são extremamente sensíveis a baixas temperaturas (Didion *et al.*, 1990) e difíceis de serem criopreservados (Gupta *et al.*, 2007). Já as células germinativas inclusas em folículos pré antrais (FPA), encontram-se em estágio de quiescência, apresentando, portanto, taxa metabólica mais baixa, pequena quantidade de gotas lipídicas no citoplasma, menor tamanho que o do ovócito maduro e não possuem zona pelúcida ou grânulos corticais (Shaw *et al.*, 2000). Por esse motivo, uma alternativa para a recuperação de células germinativas é criopreservar o tecido ovariano, visto que nele estão presentes ovócitos inclusos em folículos pré-antrais.

Um fator que interfere na eficiência da criopreservação é a escolha da técnica a ser aplicada. Na vitrificação, as altas concentrações de crioprotetores fazem com que a célula passe para um estado vítreo antes que os cristais de gelo sejam formados no seu interior, diminuindo a formação dos mesmos. Todavia, a adoção de altas concentrações das substâncias crioprotetoras, pode provocar lesões de toxicidade na

célula (Saragusty e Arav, 2011). A criopreservação através do congelamento lento utiliza baixas concentrações de crioprotetores, tendo menor toxicidade que a vitrificação e, por isso, provocando menos lesões celulares. Entretanto, essa condição não é eficiente para impedir a formação de cristais de gelo (Arav *et al.*, 2002). Dessa forma, a técnica de criopreservação escolhida (congelamento lento ou vitrificação) influencia no aparecimento das injúrias provocadas em cada procedimento (Santos *et al.*, 2010).

Existem poucos trabalhos com criopreservação de tecido ovariano de suínos (Gandolfi *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2009; Moniruzzaman *et al.*, 2009) e, até o momento, os dois únicos estudos que aplicaram a técnica de vitrificação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano para essa espécie não alcançaram bons resultados. Considerando a relevância da preservação de raças naturalizadas para a suinocultura no Brasil e sabendo que o desenvolvimento de um método para a conservação de células germinativas em suínos pode favorecer espécies silvestres, é importante a realização de estudos que busquem aumentar a eficiência das técnicas de preservação de células germinativas para esses animais. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi analisar a eficiência de diferentes protocolos de criopreservação na conservação de folículos pré-antrais suínos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovócitos e Folículos Ovarianos

Nas fêmeas, as células reprodutivas são produzidas pelo ovário. Este órgão é anatomicamente dividido em duas regiões: medula e córtex, a primeira é formada por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e no córtex se encontram folículos ovarianos em diversos estágios de desenvolvimento (Magoffin *et al.*, 2005). Cada folículo constitui a unidade morfofuncional do ovário e é composto por um ovócito (célula germinativa) circundado por células somáticas (células foliculares), estas garantem o crescimento, a maturação e a liberação do ovócito maduro durante a ovulação. O folículo ovariano desempenha duas funções independentes, uma exócrina, responsável pelo desenvolvimento do ovócito, e outra endócrina, dada pela produção e liberação de hormônios esteróides (Hafez e Hafez, 2004).

A formação dos folículos ovarianos, processo denominado foliculogênese, e o desenvolvimento do gameta feminino, fenômeno denominado oogênese constituem dois acontecimentos distintos, entretanto ocorrem simultaneamente e têm início ainda na vida fetal da fêmea (Figura 1). A formação do ovócito inicia-se com a migração de células para o mesênquima da gônada (crista genital), ainda indiferenciada, colonizando-a (Van den Hurk e Zhao, 2005). Ali elas se multiplicam por mitose, alcançando uma quantidade maior que um milhão de células por animal (Erickson, 1966). Após as divisões mitóticas, as oogônias crescem e duplicam seus cromossomos (início da primeira divisão meiótica) dando origem aos ovócitos. De acordo com Ross *et al.* (1995), o núcleo ovocitário passará por quase todos os

processos da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno). Na fase de diplóteno, a divisão meiótica é interrompida (estágio de vesícula germinativa) e o núcleo da célula germinativa volta a ser ativado na ovulação da fêmea a partir da puberdade (Soto-Suazo e Zorn, 2005).

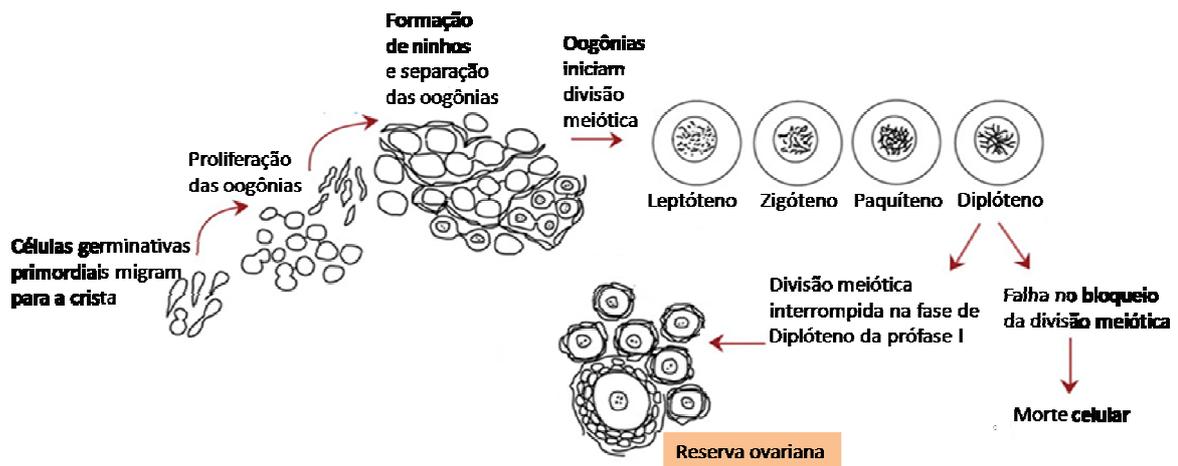


Figura 1. Desenho esquemático mostrando a formação dos folículos primordiais. FONTE: Adaptado de Hartshorne *et al.*, 2009.

A formação dos folículos (foliculogênese) inicia-se com a associação de células epiteliais achatadas (células da granulosa) com os ovócitos. Antes do nascimento da fêmea, existem em seus ovários folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 2). A união das células somáticas achatadas com o ovócito caracteriza a formação do folículo primordial, a partir do qual se inicia o crescimento folicular (Hafez e Hafez, 2004). Durante a primeira fase de desenvolvimento do folículo, o crescimento da célula germinativa é muito rápido, o núcleo aumenta de volume, as mitocôndrias aumentam em número e são distribuídas uniformemente pelo citoplasma, o retículo endoplasmático cresce e os complexos de Golgi migram para regiões próximas da

superfície celular. As células achatadas que envolvem o ovócito no folículo primordial adquirem uma configuração cubóide e neste momento ele passa a ser chamado folículo primário. Após sucessivas mitoses de células da granulosa, um epitélio estratificado é formado, e a partir desse momento o folículo é então denominado secundário ou pré-antral (Junqueira e Carneiro, 2008). Quando a camada granulosa prolifera-se, as células do estroma, que se encontram imediatamente externas à lâmina basal e que circundam diretamente o folículo, formam uma bainha de células de tecido conjuntivo, conhecida como teca folicular. Essa camada ainda se diferencia em duas: teca externa, camada exterior constituída por células musculares lisas e feixes de fibras colágenas, e teca interna cujas células possuem grande número de receptores de hormônio luteinizante (LH). Em resposta à estimulação do LH, essas células produzem e secretam os andrógenos, os quais são os precursores de estrógenos (Ross e Pawlina, 2008).

Uma espessa camada de glicoproteínas, denominada zona pelúcida, é secretada e envolve todo o ovócito. Essa estrutura desempenha funções essenciais no processo de fecundação e determina a ligação espécie-específica do espermatozóide ao ovócito (Gupta *et al.*, 1997). À medida que os folículos crescem, as células da granulosa passam a produzir determinada quantidade de líquido que contém hormônios esteróides. Este se acumula entre as células foliculares formando o antro e originando o folículo antral (Junqueira e Carneiro, 2008).

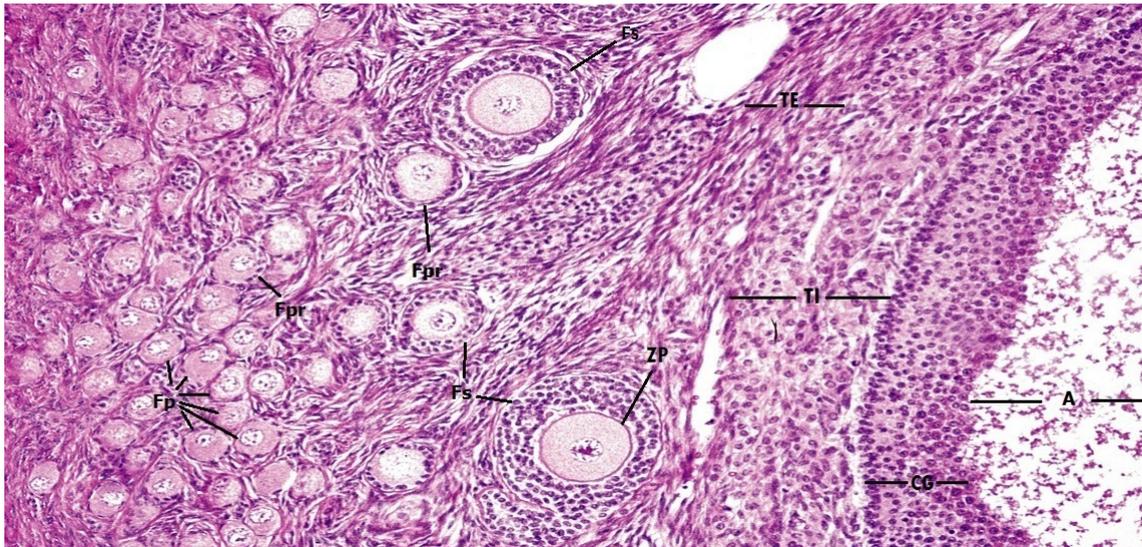


Figura 2. Fotomicrografia representando diferentes estágios do desenvolvimento folicular. A: antro, CG: células da granulosa, Fp: folículo primordial, Fpr: folículo primário, Fs: folículo secundário, TE: teca externa, TI: teca interna, ZP: zona pelúcida. FONTE: Adaptado de Ross e Pawlina, 2008.

Quando o indivíduo atinge a maturidade sexual, ocorre o amadurecimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. A partir dessa fase, a cada ciclo ovulatório, folículos antrais são recrutados para o crescimento com a finalidade de permitir o desenvolvimento do ovócito e a ovulação. Entre os folículos antrais recrutados, a maioria sofre um processo de morte celular designado atresia, por isso são denominados folículos atrésicos, e apenas alguns são selecionados para continuarem o crescimento. Dentre os folículos que continuam o desenvolvimento, outra parcela também sofre atresia e poucos, ou apenas um, dependendo da espécie, tornam-se dominantes. O recrutamento, seleção e dominância dos folículos antrais constitui o processo final da foliculogênese, esse depende da liberação de hormônios chamados gonadotrofinas. Com a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) passa a atuar de maneira efetiva na adenohipófise estimulando-a a liberar as principais gonadotrofinas: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o LH, que atuam nos ovários (Hafez e Hafez, 2004).

Folículos no estágio pré-antral constituem mais de 90% da população folicular do ovário (Gutierrez *et al.*, 2000). De todos eles, aproximadamente 0,1% chegarão à ovulação, os demais entrarão em atresia. É importante ressaltar que a atresia afeta principalmente os folículos no estágio antral, quando estes passam a ser dependentes das gonadotrofinas (Nuttinck *et al.*, 1993). Outra característica importante dos folículos pré-antrais é que estes podem ser encontrados nos ovários, independente da idade da fêmea ou da fase do ciclo estral em que ela esteja (Hashimoto *et al.*, 2007).

2.2. Criopreservação de Células Germinativas Femininas - Ovócitos maduros x Folículos pré-antrais (FPA)

A criopreservação de FPA pode ser usada com fins científicos na formação de bancos de germoplasma, possibilitando a realização de pesquisas que busquem a manutenção de raças raras e espécies selvagens ameaçadas de extinção. Caso ocorra morte de uma fêmea, seus ovários podem ser retirados e submetidos à criopreservação (Telfer *et al.*, 2001). Além disso, bancos de germoplasma podem ser criados com fins comerciais, melhorando as negociações para animais de alto valor zootécnico (Eroglu, 2010). Outra possibilidade de atuação da criobiologia está na preservação da fertilidade de mulheres com câncer, através da conservação do tecido ovariano, visto que os fármacos utilizados no tratamento quimioterápico são tóxicos às gônadas (Lee *et al.*, 2001). Antes de se iniciar a quimioterapia, os fragmentos ovarianos podem ser removidos e congelados, após o tratamento bem sucedido da enfermidade, as fatias do tecido podem ser descongeladas e retransplantadas na paciente (Sankai *et al.*, 2010).

É sabido que os tipos de danos causados pela criopreservação variam de acordo com os estágios de maturação do ovócito. Ovócitos maduros, obtidos a partir de folículos antrais, apresentam menor tolerância à criopreservação quando comparados à resistência de ovócitos oriundos de folículos primordiais (Luvoni, 2006).

Ao contrário dos ovócitos maduros, os folículos primordiais estão em estado de quiescência e a divisão celular está interrompida, por isso, apresentam maior resistência à criopreservação (Beckers *et al.*, 1996). Além disso, fatores como, taxa metabólica mais baixa, ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais, pequena quantidade de gotículas lipídicas dentro do citoplasma e um tamanho menor que o do ovócito maduro favorecem a criopreservação das células germinativas inclusas em FPA (Gosden *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 2000).

Os grânulos corticais são organelas responsáveis pelo bloqueio da poliespermia, cujo conteúdo, quando liberado, causa alterações nas glicoproteínas da zona pelúcida enrijecendo-a (Cran *et al.*, 1990). Entretanto, outros fatores, tais como alterações de permeabilidade e mudanças nas propriedades da membrana ovocitária também provocam a exocitose do conteúdo dessas organelas (Zeron *et al.*, 1999). Alterações como estas são comuns na criopreservação. Fatores como a toxicidade das soluções crioprotetoras ou o choque osmótico podem danificar a membrana, provocando a exocitose dos grânulos corticais (Inagaki *et al.*, 1996; Wusteman *et al.*, 2002). Segundo Ghetler *et al.* (2006), a simples exposição aos crioprotetores já provoca a liberação de grande parte do conteúdo dessas organelas. Além disso, a criopreservação de ovócitos maduros pode alterar características da zona pelúcida, a organização do fuso meiótico de microtúbulos e provocar aberrações cromossômicas (Gupta *et al.*, 2007).

Especialmente em suínos, ovócitos maduros apresentam grandes quantidades de lipídeo dentro do citoplasma. Essas gotículas juntam-se com mitocôndrias, membranas, grânulos corticais e também a componentes básicos do citoesqueleto: os microtúbulos e microfilamentos (Zhou e Li, 2009). Luvoni (2006) explica que as gotículas lipídicas são responsáveis pela formação irregular do gelo dentro da célula. Por esse motivo, a presença de grandes quantidades de lipídeo dentro do citoplasma pode afetar os processos de congelamento e descongelamento.

Além dos lipídeos intracelulares, há também os de composição das membranas, os quais contribuem nas diferenças de sensibilidade ao frio entre as espécies animais (McEvoy *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2001). Em suínos, esses obstáculos limitam a eficiência da criopreservação, pois resultam em danos significativos durante os processos de resfriamento e aquecimento (Zhou e Li, 2009). Estudos recentes têm alcançado certo grau de sucesso com vitrificação de ovócitos após remoção dos lipídeos intracelulares. Entretanto, esses lipídeos intracitoplasmáticos constituem fontes de energia do ovócito e material importante para a constituição das membranas do futuro embrião (Isachenko *et al.*, 1998).

Outra característica que torna os ovócitos imaturos mais resistentes aos danos causados pelo congelamento é que essas células possuem cromatina descondensada e não apresentam fuso meiótico, visto que estão na prófase I da meiose. Já os ovócitos maduros encontram-se no estágio de metáfase II, portanto seus cromossomos não estão protegidos por um envelope nuclear (Luvoni, 2006). Além disso, as proteínas do fuso meiótico são sensíveis à temperatura, e se despolimerizam quando submetidas ao frio (Shaw *et al.*, 2000).

2.3. Crioprotetores

Para que as células possam ser armazenadas no N₂ líquido a -196 °C, possíveis danos durante o processo de criopreservação precisam ser evitados. Para isso são utilizadas substâncias crioprotetoras que podem penetrar ou não, através da membrana plasmática, evitando a formação de cristais de gelo dentro da célula (Cabodevila e Teruel, 2001). No grupo dos crioprotetores penetrantes se encontram o glicerol (GLY), o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol (PROH) e o etileno glicol (EG). Entre os não penetrantes encontram-se sacarídeos, tais como a trealose, a glicose e macromoléculas como a polivinilpirrolidona e o hialuronato de sódio (England, 1993).

Os crioprotetores penetrantes, por serem moléculas pequenas atravessam as membranas celulares e formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água presentes no citosol. Com isso, o ponto de congelamento da água diminui e há menor probabilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula (Shaw *et al.*, 2000; Pereira e Marques, 2008). Já os crioprotetores não-penetrantes como a sacarose e a polivinilpirrolidona não atravessam as membranas. Por serem moléculas grandes permanecem no meio extracelular e atraem a água para fora da célula, causando assim a desidratação da mesma (Pereira e Marques, 2008). Desse modo, evitam a formação de cristais de gelo ao retirar água do interior do ovócito, bem como o protegem através da estabilização da membrana celular (Reichenbach *et al.*, 2002).

2.4. Técnicas de Criopreservação

Duas técnicas básicas regem atualmente o campo da criopreservação: o congelamento lento e a vitrificação. No congelamento lento, a temperatura é reduzida gradativamente e a água do meio extracelular se cristaliza, o que aumenta a concentração de solutos fora da célula e atrai a água do meio intracelular (Leibo, 1977). Já na vitrificação ocorre um resfriamento ultra-rápido da solução e a subsequente formação de um estado vítreo dentro e fora da célula (Santos *et al.*, 2010). De uma forma simplista, o congelamento lento é um método, no qual, baixas taxas de resfriamento e baixas concentrações de crioprotetores são usadas, enquanto a vitrificação utiliza altas taxas de resfriamento e altas concentrações de crioprotetores (Saragusty e Arav, 2011).

2.4.1. Congelamento Lento

No congelamento lento, geralmente, utiliza-se crioprotetores penetrantes como o DMSO, o EG e o PROH. As concentrações usadas normalmente são baixas, variando entre 1,0 e 1,5 M e, em geral, os crioprotetores são adicionados a um meio básico, por exemplo, meios de cultura (Saragusty e Arav, 2011). De acordo com Mazur (1984) a concentração do soluto extracelular está diretamente relacionada com o equilíbrio osmótico determinando a velocidade com que a água sai da célula. Desse modo, como as concentrações dos crioprotetores são baixas a saída de água ocorre lentamente.

Durante esse procedimento, o tecido é resfriado, em média, 2 °C por minuto até alcançar uma temperatura entre - 4 e - 9 °C, faixa térmica na qual o material é mantido por um período entre 10 a 15 minutos para que o mesmo alcance uma estabilidade térmica, nesse momento realiza-se a indução manual da cristalização, ou *seeding* (Jondet *et al.*, 1984). Esse procedimento é realizado tocando-se o criotubo com ponta de uma pinça envolta com algodão e embebida em nitrogênio líquido (Figura 3). A indução da cristalização é de extrema importância para evitar danos como o resfriamento excessivo e a desidratação celular intensa (Santos, 2007).

Após o *seeding*, a redução da temperatura continua lentamente, a uma velocidade de - 0,3 °C por minuto, de tal maneira que a água seja removida osmoticamente em quantidade suficiente para evitar um resfriamento elevado. Assim, o congelamento intracelular ocorre, entre -30 e -80 °C, sem que haja formação excessiva de cristais de gelo dentro da célula e a amostra pode então ser armazenada em N₂ líquido (Mazur *et al.*, 1984).

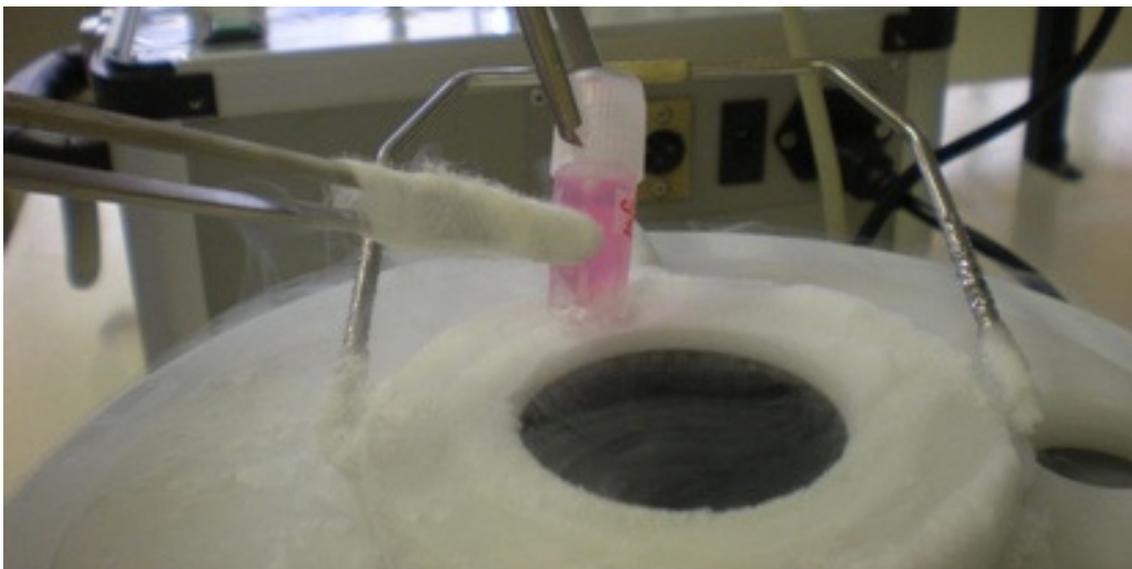


Figura 3. Indução manual da cristalização (*seeding*). FONTE: Arquivo pessoal.

Uma vez no N₂ líquido o material biológico pode ser armazenado por um longo período antes de ser descongelado. Durante o descongelamento a remoção do crioprotetor é feita gradativamente, a partir de banhos sucessivos em soluções contendo menores concentrações de crioprotetores. Esses banhos consecutivos possibilitam a saída controlada dos compostos anticongelantes através da membrana. Além disso, é possível utilizar crioprotetores não permeáveis para equilibrar não apenas a saída dos crioprotetores permeáveis, mas também a entrada de água dentro da célula. Desta forma, evita-se a turgência celular, pois o choque osmótico que poderia ocorrer devido ao rápido influxo de água e a saída do crioprotetor é contido (Luvoni, 2006).

2.4.2. Vitrificação

Em 1985 Rall e Fahy apontaram a vitrificação como uma alternativa ao congelamento lento. Essa técnica baseia-se no uso de soluções aquosas contendo altas concentrações de crioprotetores. A alta concentração do agente crioprotetor aumenta a viscosidade do meio e as células apresentam algumas características semelhantes ao estado líquido e outras próprias de um sólido cristalino (Yamaki *et al.*, 2002). Desse modo a probabilidade de formação de cristais de gelo até determinado ponto, pode ser diminuída com o aumento da viscosidade e redução do volume da solução (Saragusty e Arav, 2011). A concentração dos crioprotetores encontra-se entre 4 e 6 mol/L e o período de tempo no qual a célula é exposta à solução crioprotetora é rápido, variando entre 25 segundos a 5 minutos (Rall e Fahy, 1985).

Para se alcançar um bom procedimento de vitrificação, três propriedades precisam ser consideradas: a primeira é a taxa de resfriamento, a qual é obtida com o uso do N₂ líquido, resultando em queda da temperatura de centenas para dezenas de milhares de graus Celsius por minuto; a segunda particularidade trata-se da viscosidade do meio, a qual é definida pela alta concentração de crioprotetores usada no processo. Quanto maior a concentração de crioprotetores, maior será a temperatura de transição para o estado vítreo, diminuindo assim a chance de cristalização da água e a formação de gelo. O terceiro fator a ser considerado é o volume: pequenos volumes permitem uma melhor transferência de calor, aumentando a taxa de resfriamento (Saragusty e Arav, 2011).

Com o objetivo de diminuir os efeitos tóxicos da vitrificação, várias técnicas têm sido desenvolvidas para reduzir o volume e podem ser divididas em duas categorias: técnicas de tubulação e técnicas de superfície (Figura 4). Os sistemas de tubulação possuem altas taxas de resfriamento e são mais fáceis de manusear que os de superfície (Saragusty e Arav, 2011). As principais técnicas de tubulação aplicadas constituem: a vitrificação com o uso de palhetas abertas, método denominado open pulled straw (OPS) (Vajta *et al.*, 1997, 1998), a vitrificação pela técnica que utiliza palhetas fechadas, denominada closed pulled straw (CPS) (Chen *et al.*, 2001) e o uso de palhetas superfinais, também chamadas *superfine OPS* (Isachenko *et al.*, 2003).

Nas técnicas de superfície, as taxas de resfriamento são ainda mais altas que os índices alcançados nos sistemas de tubulação, visto que, durante a criopreservação, o material fica diretamente exposto à superfície resfriada e esta se encontra em contato direto com N₂ líquido. As técnicas de superfície mais empregadas incluem o uso de

telas de microscopia eletrônica (Steponkus *et al.*, 1990; Martino *et al.*, 1996), cryotop (Hamawaki *et al.*, 1999; Kuwayama e Kato 2000), cryoloop (Lane *et al.*, 1999) e vitrificação em superfície sólida (Dinnyés *et al.*, 2000).

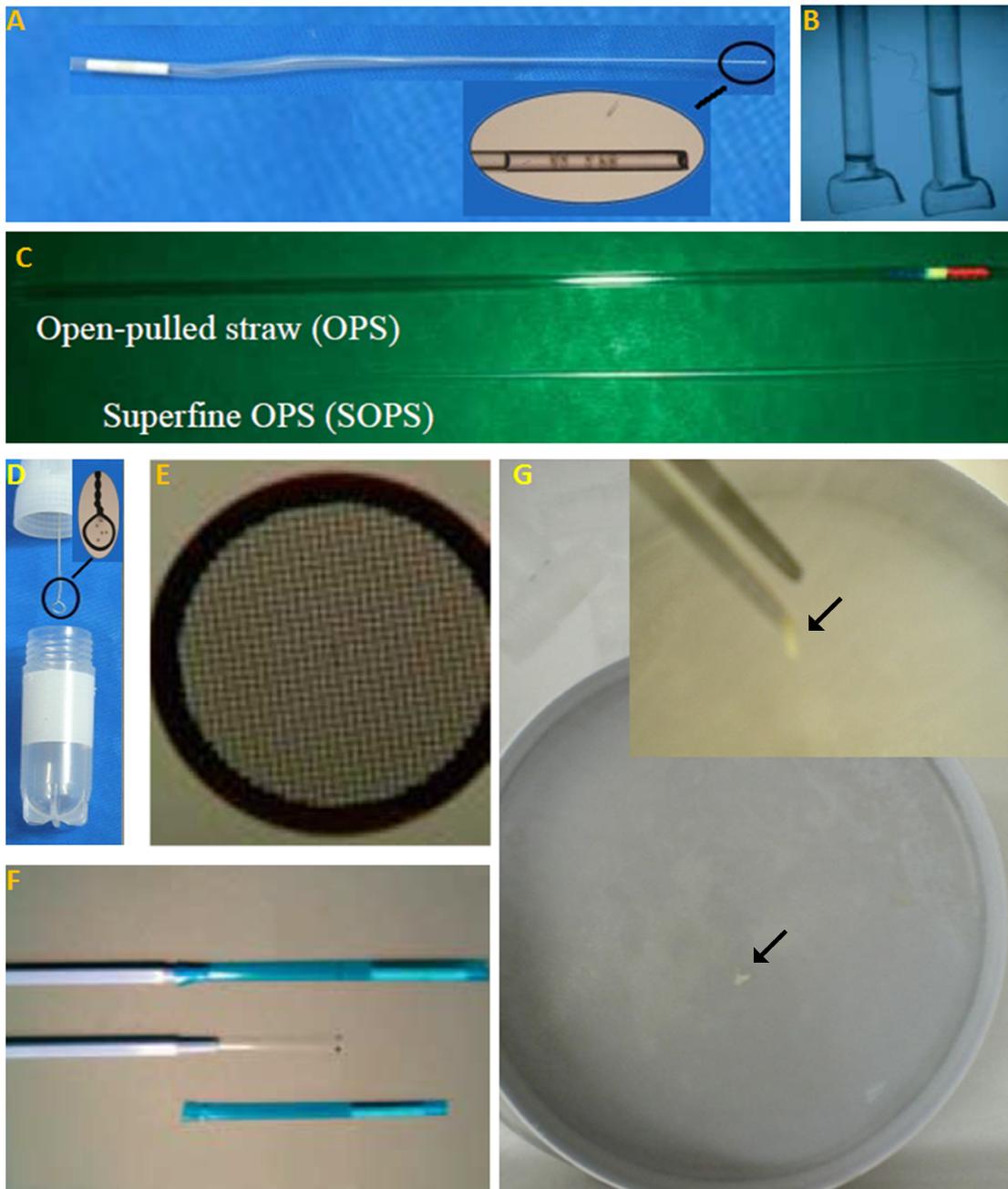


Figura 4. Sistemas de redução do volume na técnica de vitrificação. (A) OPS, (B) CPS, (C) superfine OPS, (D) cryoloop, (E) telas de microscopia eletrônica, (F) cryotop, (G) vitrificação em superfície sólida. FONTE: Adaptada de Rao *et al.*, (2012); Saragusty e Arav., (2011) e Arquivo pessoal.

Assim como no congelamento lento, após ter sido vitrificado e armazenado em N₂ líquido, o material pode voltar à temperatura fisiológica pelo processo de reaquecimento. Durante essa etapa, o material passa por vários banhos em soluções de reaquecimento, as quais são normalmente constituídas por um meio de cultivo, soro fetal bovino (SFB), concentrações decrescentes de crioprotetores penetrantes e também por crioprotetores não penetrantes. No processo de reaquecimento de amostras vitrificadas por técnicas de superfície, a amostra é colocada em contato direto com a solução de aquecimento, o que garante eficiência nas trocas de calor (Saragusty e Arav, 2011).

2.4.3. Congelamento Lento x Vitrificação

A técnica de criopreservação a ser aplicada (congelamento lento ou vitrificação) influencia no aparecimento das injúrias provocadas nas células (Santos *et al.*, 2010). No processo de vitrificação, a redução brusca da temperatura proporciona a passagem do estado líquido para o estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo (Rubinsky, 2003). Já no congelamento lento, a baixa concentração de crioprotetores usada não é eficiente para impedir a formação desses cristais (Arav *et al.*, 2002). Por outro lado, as desvantagens da vitrificação se relacionam à necessidade da adoção de altas concentrações de crioprotetores para o procedimento, o que aumenta o risco de injúrias tóxicas e osmóticas em comparação com o congelamento lento (Kuwayama *et al.*, 2005).

Outro inconveniente no uso do congelamento lento é a necessidade de um freezer programável de alto custo para a realização da técnica, o que dificulta sua

aplicação a campo (Santos *et al.*, 2010). A vitrificação não exige equipamentos específicos, entretanto, para maioria das amostras vitrificadas, faz-se necessário o uso de ferramentas especiais que permitam a velocidade de resfriamento elevada, como a OPS, a *cryotop* e a *cryoloop* (Kuwayama *et al.*, 2005).

2.5. Avanços na Criopreservação de FPA

A criopreservação de FPA tem sido muito estudada nos últimos anos. Na busca por melhores resultados, as técnicas são empregadas em diversas espécies e utilizam como fonte folículos isolados, córtex ovariano, hemi-ovários ou ovários inteiros (Santos *et al.*, 2010).

Os principais estudos aplicando a técnica de congelamento lento de FPA em tecido ovariano, foram feitos em camundongas (Kagawa, 2007), ovelhas (Salle *et al.*, 2002; Arav *et al.*, 2005), cabras (Santos *et al.*, 2009), coelhas (Chen *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2008) vacas (Lucci *et al.*, 2004; Gandolfi *et al.*, 2006) e porcas (Gandolfi *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2009).

Salle *et al.* (2002) submeteram hemi-ovários de ovelhas ao congelamento lento e, após o auto-transplante, obtiveram gestações e nascidos vivos como resultado a longo prazo. Outro estudo, também em ovelhas, aplicou o congelamento lento em ovários inteiros e, após a realização do autotransplante, foram identificados níveis de progesterona no sangue, indicando o retorno da atividade ovulatória (Arav *et al.*, 2005).

Em cabras, foram utilizadas fatias do córtex como fonte de folículos pré-antrais e, após o congelamento e descongelamento do tecido com posterior transplante nesses animais, constatou-se completo desenvolvimento folicular e recuperação da função ovariana (Santos *et al.*, 2009).

O tecido ovariano de coelhas foi criopreservado por congelamento lento e autotransplantado. Após três meses, ovócitos foram fertilizados e os embriões desenvolveram-se até a fase de blastocisto, comprovando a manutenção da função ovariana a longo prazo (Chao *et al.*, 2008).

Entretanto, para alguns autores, o transplante de fragmentos do córtex ovariano criopreservado pode ocasionar isquemia tecidual, visto que o processo de revascularização pode durar de dois a sete dias (Dissen *et al.*, 1994; Gosden *et al.*, 1994). Por esse motivo, o transplante do ovário intacto possibilitaria um imediato fornecimento de sangue, maximizando a sobrevivência do enxerto. Em coelhas, seguindo a criopreservação por congelamento lento, ovários inteiros foram auto-transplantados e, uma semana após o enxerto, os resultados mostraram restauração da função ovariana, sugerindo que a isquemia pode ser evitada com o uso dessa técnica (Chen *et al.*, 2006).

Em bovinos, Lucci *et al.* (2004) avaliaram os efeitos de quatro crioprotetores na preservação de folículos pré-antrais submetidos ao congelamento lento. Análises por microscopia de luz (ML) mostraram que o tecido ovariano congelado com DMSO, PROH ou com 10% GLI apresentou uma alta porcentagem de folículos morfolologicamente normais (FMN). Já as avaliações da ultraestrutura, através de microscopia eletrônica (MET), revelaram danos celulares no tecido criopreservado com GLI 10%.

Em suínos, Borges *et al.* (2009) testaram o efeito de diferentes crioprotetores no congelamento lento de tecido ovariano. Análises por histologia e MET revelaram que as maiores porcentagens de FMN foram encontradas nos tecidos criopreservados com DMSO 1,5M (81,8 %) ou com EG 1,5M (67,0 %). Imhof *et al.* (2004) testaram, na mesma espécie, o congelamento de ovários inteiros utilizando DMSO a 1,5M e, com base em análises histológicas e ultraestruturais, alcançaram altas taxas de folículos viáveis (84,4%).

Experimentos com vitrificação de FPA foram feitos em ratas (Salehnia *et al.*, 2002), ovelhas (Al-aghbari e Menino 2002; Bordes *et al.*, 2005), vacas (Gandolfi *et al.*, 2006; Kagawa *et al.*, 2009), macacas (Yeoman *et al.*, 2005), cadelas (Ishijima *et al.*, 2006), gatas (Galiguis *et al.*, 2012) e porcas (Gandolfi *et al.*, 2006) e humanos (Kagawa *et al.*, 2009).

A vitrificação de tecido ovariano foi testada em cadelas e a funcionalidade dos ovários foi mensurada, após vitrificação e reaquecimento, através de transplante em camundongos SCID e de análises histológicas do tecido vitrificado. Histologicamente, todos os ovários criopreservados apresentavam-se normais e, após quatro semanas da operação, o tecido ovariano transplantado estava fortemente aderido aos ovários dos camundongos. Houve multiplicação de células da granulosa, confirmada por reação de antígeno imunorreativo a proliferação celular (Ishijima *et al.*, 2006).

Em bovinos, Kagawa *et al.* (2009) testaram a vitrificação do córtex ovariano e verificaram que a função hormonal foi restaurada após o transplante. Ovários inteiros e seus pedículos constituem outra possibilidade de vitrificação, e foi testada em ovelhas por Courbière *et al.* (2005). Nesse estudo não foram encontradas diferenças

significativas entre folículos antes e após a vitrificação. De acordo com Bordes *et al.* (2005), a vitrificação de hemi-ovários em ovelhas gera resultados tão bons quanto outros de congelamento lento seguido de transplante. Entretanto, em outras espécies, existem poucos estudos que possibilitem a comparação entre os métodos de congelamento lento e vitrificação a fim de se determinar qual é o mais eficiente para a espécie em questão.

Moniruzzaman *et al.* (2009) realizaram vitrificação de FPA inclusos em tecido ovariano de suínos neonatos utilizando três diferentes soluções de vitrificação contendo EG e DMSO como crioprotetores e concentrações distintas de sacarose (0 M, 0,25 M e 0,5 M). Após transplante do tecido criopreservado a análise histológica revelou porcentagens de FPA relativamente baixas (entre 50% e 71%), para qualquer das soluções testadas.

Gandolfi *et al.* (2006) avaliaram a eficiência do congelamento lento e da vitrificação na criopreservação de tecido ovariano de suínos, bovinos e humanos. A morfologia dos FPA foi comparada entre o tecido fresco e o criopreservado. Fragmentos submetidos ao congelamento lento apresentaram resultados favoráveis. Entretanto, a análise dos procedimentos de vitrificação testados revelou danos extensivos aos folículos, para qualquer das três espécies estudadas. No primeiro procedimento de vitrificação aplicado por Gandolfi *et al.* (2006) a quantidade FMN no tecido fresco foi de 81,6% e no tecido vitrificado foi de 17,2%. Este método foi extraído do protocolo de Al-aghbari e Menino (2002), o qual foi desenvolvido para tecido ovariano de ovelhas. Sabe-se que um protocolo de vitrificação elaborado para uma

determinada espécie pode apresentar resultados diferentes quando aplicado em outra (Dinnyés *et al.*, 2000; Begin *et al.*, 2003).

O segundo protocolo de vitrificação utilizado por Gandolfi *et al.*, (2006) teve resultados ainda piores, apresentando 100% dos folículos com algum grau de degeneração. Esse protocolo de vitrificação foi adaptado de Silvestre *et al.* (2002), o qual utiliza amostras de pele de suínos como material biológico, e não o tecido ovariano dessa espécie. Uma das possibilidades para a baixa eficiência nesse método pode ter sido a diferença entre os tipos celulares estudados. Além disso, nos procedimentos realizados por Gandolfi *et al.*, (2006) o tecido foi vitrificado com palhetas. De acordo com Saragusty e Arav (2011), quanto menor o volume de crioprotetor ao qual o material biológico está submetido, maior a taxa de resfriamento e menos efeitos tóxicos serão observados nas células. Assim, a vitrificação em superfície sólida poderia ser uma alternativa.

Considerando a importância de se desenvolver um protocolo para cada espécie e para o mesmo tipo celular, é necessário que outros métodos sejam investigados. A análise entre dois protocolos de vitrificação: um deles desenvolvido para o mesmo tipo celular (tecido ovariano), entretanto, para outra espécie (cadelas) e o outro método elaborado para a mesma espécie (porcas), porém, para outro tipo celular (ovócitos); somada à comparação com os resultados do congelamento lento, pode ajudar a definir qual é a melhor técnica a ser aplicada na preservação de folículos pré-antrais de suínos.

3. JUSTIFICATIVA

A criopreservação de ovócitos maduros suínos apresenta diversos problemas, visto que essas células possuem grande quantidade de lipídeos e baixa resistência ao frio. Entretanto, muitos desses problemas podem ser contornados pela aplicação da técnica em folículos pré-antrais. Como descrito anteriormente, ovócitos inclusos em FPA são mais resistentes a crioinjúrias, pois possuem baixo metabolismo e pouca quantidade de lipídeos. Além disso, nessa fase do desenvolvimento eles não apresentam fuso meiótico ou zona pelúcida. Outra vantagem do uso de ovócitos imaturos para a criopreservação é que no córtex ovariano existem milhões de folículos primordiais, os quais podem ser coletados em qualquer período da vida da fêmea, independente de sua idade ou da fase do ciclo estral em que esteja.

Estudos com populações de suídeos silvestres da família Tayassuidae traçaram um quadro grave, com ocorrência de extinção regional e espécies criticamente ameaçadas nos biomas Caatinga e Mata Atlântica (ICMBio, 2010). Esses animais, conhecidos como porcos do mato, entre eles o cateto (*Tayassu tajacu*), o queixada (*Tayassu pecari*) e o taguá (*Catagonus wagneri*), pertencem à mesma subordem que os suínos domésticos; Suiformes. Por esse motivo, suínos e porcos silvestres da família Tayassuidae, apresentam muitas semelhanças entre si, e justamente devido a essas afinidades, o desenvolvimento de protocolos para a criopreservação do tecido ovariano de suínos pode também beneficiar suídeos silvestres (Sowls, 1997).

Considerando a importância da conservação de raças suínas nativas, tais como Piau, Nilo e Casco de mula, para a sustentabilidade da suinocultura no Brasil, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de preservação do material genético

desses animais. Sendo assim, a comparação entre duas formas de criopreservação (congelamento lento e vitrificação) poderá definir qual o melhor método a ser empregado para a preservação de células germinativas em suínos.

Apesar de Gandolfi *et al.* (2006) e Moniruzzaman *et al.* (2009) terem avaliado a eficiência da vitrificação na preservação de FPA suínos, os resultados encontrados mostraram danos relativamente altos ou extensivos aos folículos. Nesse sentido, estudos devem ser conduzidos visando o aprimoramento dessa técnica para a preservação do tecido ovariano de suínos, pois novos resultados podem ser encontrados. Por esse motivo, a comparação entre métodos de criopreservação é de extrema importância para definir qual é o melhor sistema a ser aplicado na preservação de folículos pré-antrais dessa espécie.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito das técnicas de vitrificação e congelamento lento na morfologia de FPA em tecido ovariano de suínos.

4.2. Objetivos Específicos

- Testar dois métodos de vitrificação do tecido ovariano de suínos sobre os FPA;
- Comparar os dois métodos de vitrificação com um método pré-estabelecido de congelamento lento de FPA em tecido ovariano de suínos;
- Quantificar os FMN presentes no tecido ovariano criopreservado pelos diferentes métodos;
- Avaliar a ultraestrutura de FPA em tecido ovariano suíno criopreservado pelos diferentes métodos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta e Preservação do Tecido Ovariano

Doze ovários foram obtidos em um abatedouro local a partir de 12 leitões pré-púberes diferentes com idade entre cinco e nove meses. Os órgãos foram transportados ao laboratório em solução salina (0,9%) a aproximadamente 37 °C, em garrafa térmica até uma hora após o abate. Em seguida, os órgãos foram lavados com etanol 70% e enxaguados em tampão fosfato. De cada ovário foram retiradas quatro fatias de córtex com, aproximadamente, 5 x 1 x 1mm de comprimento, largura e espessura respectivamente. Uma fatia de cada ovário foi escolhida aleatoriamente para ser o controle, da qual outro pequeno fragmento (1mm³) foi retirado e imediatamente fixado para MET e fragmento restante, fixado para posterior avaliação por ML. As outras 3 fatias foram designadas ao acaso para cada um dos tratamentos aplicados (Congelamento Lento, vitrificação 1 e vitrificação 2). A representação esquemática do delineamento experimental pode ser vista na figura 3.

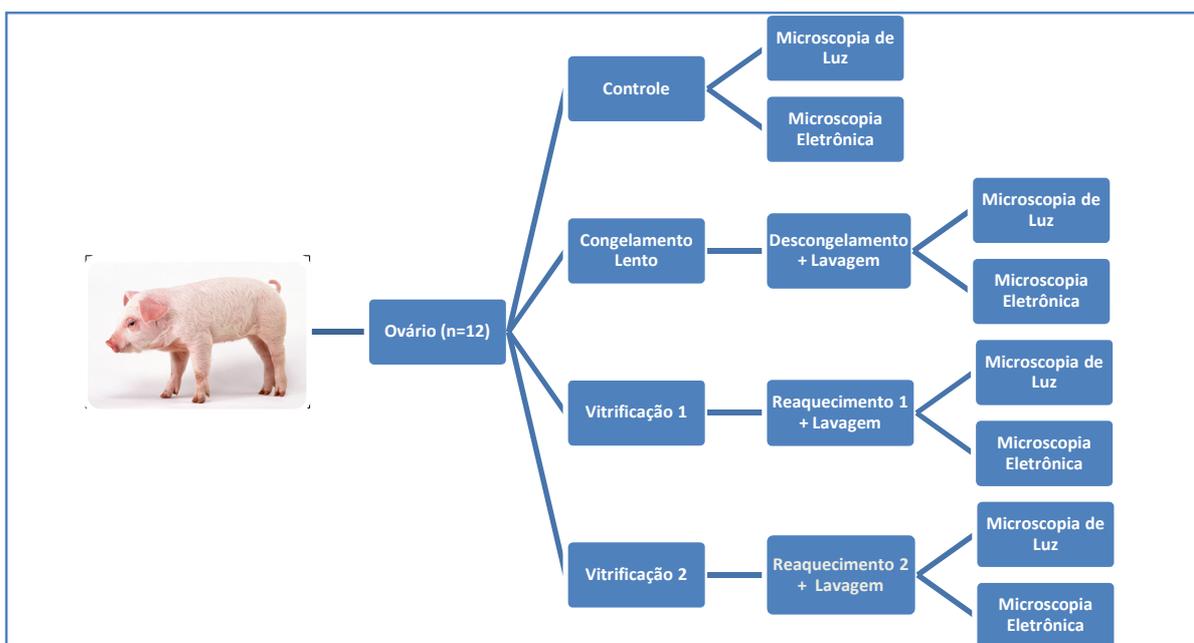


Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental.

5.2. Procedimentos de Criopreservação

Foram testados três procedimentos de criopreservação, sendo um de congelamento lento e dois de vitrificação. Um dos métodos de vitrificação testado, vitrificação1 (V₁), foi fundamentado em um protocolo descrito para tecido ovariano, entretanto, desenvolvido para outra espécie (cadelas – Ishijima *et al.*, 2006). O outro protocolo, vitrificação2 (V₂), foi baseado em um método descrito para ovócitos, desenvolvido para a mesma espécie (porcas - Gupta *et al.*, 2007).

Ao final de cada procedimento, após a retirada do crioprotetor, o material foi lavado em PBS e uma pequena amostra de cada fragmento foi retirada e destinada à MET. O restante do material foi designado à análise por ML.

5.2.1. Congelamento Lento e Descongelamento do Tecido Ovariano

O tecido ovariano O tecido ovariano foi congelado de acordo com o método descrito para suínos por Borges *et al.* (2009) modificando-se apenas o meio base. Em resumo, cada amostra do tecido ovariano foi colocada em criotubos de 1,2ml contendo 1,0ml de solução crioprotetora e congelada usando um freezer programável (Dominium K, Biocom, Brazil). A solução crioprotetora para o congelamento foi preparada em Meio Essencial Mínimo suplementado com 20% SFB (MEM⁺) e adicionado de EG a 1,5 M e 0,4% de sacarose. Os criotubos foram equilibrados, durante 20 minutos, a 10 °C e, em seguida, resfriados até -7 °C a 1 °C/min. Os fragmentos foram mantidos nessa temperatura por 10 min, período no qual foi realizada a indução manual da cristalização (*seeding*). Após o *seeding*, as amostras

foram resfriadas a 0,3 °C/min até -30 °C e mergulhadas diretamente em N₂ líquido, permanecendo armazenadas por pelo menos sete dias a -196 °C (Figura 4).

Os fragmentos de tecido ovariano foram descongelados a partir do aquecimento dos criotubos em temperatura ambiente durante 10 segundos e imersos em água a 37 °C até o derretimento do gelo. O crioprotetor foi removido através da lavagem das amostras por três vezes, durante 5 minutos cada. Os fragmentos foram lavados três vezes em uma solução de MEM⁺ com 0,4% de sacarose e concentrações decrescentes de EG (½ e ¼ de 1,5 M e 0 M).

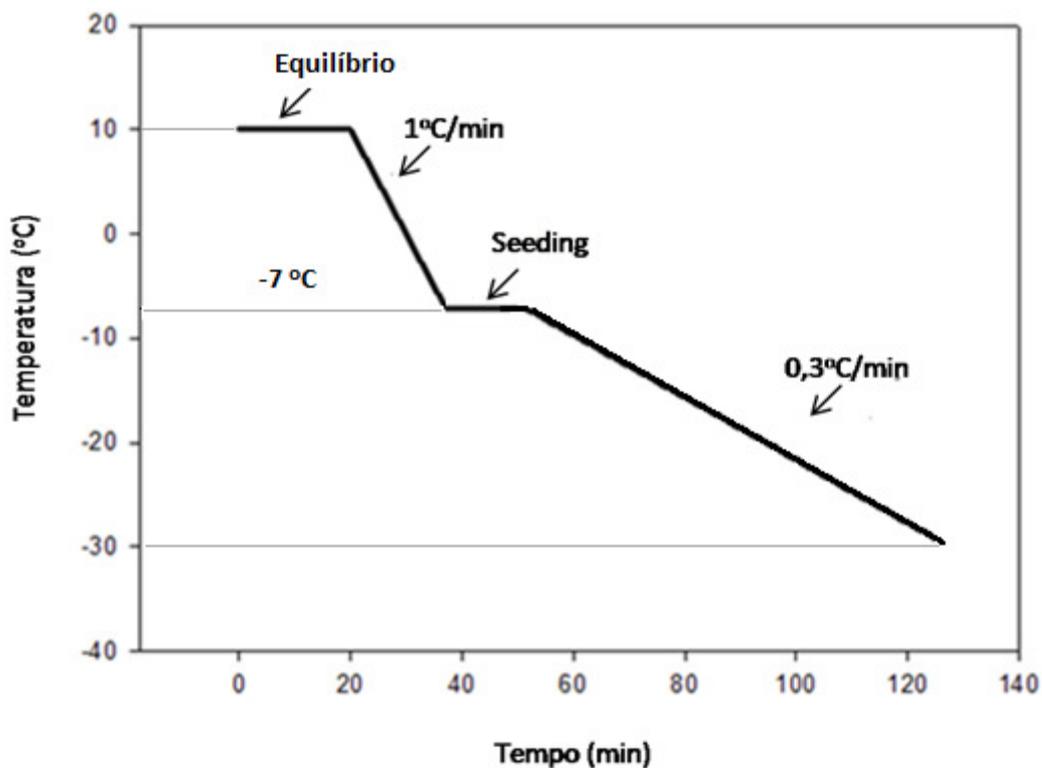


Figura 6. Curva de Congelamento Lento utilizada.

5.2.2. Vitrificação e Reaquecimento do Tecido Ovariano

- Procedimento 1

O método V₁ foi realizado com base na técnica proposta por Ishijima *et al.* (2006) com algumas modificações. Para a vitrificação foram utilizadas duas soluções, sendo a solução de equilíbrio (SE) composta por DMSO 1,0 M em MEM⁺, e a solução de vitrificação (SV) composta por DMSO 2,0 M + Acetamida 1,0 M + Propanodiol 3,0 M em MEM⁺. Inicialmente os fragmentos foram mantidos na SE por 5 minutos e depois na SV, por mais cinco minutos, sempre a 0 °C. O procedimento de vitrificação foi realizado em superfície sólida, processo no qual o tecido ovariano é congelado devido ao contato direto com uma superfície de aço inoxidável parcialmente submersa em N₂ líquido. Em seguida, as amostras de córtex foram acondicionadas em criotubos previamente resfriados em N₂ líquido. Por fim, os criotubos foram então mergulhados nessa substância a -196 °C, e mantidos armazenados por no mínimo uma semana.

Para o reaquecimento, os criotubos contendo os fragmentos ovarianos foram expostos à temperatura ambiente por 10 segundos e posteriormente, colocados em banho-maria a 37 °C. Ao mesmo tempo, foi adicionado ao criotubo 1,5 ml de uma solução de sacarose a 0,4% em MEM⁺ aquecida a 37 °C. As amostras foram mantidas assim por um período de cinco minutos. Para a remoção da solução crioprotetora, os fragmentos foram transferidos para uma solução aquecida de sacarose a 0,2% em MEM⁺, também por cinco minutos, e finalmente para outra solução contendo apenas MEM⁺, na qual permaneceu durante o mesmo intervalo de tempo.

- Procedimento 2

O protocolo utilizado para a V₂ fundamentou-se no método proposto por Gupta *et al.* (2007). Em resumo, o tecido ovariano foi exposto a uma solução de equilíbrio constituída por 4% EG (0,6 M) + 7% sacarose (0,2 M) em meio TCM 199 + 20% de SFB por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente o tecido foi colocado em uma SV constituída por TCM 199 + 20% de SFB suplementado com 35% EG (5,6 M), 5% polivinilpirrolidona (PVP 0,45 M) e 13,7% de sacarose (0,4 M), por cinco minutos a 37 °C. Em seguida, esse tecido foi vitrificado em superfície sólida e armazenado em N₂ líquido, da mesma forma como na V₁. As amostras foram mantidas armazenadas por, pelo menos, uma semana.

Para o reaquecimento do tecido vitrificado, os criotubos contendo os fragmentos ovarianos foram expostos à temperatura ambiente por 10 segundos. Posteriormente foi adicionado ao criotubo 1,5 ml de uma solução de meio TCM 199 suplementado com 20% de SFB e 10,3% de sacarose (0,3 M) a 37 °C por cinco minutos. Em seguida, os fragmentos foram lavados, três vezes durante 15 minutos (cinco minutos cada lavagem) em meio TCM 199 + 20% de SFB suplementado com ½, ¼ e 0 da concentração inicial de sacarose, respectivamente.

5.2.3. Avaliação por Microscopia de Luz

As amostras foram fixadas em solução de Carnoy por 1 h e posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol e embebidas em parafina. Foram seccionados cortes com 5µm de espessura, corados com

hematoxilina e eosina (HE) e examinados em microscópio de luz. Folículos primordiais (ovócito circundado por apenas uma camada de células da granulosa achatadas) e folículos em crescimento (ovócito circundado por uma ou mais camadas de células cuboidais, da granulosa circundando o ovócito) foram classificados de acordo com a qualidade apresentada em folículos morfologicamente normais (FMN) ou degenerados. A figura 7 expõe exemplos representativos de folículos primordiais e folículos em crescimento classificados como FMN. Os folículos foram classificados como degenerados quando apresentavam um ou mais dos seguintes aspectos: picnose do núcleo do ovócito, picnose da célula da granulosa, separação do folículo de seu estroma, retração do ovócito, ou ainda perda do contato entre o ovócito e as células da granulosa.

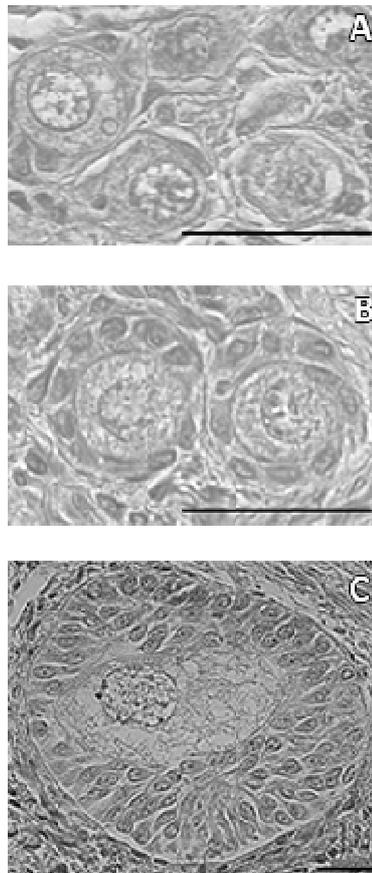


Figura 7. Micrografias representativas de folículos primordiais (A) e em crescimento (B e C) classificados como morfologicamente normais. Barra = 20 μ m. FONTE: Arquivo Pessoal.

5.2.4. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos do córtex ovariano foram fixados em solução de 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 3hs a temperatura ambiente. As fatias da cortical foram lavadas com solução de cacodilato de sódio (0,1 M) e pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio, 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida as amostras foram contrastadas com acetato de uranila, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e embebidas em resina Spurr. Cortes semi-finos (3 μ m) foram corados com Azul de Toluidina para identificação dos folículos em microscópio de luz. Secções ultrafinas (70 η m) foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011, Tokio, Japão). Foram avaliados apenas FPA dos melhores tratamentos e que se apresentaram morfológicamente normais nos cortes semi-finos. A partir dessa análise, foram determinadas as características do ovócito e das células da granulosa, de suas organelas e das membranas plasmática e nuclear.

5.3. Análise Estatística

As porcentagens de folículos totais, primordiais ou em crescimento, classificados como FMN ou como folículos degenerados, foram calculadas para o controle e cada tratamento. Os dados foram transformados para $\arcsen\sqrt{\quad}$ e submetidos à Análise de Variância utilizando-se o programa StatView para Windows (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). As médias foram comparadas entre os tratamentos pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação por Microscopia de Luz

Foram analisados 6657 folículos no total, sendo 2671 no controle, 1202 no CL, 1555 na V_1 e 1229 na V_2 . Os folículos foram classificados como primordiais ou em crescimento de acordo com a figura 8. Após a avaliação da morfologia dos folículos pré-antrais, a média da porcentagem de FMN foi calculada (Tabela 1) e comparada entre o controle e os tratamentos. Com relação aos folículos totais a porcentagem de FMN na V_1 foi estatisticamente igual ao controle, entretanto as porcentagens de FMN totais no CL e na V_2 foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) quando comparadas ao controle e a V_1 . A análise dos folículos primordiais revela que a porcentagem de FMN foi estatisticamente igual ao controle somente no procedimento V_1 ($P < 0,05$). O CL foi estatisticamente semelhante tanto a V_1 quanto a V_2 , e o procedimento V_2 foi inferior ao controle e a V_1 ($P < 0,05$). Com relação aos folículos em crescimento, no procedimento V_1 , a porcentagem de FMN foi igual ao controle à V_2 e ao CL, entretanto para a V_2 e o CL, essa porcentagem foi estatisticamente menor que o controle ($P < 0,05$).

O principal tipo de degeneração evidenciado em todos os tratamentos foi a picnose do núcleo do ovócito (Figura 8A), observada tanto em folículos primordiais quanto em folículos em crescimento. Além dessa alteração, verificou-se também a retração do citoplasma ovocitário (Figura 8B), porém apenas para a classe de folículos em crescimento do tratamento CL. Além disso, no tratamento V_2 , o tecido conjuntivo do estroma encontrava-se frouxo (Figuras 8C e 8D).

Tabela 1. Porcentagem (média \pm desvio padrão) de folículos pré-antrais morfologicamente normais em ovários frescos (Controle), congelados (Congelamento Lento) ou vitrificados (V₁ e V₂).

Folículos	Controle	V ₁	V ₂	Congelamento Lento
Primordiais	97,0 \pm 2,8 ^a	96,7 \pm 3,3 ^a	80,7 \pm 15,3 ^b	88,6 \pm 7,5 ^{ab}
Crescimento	97,5 \pm 3,9 ^a	93,4 \pm 7,5 ^{ab}	87,4 \pm 14,9 ^{ab}	80,8 \pm 18,8 ^b
TOTAL	97,1 \pm 2,6 ^a	96,1 \pm 3,0 ^a	81,1 \pm 14,8 ^b	86,7 \pm 7,3 ^b

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

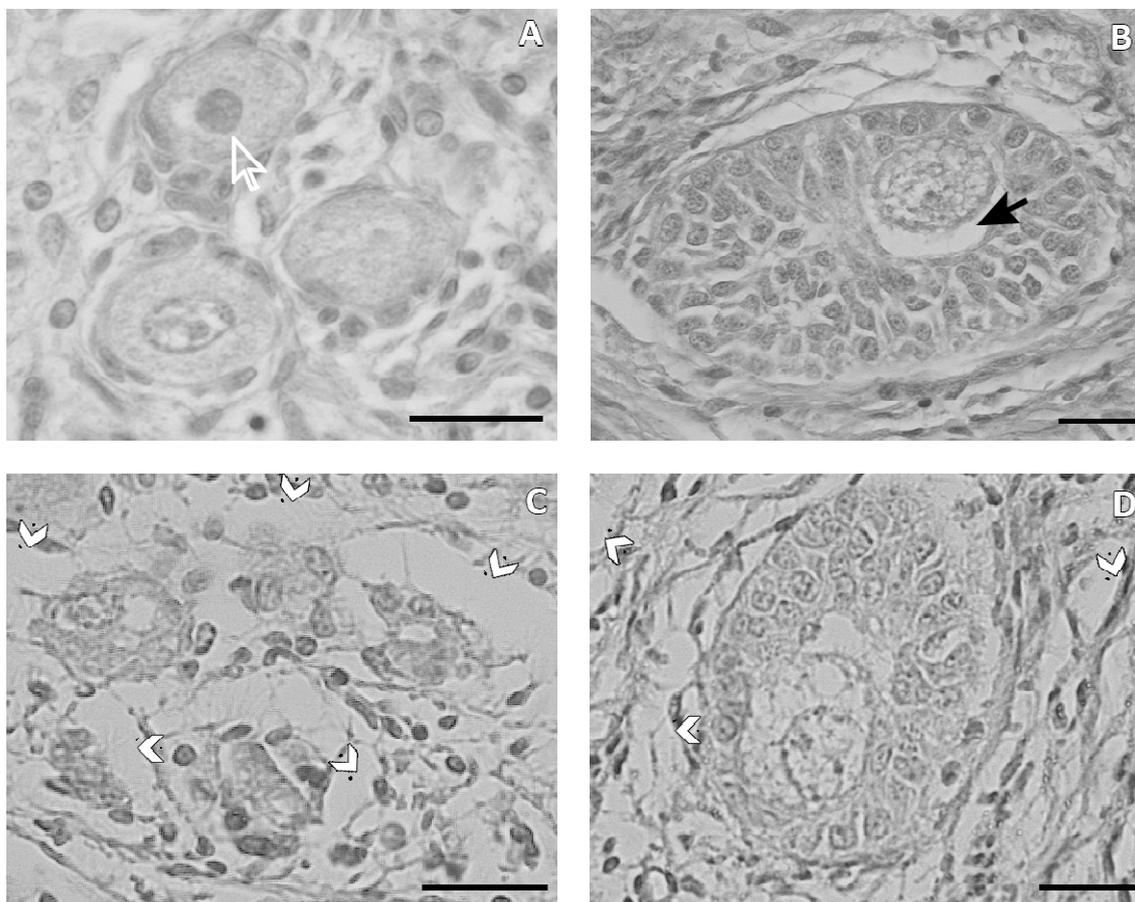


Figura 8. Micrografias representativas das degenerações nos folículos. (A) picnose do núcleo do ovócito (seta branca); (B) perda do contato entre o ovócito e as células da granulosa (seta preta); Alteração do estroma ovariano (cabeças de setas) ao redor de folículos primordiais (C) e em crescimento (D). Barras = 20 μ m.

6.2. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os folículos do grupo controle apresentavam ovócito esférico com citoplasma homogêneo e núcleo oval, em geral localizado centralmente e bem delimitado por um envelope nuclear. A cromatina encontrava-se descondensada e ocasionalmente foi possível observar o nucléolo. As organelas mais abundantes foram retículo endoplasmático e mitocôndrias. Estas se encontravam arredondadas e com cristas. Foram observadas algumas mitocôndrias alongadas e outras contendo grânulos elétron-densos ou vacúolos no seu interior. Também apareceram, com menor frequência, cisternas do complexo de Golgi localizadas bem próximo ao núcleo do ovócito, além de gotas lipídicas situadas normalmente em um dos pólos da célula e eventualmente envolvidas por retículo endoplasmático (Figura 9).

Em geral, no tratamento CL os folículos primordiais apresentaram ultraestrutura semelhante ao controle com o ovócito exibindo citoplasma homogêneo, núcleo envelopado, mitocôndrias eletrondensas e arredondadas, algumas destas encontravam-se alongadas e com grânulos elétron-densos em sua matriz. As organelas estavam distribuídas uniformemente pelo citoplasma. Também foram vistas gotas lipídicas e algumas destas estavam circundadas por retículo endoplasmático. Entre sete folículos de diferentes ovários avaliados para esse tratamento, excepcionalmente um deles apresentou mitocôndrias levemente inchadas. Os folículos em crescimento apresentavam-se semelhantes aos primordiais. As células da granulosa nesses folículos mantiveram-se bem preservadas e justapostas, com núcleos arredondados e alguns angulosos, além de retículo endoplasmático bem distribuído pelo citoplasma.

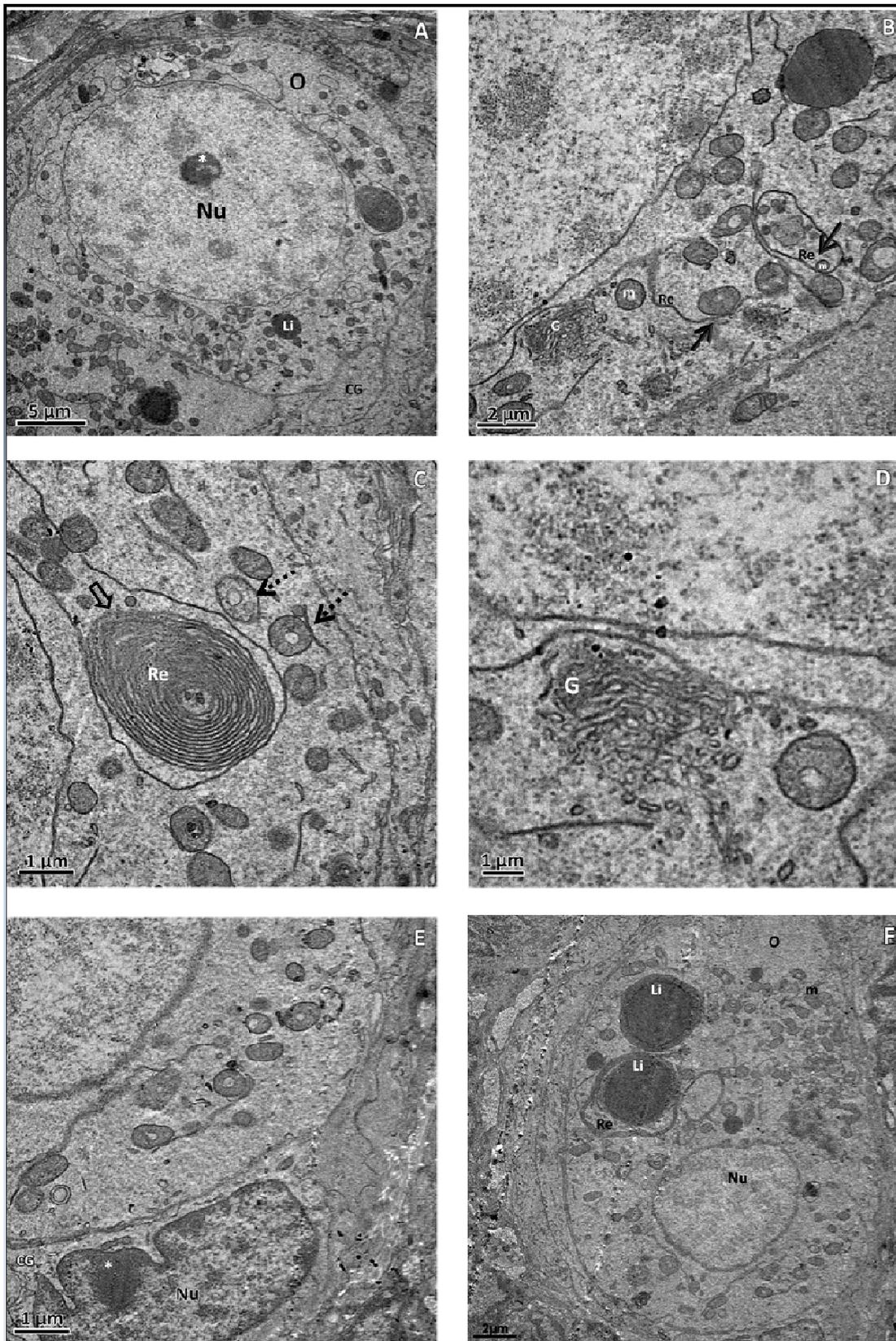


Figura 9. Micrografias em microscopia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais de porca do grupo controle. (A) Visão geral de folículo primordial. (B) Detalhe do citoplasma do ovócito mostrando a associação de mitocôndrias com o retículo endoplasmático (setas). (C) Mitocôndrias arredondadas, algumas contendo vacúolo (setas pontilhadas) e retículo endoplasmático em forma de anéis concêntricos (seta larga). (D) complexo de Golgi. (E) Célula da granulosa justaposta ao ovócito e núcleo ocupando quase toda extensão da mesma. (F) Ovócito de folículo primordial apresentando gotas lipídicas circundadas por retículo endoplasmático. CG: célula da granulosa, G: Golgi, Li: lipídeo, m: mitocôndria, Nu: núcleo, O: ovócito, Re: retículo endoplasmático*: nucléolo.

Nos fragmentos ovarianos vitrificados pelo método V_1 foi possível observar degenerações ultraestruturais, tanto do ovócito quanto das células da granulosa. Nos folículos primordiais o citoplasma ovocitário apresentou-se, em geral, ligeiramente granulado contendo estruturas semelhantes a vesículas rompidas e aglomerados de membranas soltas, indicando resíduos de organelas. Em alguns ovócitos, o citoplasma encontrava-se homogêneo na periferia da célula, mas com regiões sem organelas ao redor do núcleo. Nos folículos em crescimento foram encontrados muitos vacúolos no citoplasma do ovócito e mitocôndrias intumescidas com cristas degeneradas e matriz granulada. Entre seis folículos de diferentes ovários avaliados para esse tratamento, em cinco deles o núcleo encontrava-se envelopado, e em um ele se encontrava rompido. Nesses folículos, as células da granulosa encontravam-se desorganizadas, com espaços vazios entre elas e internamente o núcleo estava mal delimitado, com citoplasma degenerado e com mitocôndrias inchadas e sem cristas.

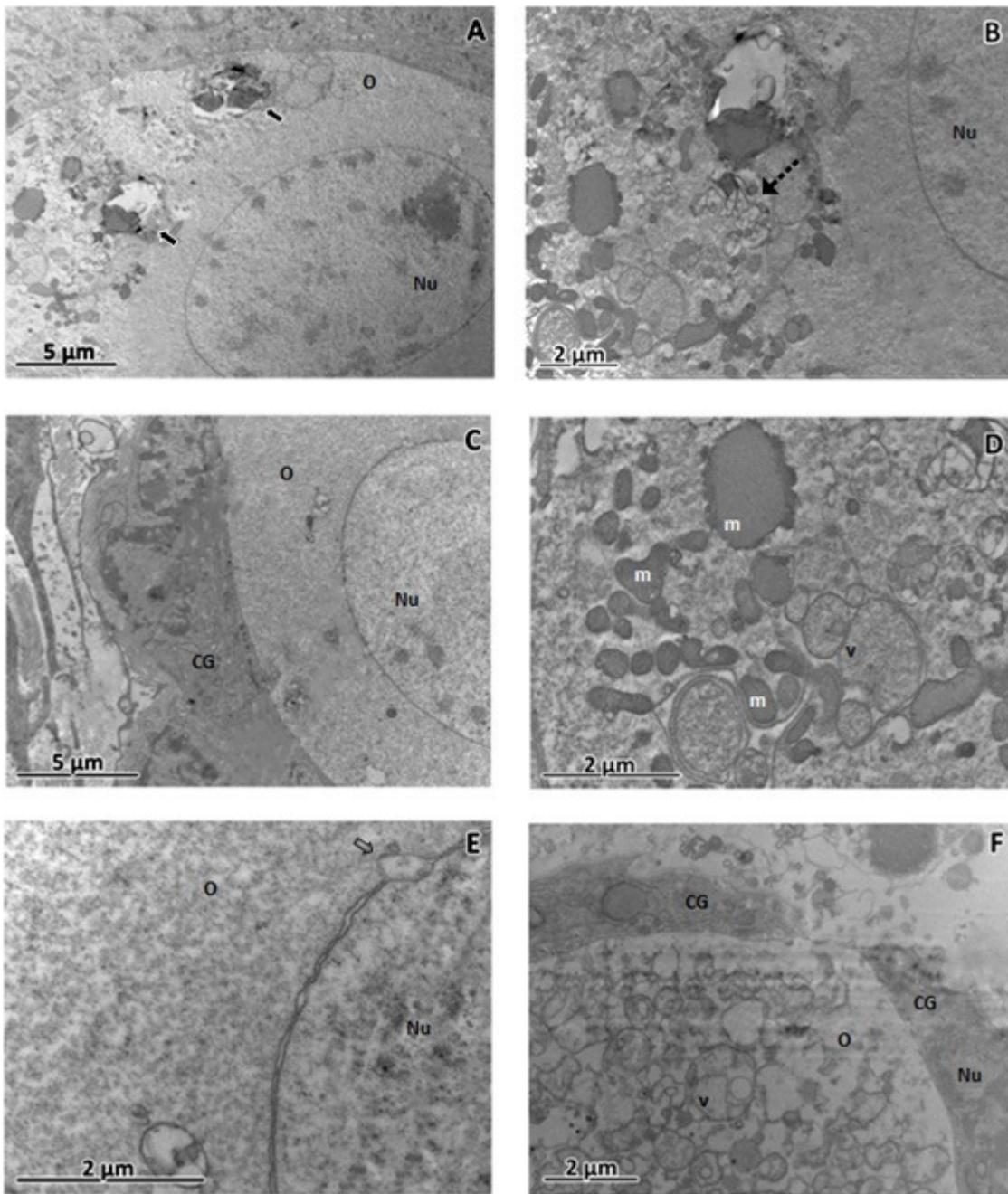


Figura 9. Micrografias em microscopia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais de porca do grupo V₁. (A) Folículo apresentando citoplasma ovocitário ligeiramente granulado e contendo estruturas semelhantes a vesículas rompidas (seta cheia). (B) Folículo apresentando aglomerados de membranas soltas (seta pontilhada). (C) Ovócito apresentando citoplasma com regiões sem organelas ao redor do núcleo. (D) Citoplasma ovocitário apresentando vacúolos e mitocôndrias intumescidas e com cristas degeneradas. (E) Núcleo ovocitário rompido (seta vazia). (F) Células da granulosa apresentando espaços vazios entre elas e com núcleo mal delimitado. É possível observar que o ovócito está totalmente degenerado. CG: célula da granulosa, m: mitocôndria, Nu: núcleo, O: ovócito, v: vacúolos.

7. DISCUSSÃO

Os resultados da análise por microscopia de luz mostraram que as porcentagens de FMN no CL e na V_2 foram estatisticamente menores que as porcentagens do controle e da V_1 , esta última por sua vez teve a porcentagem de FMN igual à do controle. Para o congelamento lento o presente trabalho utilizou um método semelhante ao protocolo empregado por Borges *et al.* (2009) e alcançou porcentagens de FMN muito próximas às encontradas no estudo citado para todas as classes foliculares. Outro estudo, realizado por Gandolfi *et al.* (2006) com CL de fragmentos ovarianos suínos utilizando DMSO 1,5 M ou PROH 1,5 M, encontrou porcentagens de folículos primordiais normais, à análise histológica, de 78,7% e 67,7%, respectivamente. No presente experimento, a taxa de folículos primordiais morfológicamente normais foi maior (84,7%). Esta distinção nos resultados pode ter ocorrido devido à diferença na escolha do crioprotetor entre os dois estudos, pois no presente trabalho foi utilizado EG para o CL.

O trabalho de Rolo (2012) comparou CL e vitrificação na criopreservação do tecido ovariano de cadelas e teve como base para a vitrificação o protocolo de Ishijima *et al.* (2006), o qual foi também utilizado no presente estudo para a V_1 . A porcentagem de FMN na vitrificação do tecido ovariano de cadelas no estudo de Rolo (2012) foi aproximadamente 75,32% para folículos primordiais e 57% para folículos em crescimento. No atual experimento, a taxa de sobrevivência folicular em fragmentos ovarianos de suínos vitrificados pelo mesmo método foi 94,5% para folículos primordiais e 68,1% para folículos em crescimento. Trabalhos utilizando protocolos de criopreservação semelhantes entre si têm revelado diferenças entre as espécies na

resposta a determinado protocolo de criopreservação, como os trabalhos de Dinnyés *et al.* (2000), com vitrificação em superfície sólida de ovócitos bovinos, e de Begin *et al.* (2003) utilizando o mesmo método em caprinos.

A V_2 foi pouco eficaz para conservar FPA suínos, apresentando menores porcentagens de FMN que o controle e a V_1 . Além disso, na análise histológica foi possível verificar que o tecido conjuntivo do estroma ovariano, nos fragmentos submetidos a esse tratamento, encontrava-se alterado, com um afrouxamento das fibras do conjuntivo. Segundo Cunha e Lung (1979) o estroma proporciona condições para a expressão do desenvolvimento normal do epitélio. No caso do tecido ovariano, o estroma é fundamental para o posterior desenvolvimento folicular, visto que, as células estromais que se encontram imediatamente externas à lâmina basal, circundando diretamente o folículo, formam a bainha de células de tecido conjuntivo que irá se diferenciar em teca externa e teca interna produtora de andrógenos (Ross e Pawlina, 2008). Considerando que folículos submetidos ao tratamento V_2 não estariam aptos para um desenvolvimento futuro em função da degeneração do estroma ovariano, e que, a análise por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada apenas em FMN dos melhores tratamentos, o esse tratamento não foi considerado efetivo para análise ultraestrutural.

O crioprotetor utilizado na V_2 foi o EG. Estudos realizados com bovinos (Lucci *et al.*, 2004), caprinos (Santos *et al.*, 2006b) e ovinos (Santos *et al.*, 2006a) utilizaram o mesmo crioprotetor, entretanto para a técnica de CL, e constataram que o EG causa menos danos para folículos pré-antrais, quando comparado com outros crioprotetores. Todavia, na vitrificação de FPA suínos deste estudo, esse crioprotetor não se mostrou

eficiente. Um dos fatores que pode ter influenciado no baixo rendimento da V₂ é a elevada temperatura na qual os fragmentos ovarianos foram equilibrados: 36 °C. Sabe-se que, quanto maior a temperatura em que a célula se encontra maior o seu metabolismo. Essa condição pode ter tornado o folículo mais suscetível à toxicidade do crioprotetor. Além disso, a concentração utilizada do agente, na vitrificação, foi alta quando comparada com concentrações usualmente empregadas no CL de tecido ovariano. Soma-se a ainda, o fato de o EG possuir baixo peso molecular (62,07 kDa), o que facilita sua penetração dentro do tecido ovariano (Santos *et al.*, 2006b). Considerando a rápida infiltração do EG, a alta concentração do agente e a elevada temperatura na qual os folículos estavam submetidos, é possível supor que o EG foi tóxico às células na V₂.

Para Weng *et al.* (2011) a quantidade de pontes de hidrogênio entre moléculas de EG e moléculas de água em uma solução aumenta com o aumento da molaridade. Desse modo, quando a proporção dessas interações hidrogeniônicas é muito alta, isso pode interferir em outras interações moleculares dentro da célula. Para Chen *et al.* (2000), a entrada de EG durante o equilíbrio aumenta a vitrificação intracelular reduzindo o tempo necessário de exposição da célula à solução de vitrificação, que possui alta concentração do crioprotetor, o que seria tóxico para o ovócito.

A degeneração mais observada foi a picnose do núcleo do ovócito para qualquer das classes foliculares, tanto nos tratamentos V₁ e V₂ quanto no CL. Estudos anteriores com criopreservação de tecido ovariano de outras espécies também reportaram a ocorrência dessa degeneração na análise por microscopia de luz. A

picnose do núcleo do ovócito foi o principal tipo de degeneração descrito por Rolo (2012) em cadelas, Santos *et al.* (2007) em cabras e Lucci *et al.* (2004) em bovinos.

No grupo de folículos em crescimento do CL deste trabalho, observou-se também com frequência a retração do citoplasma ovocitário. Santos *et al.* (2007) também relataram a ocorrência dessa degeneração como uma alteração frequente em FPA de cabra vitrificados em superfície sólida ou criopreservados com uso de palhetas. Já o trabalho de Silva *et al.* (2000) relatou que as degenerações mais observadas foram as de ovócitos com retração do citoplasma, núcleo picnótico e desorganização das células da granulosa. De acordo com Jorio *et al.* (1991), o modo de atresia mais frequente observado em folículos pré-antrais foi a degeneração do ovócito em relação a alterações de células da granulosa.

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão os folículos do grupo controle exibiram morfologia normal apresentando ovócito esférico com citoplasma homogêneo contendo organelas uniformemente distribuídas e núcleo bem delimitado por um envelope nuclear. Morfologia semelhante foi descrita anteriormente por Silva *et al.* (2011). Neste trabalho, mitocôndrias arredondadas e retículo endoplasmático foram as organelas mais evidentes. No estudo citado, os autores também relataram que mitocôndrias esféricas são as organelas mais abundantes em ovócitos suínos, para qualquer das classes foliculares. Em FPA de outras espécies, como bovinos (Kacinskis *et al.*, 2005) e búfalos (Mondadori *et al.*, 2007), também foram identificadas muitas dessas organelas.

Ademais, nesse grupo a ultraestrutura de FPA revelou que, em geral, as mitocôndrias dos ovócitos apresentavam-se arredondadas, eletrondensas e com

cristas, algumas destas encontravam-se alongadas e com grânulos elétron-densos em sua matriz. Para Fair *et al.* (1997) mitocôndrias redondas são organelas ainda imaturas das quais as outras formas derivam. De acordo com Silva *et al.* (2011), FPA suínos que apresentam morfologia normal possuem muitas mitocôndrias com grânulos elétron densos, os quais também foram descritos em ovócitos bovinos por Kacinskis *et al.* (2005). Esses grânulos estão envolvidos com o controle iônico interno da mitocôndria e são depósitos de cálcio relacionados à existência de um grande potencial de membrana negativo, da organela (Gunter e Gunter, 1994).

Em nosso trabalho, a microscopia eletrônica de folículos primordiais congelados pelo método CL não revelou resultados muito divergentes da ultraestrutura apresentada pelo grupo controle, com exceção de algumas mitocôndrias inchadas presentes em um dos folículos. Borges *et al.* (2009) também realizaram análise ultraestrutural do tecido ovariano de suínos criopreservado com a mesma técnica e relataram que a morfologia dos FPA foi muito próxima da apresentada em folículos do grupo controle. Os autores também referiram que ocasionalmente foram observadas mitocôndrias inchadas em FPA congelados pelo mesmo método, e sugerem que essas alterações mitocondriais podem ser consequência de distúrbios no equilíbrio iônico, causados pelo crioprotetor.

FPA vitrificados pelo método V₁ revelaram várias alterações ultraestruturais. As células da granulosa encontravam-se, em geral, desorganizadas e os ovócitos apresentaram citoplasma granuloso com diversas mitocôndrias túrgidas e sem cristas. Também foram identificadas estruturas semelhantes a vesículas rompidas, que aparentavam espaços vazios. Para Silva *et al.* (2001), a presença de retículo

endoplasmático e de mitocôndrias inchadas e sem cristas caracterizam os primeiros sinais de degeneração que podem ser reversíveis em um pequeno intervalo de tempo.

Em um estudo com ultraestrutura de ovócitos de cordeiros, Tassel e Kennedy (1980) relataram a presença de estruturas semelhantes a vesículas rompidas que descreveram como “espaços vazios” no citoplasma. Eles sugeriram que essa alteração pode caracterizar cisternas de retículo endoplasmático dilatadas. Em nosso trabalho, a observação de estruturas semelhantes a vesículas, às vezes rompidas, também pode significar dilatação de cisternas de retículo endoplasmático, que assumiram a conformação de vesículas. Essas degenerações ocorrem em função de mudanças no balanço iônico provocadas por alteração na permeabilidade da membrana (Coss *et al.*, 1979). Assim, os resultados da análise por microscopia de luz indicaram que os métodos V₁ e CL foram eficientes para a criopreservação de tecido ovariano suíno, entretanto uma avaliação mais acurada pela microscopia eletrônica de transmissão permitiu verificar que apenas o método CL foi eficaz para preservar FPA inclusos em tecido ovariano da espécie em questão.

8. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso trabalho, testamos dois métodos de vitrificação do tecido ovariano de suínos e comparamos os resultados de análises morfológicas, obtidas por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, com um método pré-estabelecido para congelamento lento de FPA dessa espécie. Verificamos que a criopreservação de FPA presentes no tecido ovariano suíno alcançou melhores resultados quando o método CL foi utilizado em comparação aos dois métodos de vitrificação empregados no presente estudo. Entretanto, considerando que protocolos de vitrificação podem ser aplicados de diversas maneiras: utilizando-se diferentes crioprotetores, ou concentrações variadas dos mesmos ou também empregando outras técnicas de criopreservação, além da vitrificação em superfície sólida (Kagawa *et al.*, 2009; Yeoman *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007, Santana *et al.*, 2012), concluímos que a vitrificação, em geral, não pode ser considerada inviável para a preservação do tecido ovariano suíno. De fato, outros estudos são necessários nesse campo, como a avaliação do efeito de diferentes crioprotetores sobre a vitrificação de FPA suínos, ou o emprego de uma técnica diferente de vitrificação. Também é importante analisar os folículos de outras formas, como o cultivo *in vitro*, para avaliar a viabilidade além da morfologia.

9. REFERÊNCIAS

- AL-AGHBARI, A. M.; MENINO, A. R. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.101-110, 2002.
- ARAV, A.; REVEL, A.; NATHAN, Y.; BOR, A.; GACITUA, H.; YAVIN, S.; GAVISH, Z.; URI, M.; ELAMI, A. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. **Human Reproduction**, v.12, p. 3554-3559, 2005.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, v.45, p. 143-152, 2002.
- BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v.5, n.3, p. 119- 126, 2009.
- BECKERS, F. J.; DRION, P. V.; FIGUEIREDO, J. R. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-54, 1996.
- BEGIN, I.; BHATIA, B.; BALDASSARRE, H.; DINNYES, A.; KEEFER, C. L. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v.59, p.1839-1850, 2003.
- BORDES, A.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; FRANCK M; COURBIERE, B.; GUERIN, J. F.;SALLE, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v.20, p.2745-2748, 2005.

- BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FUTINO, D. O.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; LUCCHI, C. M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v.59, p.195–200, 2009.
- CABODEVILA, J.; TERUEL, M. **Criopreservación de embriones bovinos**. In: Palma, G. A.; Brem, G. *Biotecnología de La Reproducción*. 1. ed. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, p.149-167, 2001.
- CHAO, L.; DENG, X.; WANG, X.; FU, Q.; XU, A.; HAO, C.; YU, H.; YU, X. Normal developmental competence to the blastocyst stage is preserved in rabbit ovarian tissue following cryopreservation and autografting to the mesometrium. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.466-473, 2008.
- CHEN, C. H.; CHEN, S.G.; WU, G .J.; WANG, J.; YU, C. P.; LIU, J. Y. Autologus heterotopic transplantation of intact rabbit ovary frozen banking at –196 degrees C. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1059-1066, 2006.
- CHEN, S. U.; LIEN, Y. R.; CHAO, K. H.; LU, H. F.; HO, H. N.; YANG, Y. S. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertility and Sterility*, v.74, n.8, p. 804-808, 2000.
- CHEN, S. U.; LIEN, Y. R.; CHENG, Y. Y.; CHEN, H. F.; HO, H. N.; YANG, Y. S. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, p.2350-2356, 2001.
- COSS, R. A.; DEWEY, W. C.; BAMBURG, Jr. Effects of hyperthermia (41,5°C) on Chinese hamster ovary cells analyzed in mitosis. **Cancer Research**, v.36, p.1911-1918, 1979.

- COURBIÈRE, B.; MASSARDIER, J.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; GUERIN, J. F., LORNAGE, J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. **Fertility and Sterility**, v.84, p.1065-1071, 2005.
- CRAN, D. G.; ESPER, C. R. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v.42, p.177-188, 1990.
- CUNHA, G.; LUNG, B. The importance of stroma in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. **In Vitro**, v.15, n.1, p. 50-71, 1979.
- DIDION, B. A.; POMP, D.; MARTIN, M. J.; HOMANICS, G. E.; MARKERT, C. L. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2803-2810, 1990.
- DINNYÉS, A.; DAI, Y.; JIANG, S.; YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 513–518, 2000.
- DISSEN, G. A.; LARA, H. E.; FAHRENBACH, W. H.; COSTA, M. E.; OJEDA, S. R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**, v.54, p.134:1146, 1994.
- ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.243-255, 1993.
- ERICKSON, B. H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

- EROGLU, A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: Intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. **Cryobiology**, v.60 p.S54-S59, 2010.
- FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v.195, p. 327-336, 1997.
- GALIGUIS, J.; POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DUMAZ, C.; LEIBO, S. P. Cryopreservation of cat ovarian tissue by vitrification. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, n.1, p.179-179, 2012.
- GANDOLFI, F.; PAFFONI, A.; PAPASSO-BRAMBILLA, E.; BONETTI, S.; BREVINI, T. A., RAGNI, G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1150-1156, 2006.
- GHETLER, Y.; SKUTELSKY, E.; BEN NUN, I.; BEN DOR, L.; AMIHAI, D.; SHALGI, R. Human oocytes cryopreservation and the fate of cortical granules. **Fertility and Sterility**, v.86, p.210-216, 2006.
- GOSDEN, R. G.; BAIRD, D. T.; WADE, J.C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees celsius. **Human Reproduction**, v.9, p.597- 603, 1994.
- GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Transport of calcium by mitochondria. **Journal of Bionergetics and Biomembranes**, v.26, p.471-485, 1994.

- GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; LEE, H. T. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. **Theriogenology**, v.67, p.238-248, 2007.
- GUPTA, S.K.; JETHANANDANI, P.; AFZALPURKAR, A.; KAUL, R.; SANTHANAM, R. Prospects of zonapellucida glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine. **Human Reproduction Update**, v.3, p.311-324, 1997.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture In Vitro. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1322-1328, 2000.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: Hafez, E. S. E. and Hafez, B. **Reprodução Animal**, Ed. Manole, p.69-82, 2004.
- HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, v.51, p.165, 1999 (abstract).
- HARTSHORNE, G. M.; LYRAKOU, S.; HAMODA, H.; OLOTO, E.; GHAFARI. Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocytes selection? **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12, p.805-819, 2009.
- HASHIMOTO, S.; OHSUMI, K.; TSUJI, Y.; HARAUMA, N.; MIYATA, Y.; FUKUDA, A.; HOSOI, Y.; IRITANI, A.; MORIMOTO, Y. Growing Porcine Oocyte-Granulosa Cell Complexes Acquired Meiotic Competence During *In Vitro* Culture. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 2, p.383-384, 2007.
- HOLT, W. V.; BENNETT, P. M.; VOLOBOUEV, V.; WATWON, P. F. Genetic resource banks in wildlife conservation. **Journal of Zoology**, v. 238, n.3, p.531-544, 1996.
- ICMBIO: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Biodiversidade: Fauna Brasileira: Lista Estado de Conservação: Mamíferos - Ungulados**. Acesso em

17/02/2013 Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/2749-mamiferos-ungulados.html>

IMHOF, M.; HOFSTETTER, G.; BERGMEISTER, H.; RUDAS, M.; KAIN, R.; LIPOVAC, M.; HUBER, J. Cryopreservation of a whole ovary as a strategy for restoring ovarian function. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.21, p.459-465, 2004.

INAGAKI, N. SUZUKI, S.; KUJI, N.; KITAI, H.; NAGATOGAWA, N.; NOZAWA, S. Cell cycle regulation: Egg activation induced by osmotic pressure change and the effect of amiloride on the cryopreservation of mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.2, p.835-843, 1996.

ISACHENKO, V.; FOLCH, J.; ISACHENKO, E.; NAWROTH, F.; KRIVOKHARCHENKO, A.; VAJTA, G.; DATTENA, M.; ALABART, J. L. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v.60, p.445-452, 2003.

ISACHENKO, V.; SOLLER, C.; ISACHENKO, E.; SANCHEZ-PEREZ, F.; GRISHCHENKO, V. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. **Cryobiology**, v.36, p.250-253, 1998.

ISHIJIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; LEE, D. S.; UETA, Y. Y.; MATSUI, M.; LEE, J. Y.; SUWA, Y.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p.293-299, 2006

JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R.; Effects Of Freezing And Thawing On Mammalian Oocyte. **Cryobiology**, v. 21, p.192-199, 1984.

- JORIO, A. M. J. C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during prepubertal period in D'man and timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.239-250, 1991.
- JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: Junqueira, L. C. U and Carneiro, J. **Histologia Básica: Texto/Atlas**, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 11 ed, p. 432-438, 524p, 2008.
- KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C. M.; LUQUE, M. C. A.; BÁO, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p.45-57, 2005.
- KAGAWA, N. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice. **Reproductive Bio Medicine Online**, v.14, n.6, p.693-699, 2007.
- KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**. Online, v.18, p.568-577, 2009.
- KUWAYAMA, M.; KATO, O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.17, p.477, 2000 (abstract).
- KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and elimination of potential contamination. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, n.5, p.608-614, 2005.
- LANE, M.; FOREST, K. T.; LYONS, E. A.; BAVISTER, B. D. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel container less technique. **Theriogenology**, v.51, p.167, 1999 (abstract).

- LEE, D.; OUHIBI, N.; BATTAGLIA, D. Criopreservation of ovarian tissue: banking reproductive potential for the future. **Current Womens Health Reports**, v. 1, p. 152-156, 2001.
- LEIBO, S. P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: **Freezing of Mammalian embryos**. Ciba Foundation Symposium, Ed. Elsevier, Amsterdam, n.52, p.69-92, 1977.
- LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÁO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1101-1114, 2004.
- LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, p.101-111, 2006.
- MAGOFFIN D, KUMAR A, YILDIZ B, AZZIZ R. Endocrinology of the Ovary. In: MELMED S, CONN PM. **Endocrinology: Basic and Clinical Principle**, Ed. Humana Press, Totowa, 2 ed, p.391-403, 2005.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059–1069, 1996.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology- Cell Physiology**, v. 247, p.125-142, 1984.
- McEVOY, COULL, G. D.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. S.; SPEAKE, B. K Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.163-170, 2000.

- MONDADORI, R. G.; LUQUE, M. C. A.; SANTIN, T. R.; BÁO, S. N. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.323-333, 2007.
- MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R. -M.; TAKETSURU, H.; MIYANO, T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**, v.72, p.280-288, 2009.
- NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v.39, p.811-821, 1993.
- PEREIRA, M. R.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 267-277, 2008.
- RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. **Nature**, v.313, p. 573-575, 1985.
- RAO, B. S.; MAHESH, Y. U.; CHARAN, K. V.; SUMAN, K.; SEKHAR, N.; SHIVAJI, S. Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocytes complexes. **Cryobiology**, v.64, n.3, p. 176-184, 2012.
- REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; FILHO, A. S. S.; ANDRADE, J. C. Transferência e Criopreservação de Embrião Bovino. In: Gonçalves, P. B.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo, Ed. Varela, p.127-178, 2002.
- ROLO, J. L. J. P. Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas. 2012, 58 f, **Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)** – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Aparelho Reprodutor Feminino. In: Ross, M. H and Pawlina, W. **Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular**.5. ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.775-783, 908p, 2008.
- ROSS, M. H.; ROMELL, L. J.; KAYE, G. I. **Histology: A Text and Atlas**. Ed. Williams and Wikins, 3 ed, 823p, 1995.
- RUBINSKY, B. Principles of low temperature cell preservation. **Heart Failure Reviews**, v.8, p.277-284, 2003.
- SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.78, n.3, p.644-645, 2002.
- SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; RUDIGOZ, R. C.; GUERIN, J. F.; LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen–thawed hemi-ovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, v.77, p.403-408, 2002.
- SANKAI, T.; OWADA, N.; KYONO, K. Cryopreservation of the ovary. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 27, p.101-105, 2010.
- SANTANA, L. N.; VAN DEN HURK, R.; OSKAM, C.; BRITO, A. B.; BRITO, D. C.; DOMINGUES, S. F. S.; SANTOS, R. R. Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview. **Biopreservation and Biobanking**, v.10, n.3, p. 288-294, 2012.
- SANTOS R.R. Cryopreservation Of Caprine Ovarian Tissue: Recovery Of Gonadal Function After Auto-Transplantation. 144f. **Thesis (Doctorat)** - Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2007.

- SANTOS, R. R.; AMORIM, C.CECCONI, S, FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.; PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: na emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.151-163, 2010.
- SANTOS, R. R.; KNIJN, H. M.; VOS, P. L.; OEI, C. H.; VAN LOON, T.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; VAN DEN HURK, R.; ROELEN, B. A. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, auto transplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility**, v.91, p.1455-1458, 2009.
- SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; VAN DEN HURCK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysys of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249-263, 2006a.
- SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; FIGUEIREDO, J. R.; HAEFTEN, T. V.; VAN DEN HURCK, R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v.325, n.3, p.523-531, 2006b.
- SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, p.167-176, 2007.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.
- SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-52, 2000.

- SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; CARVALHO, F. C. A.; ANDRADE, E. R.; FERREIRA, M. A. L.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 209-223, 2001.
- SILVA, J.R., LUCCI, C.M., CARVALHO, F.C., BÁO, S.N., COSTA, S.H., SANTOS, R.R., FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. **Theriogenology**, v. 15, p.809-822, 2000.
- SILVA, R. C.; BÁO, S. N.; JIVAGO, JL. P. R.; LUCCI, C. M. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution. **Theriogenology**, v. 76, p. 1647-1657, 2011.
- SILVESTRE, M. A.; SAEED, A. M.; ESCRIBA, M. J.; GARCIA-XIMENEZ, F. Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. **Theriogenology**, v. 58, p. 69-76, 2002.
- SOLWS, L. K. An Introduction to Peccaries. In: Solws, L. K. **Javelinas and Other Peccaries: Their Biology, Management and Use**, Copyright, Tucson- Arizona, 2 ed, p.3-5, 337p, 1997.
- SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p.147-160, 2005.
- STEPONKUS, P. L.; MYERS, S. P.; LYNCH, D, V.; GARDNER, L.; BRONSHTEYN, V.; LEIBO, S. P.; RALL, W. F.; PITT, R. E.; LIN, T. T.; MACINTYRE, R. J. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. **Nature**, v.345, p.170-172, 1990.

- TASSEL, R.; KENNEDY, J. P.; Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb-fine structure and histochemistry. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.33, p. 675-687, 1980.
- TELFER, E. E. In vitro development of pig preantral follicles. **Reproduction Supplement**, v.58, p.81-90, 2001.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.38, p.349-352, 1997.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, n.1, p.53-58, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.
- WENG, L.; CHEN, C.; ZUO, J.; LI, W. Molecular dynamics study of effects of temperature and concentration on hydrogen-bond abilities of ethylene glycol and glycerol: implications for cryopreservation. **The Journal of Physical Chemistry**, v.115, p.4729-4737, 2011.
- WILDT, D. E. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. **The Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v.41, p.228-234, 2000.

- WUSTEMAN, M. C.; PEGG, D. E.; ROBINSON, M. P.; WANG, L. H.; FITCH, P. Vitrification media: toxicity, permeability and dielectric properties. **Cryobiology**, v.44, p.24-37, 2002.
- YAMAKI, S. B.; PEDROSO, A. G.; ATVARIS, T. D.Z. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físicoquímica). **Química Nova**, v.25, p.330-334, 2002.
- YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility**, v.83, p.1248-1254, 2005.
- ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v.121, p. 447-454, 2001.
- ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p. 35-42, 1999.
- ZHOU, G. B.; LI, N. Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 279-285, 2009.