

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Carina Diniz Rocha

**ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS
PRÉ-ANTRAIS DE MARRÃS PRÉ-PÚBERES**

UBERLÂNDIA-MG

2011

Carina Diniz Rocha

ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS
PRÉ-ANTRAIS DE MARRÃS PRÉ-PÚBERES

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal
Linha de Pesquisa: Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. José Octavio Jacomini

UBERLÂNDIA-MG
2011

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a
quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante."

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Otávio e Maria Helena, sempre presentes nos momentos difíceis, que nunca mediram esforços para a concretização dos meus sonhos.

Com amor, dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo amor, força e orientação para prosseguir durante esta jornada que se encerra e naquelas que estão por vir.

Aos meus pais Otávio Augusto e Maria Helena por todo o amor e dedicação.

À minha querida irmã Aline pela amizade e incentivo.

Ao meu namorado William pelo amor, incentivo, paciência e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Octavio Jacomini por todos os ensinamentos, pela confiança, atenção, compreensão e apoio.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, pela amizade, apoio e sugestões que contribuíram para aprimorar este trabalho.

Aos professores Dra. Teresinha Inês de Assumpção, Dra. Carina Ubirajara de Faria, Dra. Natasha Almeida Marques da Silva, Dra. Ricarda Maria dos Santos, Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães, Dr. Antônio Vicente Mundim, Dr. Mauricio Machain Franco e Dr. Robson Antunes pelos ensinamentos, pela confiança, apoio e amizade.

À Aracelle Elisane Alves, por ter gentilmente aceito o convite para participar da banca da defesa desta dissertação.

Aos técnicos do laboratório Mariani, Fabrício, Rui, Marcelo pelo apoio técnico, colaboração, amizade e pelos momentos de descontração.

À Valdevane Araújo e Roberta Chaves do Laboratório de Manipulação de Ovócitos e de Folículos Ovarianos Pré-antrais da Universidade Estadual do Ceará pelas orientações, pela atenção e apoio.

Aos graduandos, mestrandos e doutorandos Camila, Lorena, Bênnner, Kele, Marília, Ricardo e Fabiane, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Ao Frigorífico Real, em especial Claudesina e Serly, pelo apoio e pelo material fornecido para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar o curso de mestrado em Ciências Veterinárias.

À FAPEMG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão financeira.

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

Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Capítulo 1 – Considerações Gerais.....	13
1 Introdução.....	14
2 Ovários de mamíferos e o processo de ovogênese e foliculogênese.....	16
2.1 Ovários de mamíferos.....	16
2.2 Ovogênese.....	17
2.3 Foliculogênese.....	18
2.3.1 Folículos pré-antrais.....	20
2.3.2 Folículos antrais.....	21
3 A biotécnica MOIFOPA.....	22
4 Técnicas de isolamento de folículos pré-antrais.....	23
5 Principais avanços obtidos com a utilização de FOPA de mamíferos em sistema <i>in vitro</i>	24
6 Criopreservação.....	25
Referências.....	28
Capítulo 2 - Quantificação e qualificação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes solados mecanicamente em diferentes intervalos de corte.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	39
Resultados.....	42
Discussões.....	43
Conclusão.....	45
Referências.....	45
Capítulo 3 - Teste de toxicidade e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente utilizando glicerol.....	48
Resumo.....	49
Abstract.....	50

Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	54
Discussões.....	57
Conclusão.....	58
Referências.....	59

LISTA DE ABREVIACES

BSA	Albumina sérica bovina
CGP	Células germinativas primordiais
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento fibroblastico
FIV	Fecundao <i>in vitro</i>
FOPA	Folículos ovarianos pr-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gramas
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciao-9
Gly	Glicerol
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IV	<i>In vitro</i>
Kg	Kilograma
KL	Kit ligante
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
MCI	Massa celular interna
MIV	Maturao <i>in vitro</i>
µg	Micrograma
µm	Micrmetros
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MOIFOPA	Manipulao de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pr-antrais
C	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato salino
PIV	Produo <i>in vitro</i>
SRD	Sem raa definida
TE	Transferência de embrião
TGF	Fator de crescimento transformante
VG	Vesícula germinativa

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1	Número médio de folículos pré antrais isolados mecanicamente pelo tissue chopper por ovário de marrãs pré púberes em diferentes intervalos de cortes (250 e 500 μ m)..... 42
Tabela 2	Porcentual de folículos ovarianos pré-antrais viáveis isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes em diferentes intervalos de cortes (250 e 500 μ m)..... 43
Capítulo 3	
Tabela 1	Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis, após a exposição ao glicerol nas concentrações de 1,5 e 3 M..... 55
Tabela 2	Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis, após a criopreservação/ descongelamento com glicerol nas concentrações de 1,5 e 3 M..... 56
Tabela 3	Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis comparando teste de toxicidade e criopreservação/ descongelamento com glicerol na concentração de 1,5 M..... 56
Tabela 4	Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis comparando teste de toxicidade e criopreservação/ descongelamento com glicerol na concentração de 3 M..... 56

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Capítulo 1	
Figura 1 Ovário de mamíferos ilustrando suas principais estruturas.....	16
Figura 2 Formação dos ovócitos e folículos, destacando a relação dos processos de ovogênese e foliculogênese.....	19
Figura 3 Classificação dos folículos pré-antrais, segundo Hulshof (1994).....	21
Figura 4 Classificação dos folículos antrais, segundo Hulshof (1994).....	21
Figura 5 Associação da biotécnica MOFOPA com outras biotécnicas da reprodução.....	22
Figura 6 Principais avanços obtidos com a utilização de FOPA de mamíferos cultivados <i>in vitro</i>	25
Capítulo 2	
Figura 1 Sequência da metodologia utilizada para isolamento mecânico, quantificação e análise qualitativa de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes.....	40
Figura 2 Procedimento de isolamento mecânico.....	41
Capítulo 3	
Figura 1 Análise da viabilidade folicular com corante fluorescente iodeto propídeo de foliculos pré-antrais de marrãs pré-púberes após exposição ao glicerol 1,5 e 3 M.....	54
Figura 2 Análise da viabilidade folicular com corante fluorescente iodeto propídeo de foliculos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes, após criopreservação/ descongelamento com glicerol 1,5 e 3M.....	55

Isolamento e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes

RESUMO

Objetivou-se neste estudo isolar mecanicamente e criopreservar com glicerol nas concentrações de 1,5 e 3 M folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes. Foram utilizados ovários (n=18) de marrãs pré-púberes seccionados em tissue chopper em intervalos de 250 e 500 μ m. A quantificação folicular foi realizada em câmara de Neubauer e a análise de viabilidade em microscópio. No intervalo de corte de 250 μ m o número médio de folículos isolados foi de 168.889 ± 69.017 , enquanto que no corte de 500 μ m o número médio foi de 180.000 ± 92.800 , sendo que em ambos os intervalos o número médio de folículos pré-antrais foram estatisticamente iguais. A taxa de viabilidade folicular foi de 76,50% e 74,08% nos intervalos de corte 250 e 500 μ m, respectivamente, não apresentando diferença estatística. No segundo estudo foram utilizados (n=12) ovários de marrãs pré-púberes processados mecanicamente com fatiador de tecido (tissue chopper) com intervalo de corte de 250 μ m. Para teste de toxicidade foram adicionados glicerol na concentração final de 1,5 e 3 M. A taxa de viabilidade dos folículos pré-antrais no grupo controle sem glicerol 72,72%, após exposição ao glicerol 1,5 M (tox-1,5) e 3 M (tox-3) foi 62,15% e 12,07%, respectivamente, sendo que não houve diferença estatística entre o controle sem glicerol e o tox-1,5 e sim entre controle sem glicerol e tox-3 e entre tox-1,5 e tox-3. Após o procedimento de criopreservação/descongelamento o número de folículos pré-antrais viáveis foi de 18,88% no grupo glicerol 1,5 M (crio-1,5) e 2,81% no grupo glicerol 3 M (crio-3) não apresentaram diferenças significativas. Em crio-1,5 e crio-3 as taxas de viabilidade em relação ao grupo controle sem glicerol (72,72%) apresentaram-se significativamente diferentes e baixas e entre crio-1,5 e crio-3 não foram significativas. A análise de viabilidade do teste de toxicidade e de criopreservação/descongelamento com o glicerol, na concentração de 1,5 M (tox-1,5 e crio1,5) foi significativamente menor em crio-1,5, enquanto que esta mesma análise na concentração 3 M (tox-3 e crio-3) não houve diferenças. Conclui-se que ambos os intervalos de cortes (250 e 500 μ m) podem ser utilizados no isolamento de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes com a mesma eficiência e após exposição ao glicerol 1,5 M apresentaram melhor

taxa de viabilidade, porém em ambas as concentrações 1,5 e 3 M a criopreservação não foi satisfatória.

Palavras-chave: Isolamento. Viabilidade. Glicerol. Marrãs.

Isolation and cryopreservation of ovarian preantral follicles from pré pubertal gilts

Abstract

The aim of this study it was to isolate mechanically and cryopreserve ovarian follicles from pre pubertal gilts; with glycerol on the concentrations of 1,5 M and 3 M. Eighteen ovaries from pre pubertal gilts were used ($n = 18$) sectioned using tissue chopper in sections with interval of 250 e 500 μm . The follicular quantifying was performed in Neubauer chamber and the viability analysis in microscope. In the section of 250 μm the mean number of isolated follicles was 168.889 ± 69.017 , while on the section of 500 μm the mean number was 180.000 ± 92.800 , being in both sections the mean number of preantral follicles were statistically similar. The rate of follicular viability was 76,50% and 74,08% in the sections of 250 and 500 μm , respectively, not showing significant difference. In the second study were used twelve ($n=12$) ovaries from pre pubertal gilts processed mechanically in tissue chopper, making sections of 250 μm . Designed to the toxicity test, glycerol was added on the final concentration of 1,5 e 3 M. The rate of viability of preantral follicles on the control group without glycerol 72,72 %, after exposition to glycerol 1,5 M (tox-1,5) and 3 M (tox-3) was 62,15% and 12,07%, respectively, being that there was no statistical difference between the control without glycerol and the tox-1,5 and there was between control without glycerol and tox-3 and between tox-1,5 and tox-3. After the cryopreservation/thawing procedure the number of viable preantral follicles was 18,88% on the glycerol group 1,5 M (cryo-1,5) and 2,81% on the group glycerol 3M (cryo-3) did not show statistical difference. At cryo-1,5 and cryo-3 the rates of viability in relation to the control group without glycerol (72,72%) showed significantly different and low, and between cryo-1,5 and cryo-3 were not significant. The analysis of viability from the test of toxicity and cryopreservation/thawing with glycerol, on the concentration of 1,5 M (tox-1,5 and cryo1,5) was significantly lower in cryo 1,5, while at the same analysis on the concentration of 3 M (tox-3 and cryo-3) there was no difference. In conclusion, both interval of section (250 and 500 μm) can be used on the isolation of ovarian follicles from pre pubertal gilts with the same efficiency and after the exposition to glycerol 1,5 M showed the best viability rate, however in both concentrations 1,5 e 3 M the cryopreservation was not satisfactory.

Key-words: Isolation. Viability. Glycerol. Gilt.

Capítulo 1- Considerações Gerais

1 Introdução

A aplicação de técnicas reprodutivas como a manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) permite a obtenção de ovócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais. Esta técnica vem sendo bastante pesquisada por sua potencialidade em aproveitar milhares de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais.

A maioria da população de folículos pré-antrais (FOPA) presentes nos ovários mamíferos (99,9%) morre por atresia e somente (0,01%) destes folículos chegam à ovulação (FIGUEIREDO et al., 1998). A reserva de células germinativa de fêmeas mamíferas localizada em folículos ovarianos em vários estádios de desenvolvimento é estabelecida durante a vida fetal, e gradualmente mobilizada durante a vida reprodutiva (VAN DER HURK; ZHAO, 2005).

Os folículos ovarianos são classificados, segundo HULSHOF (1994) em folículos pré-antrais: primordiais (circundado por uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa), primários (ovócitos circundado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide) e secundários (ovócitos circundados por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica) e antrais: terciários (proliferação das células da granulosa, formação do antro).

O principal objetivo desta técnica é recuperar um grande número de ovócitos inclusos nestes folículos por meio do isolamento e cultivo *in vitro*, visando multiplicar animais de elevado valor genético bem como animais em via de extinção (LUCCI et al., 2002).

O estudo de folículos pré-antrais da espécie suína auxilia na proteção de espécies de animais pertencentes à mesma família, como o cateto (*Tayassu tajacu*) e a queixada (*Tayassu pecari*), que com aperfeiçoamento desta técnica (MOIFOPA) estas espécies podem ser favorecidas.

Os folículos pré-antrais podem ser isolados do tecido ovariano pelo método mecânico, enzimático ou associações destes dois métodos. O método mecânico é realizado com auxílio de instrumentos como tissue chopper, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes. O método enzimático utiliza enzimas proteolíticas como colagenase, tripsina e pronase ou pela associação destes dois métodos.

A criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais tem sido estudada em várias espécies como camundongos (CANDY et al., 1997), felinos (LIMA et al., 2006; JEWGENOW et al., 1998), caprinos (RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2004 ab), ovinos (AMORIM et al., 2006; AMORIM et al., 2003, SANTOS et al., 2006ab), caninos (LOPES, 2008), bovinos (COSTA et al., 2010; LUCCI et al., 2004) e suínos (BORGES et al., 2009) permitindo que as células sejam submetidas a uma redução do metabolismo, no qual podem permanecer por um período indeterminado e, futuramente, serem resgatadas ainda viáveis a fim de continuarem o seu desenvolvimento normal após descongelamento.

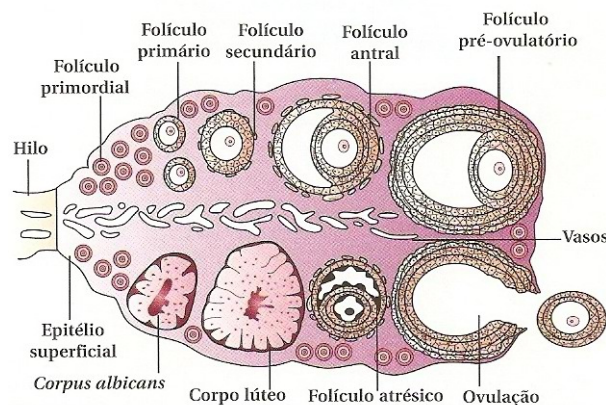
Apesar da ação benéfica dos crioprotetores deve-se considerar a toxicidade destas substâncias, que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação (OKTAY et al., 1998). A alta capacidade de penetração do crioprotetor oferece maior risco de toxicidade celular, por isso torna-se tão importante a descoberta da concentração ideal de crioprotetor para melhor aproveitamento destas células.

Objetivou-se neste estudo isolar mecanicamente e criopreservar com glicerol nas concentrações de 1,5 e 3M folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes.

2 Ovários de mamíferos e o processo de ovogênese e de foliculogênese

2.1 Ovários de mamíferos

O ovário de mamíferos é um órgão composto por uma região medular e uma cortical, circundada pelo epitélio germinativo. A região medular, que na maioria das espécies consiste na porção interna do ovário, é constituída por tecido conjuntivo, nervos, vasos sangüíneos e vasos linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário. O córtex, localizado mais externamente, com exceção dos equídeos, contém corpos lúteos, albicans e folículos ovarianos, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para crescimento, maturação e manutenção do ovócito (FIGUEIREDO et al., 2008) (figura 1).



Fonte: FIGUEIREDO et al.(2008)

Figura 1 - Ovário de mamíferos ilustrando suas principais estruturas

Fisiologicamente o ovário exerce duas funções principais: 1) liberação de ovócitos maduros (ovulação) aptos a serem fecundados e 2) produção de hormônios esteróides, fatores de crescimento e outros. Estas duas funções são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a ovogênese e a foliculogênese (BARNETT et al., 2006).

2.2 Ovogênese

É o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) de fêmeas, culminando com a formação do ovócito maduro apto a ser fecundado (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

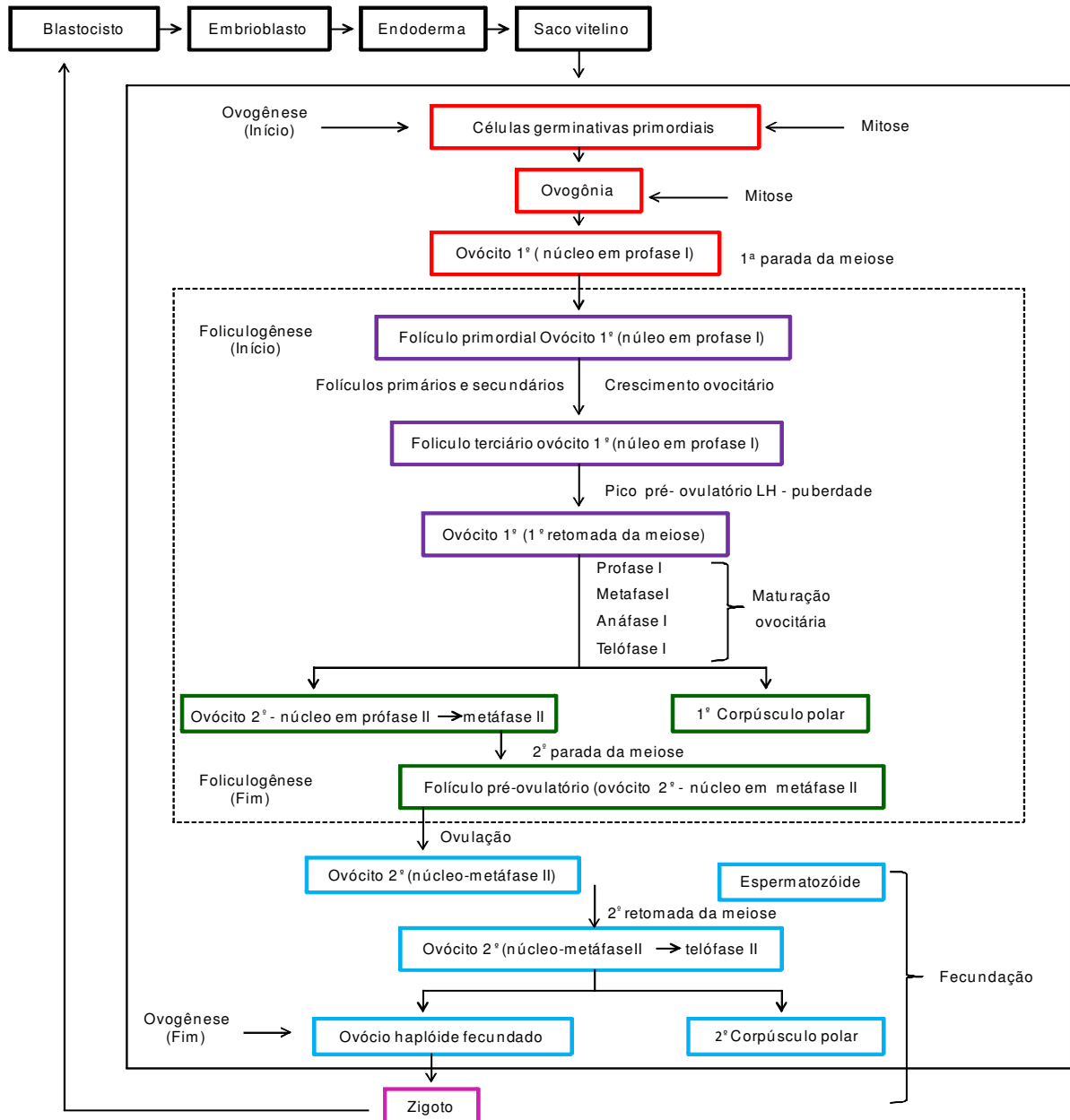
As células germinativas primordiais são formadas durante o período embrionário. Após a fecundação do ovócito pelo espermatozóide, forma-se o zigoto que evoluirá ao estágio de blastocisto e este por sua vez é constituído por duas estruturas, o trofoblasto e o botão embrionário, também chamado de embrioblasto ou massa celular interna (MCI). A partir do botão embrionário serão formados três folhetos: ectoderma, mesoderma e endoderma. Deste último será formado entre várias estruturas o saco vitelino, de onde as células germinativas primordiais que migrarão para o mesênquima da crista genital e colonizam a gônada indiferenciada (FIGUEIREDO et al., 2008). Após a migração as células perdem sua característica móvel e iniciam a mitose, ou seja, as CGP intraovarianas, multiplicam-se ativamente e diferenciam-se em ovogônias (SENEDA; SILVA, 2009).

As ovogônias sofrem sucessivas mitoses e, posteriormente, entram na primeira divisão meiótica (estádio de prófase I) e passarão a ser denominadas de ovócitos primários (FIGUEIREDO et al., 2008). Em suínos a meiose começa ao redor de 40 dias do desenvolvimento embrionário (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O núcleo ovocitário que se encontra na fase de meiose I passará sucessivamente pelos estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno). O processo meiótico é interrompido (primeira parada da meiose) no estágio de diplóteno, também denominado de estágio de dictioteno ou de vesícula germinativa (VG). O núcleo do ovócito permanecerá neste estágio pelo menos até que o animal atinja a puberdade (FIGUEIREDO et al., 2008).

Quando o animal atinge a puberdade, devido a liberações pré-ovulatórias de hormônio luteinizante (LH), algumas horas antes da ovulação a meiose é retomada e o núcleo ovocitário entra em diacinese (FIGUEIREDO et al., 2008). Neste momento, inicia-se o rompimento da VG e expulsão do primeiro corpúsculo polar, resultando na formação do ovócito secundário que progredirá até a metáfase II, ocorrendo à segunda parada da meiose que será retomada somente após a fecundação pelo espermatozóide seguida da expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do ovócito fecundado (MARTINS et al., 2008) (figura 2).

2.3 Foliculogênese

Entendida como processo de formação, crescimento e maturação folicular, inicia-se na vida embrionária na maioria das espécies com a formação do folículo primordial e termina com o folículo pré-ovulatório (MARTINS et al., 2008). Durante a foliculogênese a morfologia folicular é modificada, uma vez que o ovócito cresce e passa por intensas proliferações das células da granulosa (LEITÃO et al., 2009) (figura 2).



Fonte: Adaptado FIGUEIREDO et al. (2008)

Figura 2 - Formação dos ovócitos e folículos, destacando a relação dos processos de ovogênese e foliculogênese, LH: hormônio luteinizante.

O crescimento e a maturação folicular são controlados por uma perfeita interação entre fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. Segundo VAN DER HURK e ZHAO (2005) e LEITÃO et al. (2009) os fatores de crescimento, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) e Kit ligante (KL) são de

grande importância durante este processo, os quais podem atuar de diferentes formas durante a foliculogênese. Estes fatores de crescimento são produzidos pelo ovócito, células da granulosa e células da teca, frequentemente atuam modulando os efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (MAGALHÃES et al., 2009).

Segundo FIGUEIREDO et al. (2008) folículos podem ser classificados de acordo com o grau de evolução em folículos pré-antrais: primordiais, primários e secundários; e antrais: terciários.

2.3.1 Folículos pré-antrais

A maioria da população folicular ovariana é constituída por folículos pré-antrais correspondem a 90-95% da população folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

Segundo HULSHOF et al. (1994) os folículos pré-antrais (figura 3) são classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em:

- Folículos primordiais: são os primeiros e os menores folículos encontrados no ovário e consistem em um ovócito imaturo localizado no centro do folículo, circundado por uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa demarcada por uma lâmina basal que os separa do estroma ovariano e permanecem “inativos” até seu recrutamento.
- Folículos primários: ovócitos circundados por uma camada de células da granulosa de formato cubóide. Diariamente grupos de folículos primordiais são recrutados e os folículos iniciam seu crescimento de acordo com a ordem em que são formados.
- Folículos secundários: ovócitos circundados por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Nestes folículos, em estádios mais avançados, as fibras de tecido conjuntivo organizam-se paralelamente à lâmina basal para formar a camada de células tecaais e a zona pelúcida pode ser identificada.



Figura 3 - Classificação dos folículos pré-antrais, segundo Hulshof (1994)

2.3.2 Folículos antrais

Com intensa proliferação das células da granulosa, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, chamada antro (figura 4). O fluido antral é rico em substâncias reguladoras derivadas do sangue ou secreções das células foliculares, como gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento (LEITÃO et al., 2009). A produção desse fluido é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e da permeabilidade dos vasos sanguíneos que ocorrem com o desenvolvimento folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

A partir desse estágio, o diâmetro folicular aumenta gradativamente, devido ao crescimento do ovócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento da cavidade antral. No último estágio do desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório (figura 4) é caracterizado por um ovócito circundado por células especializadas da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2008).

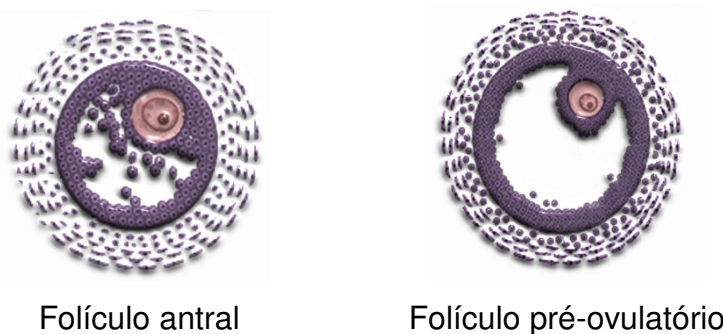


Figura 4 – Classificação dos folículos antrais, segundo Hulshof (1994)

3 A biotécnica MOIFOPA

A biotecnologia que manipula ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) visa aproveitar ao máximo o potencial reprodutivo de uma fêmea. Consiste em isolar do ovário o folículo *in situ*, conservar o folículo por curto (resfriamento) ou longo período (criopreservação) e/ ou cultivo folicular que tem a finalidade de promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* dos ovócitos previamente inclusos em FOPA (FIGUEIREDO et al., 2008).

A recuperação de FOPA para desenvolvimento, maturação e fecundação *in vitro* minimiza as perdas causadas pela atresia folicular. Deste modo esta biotécnica tem grande importância, aplicações e vantagens na reprodução humana e animal (FIGUEIREDO, 2009) (figura 5).

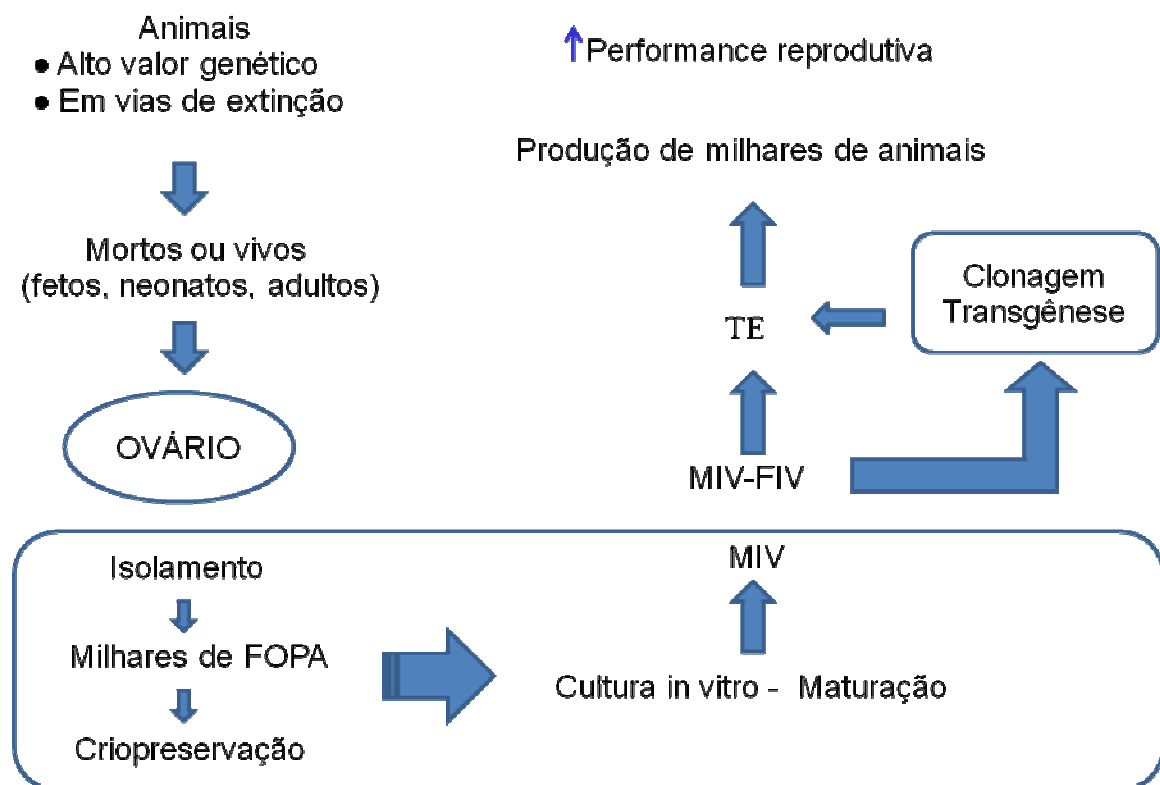


Figura 5 - Associação da biotécnica MOIFOPA com outras biotécnicas da reprodução. MIV-maturação *in vitro*; FIV-fecundação *in vitro*; TE- transferência de embriões.

Segundo Figueiredo (2009) as vantagens e aplicações da MOIFOPA envolve formação de bancos genéticos da espécie humana e de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção; redução de intervalo entre gerações utilizando ovários de animais jovens: fetos, recém nascidos e pré-púberes; utilização de animais que não respondem aos tratamentos de superovulação; obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte, desde que a colheita seja antes de sua degeneração; estudo da foliculogênese na fase pré-antral, visando identificar os mecanismos envolvidos na foliculogênese (epigenética) expressão de genes responsáveis pelo controle do crescimento de folículos pré-antrais; indústria farmacêutica: realização de teste *in vitro* da ação de fármacos sobre folículos; multiplicação de animais: possibilitando a produção *in vitro* de embriões em larga escala a partir de FOPA, recuperados de ovários inteiros ou de fragmentos ovarianos (biópsia), que seriam submetidos ao processo crescimento, maturação e fecundação *in vitro*; biosegurança: avaliar efeito da radioatividade sobre a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento folicular e preservar a fertilidade feminina nos casos de mulheres que se submeteram a tratamentos de radio ou quimioterapia que retiram seus ovários e os criopreserva para posterior autotransplante ou cultivo *in vitro*;

4 Técnicas de isolamento de folículos ovarianos pré-antrais - FOPA

Pesquisas vem sendo realizadas no sentido de estimar a população folicular ovariana em diversas espécies como suínos (ALVES, 2010; KERONG et al., 2007; GREENWALD; MOOR.,1989), ovinos (AMORIM et al., 2000), caprinos (RODRIGUES et al.,1998), bovino (BASSO et al., 2002, LUCCHI et al., 1999), felídeos (LIMA, 2006, JEWGENOW; STOLTE, 1996) e caninos (DURRANT et al., 1998).

Fatores como idade (DOMINGUES et al., 2003) e a espécie (JEWGENOW; STOLE, 1996) podem afetar quantitativamente a população folicular ovariana. Aproximadamente cerca de 90% da população ovariana é constituída por folículos pré-antrais, sendo estes os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (MACHADO et al., 2002).

Definir o melhor método de isolamento de folículos de forma a obter o maior número com a melhor viabilidade é o primeiro passo para a MOIFOPA (TELFER et

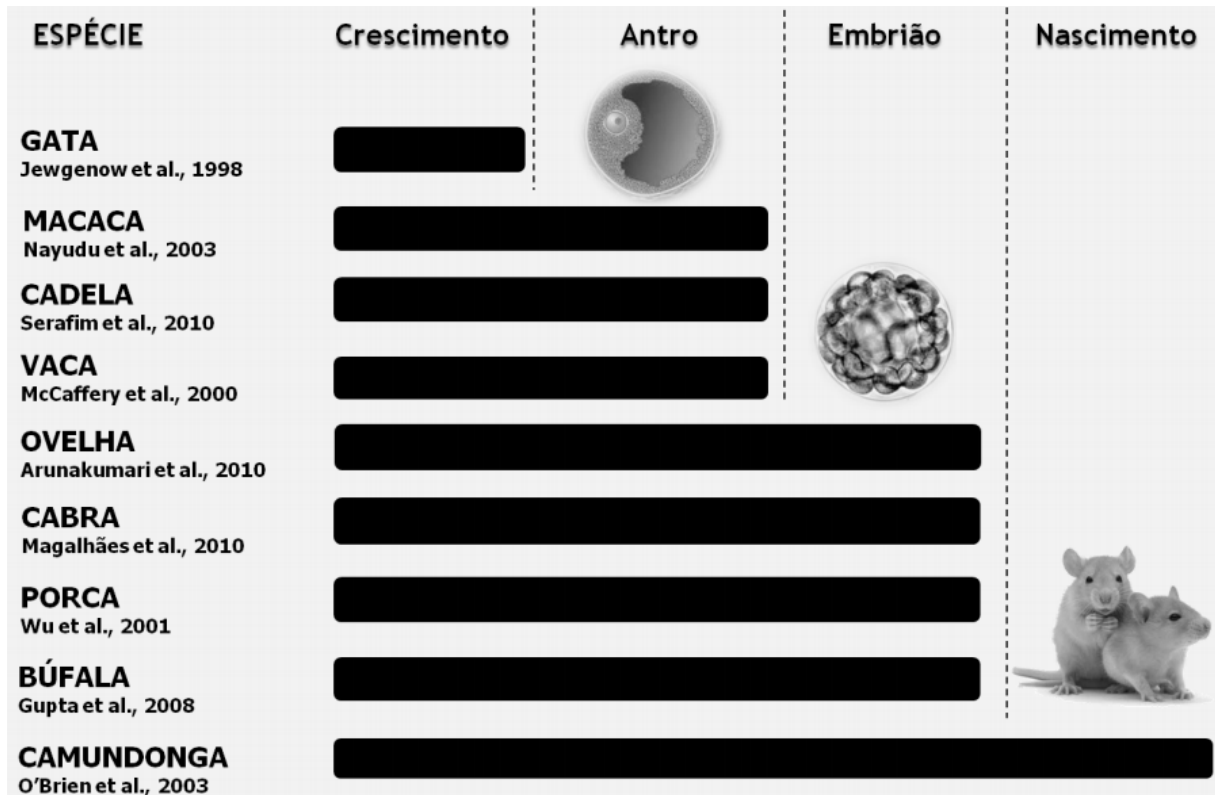
al., 1996). Os primeiros registros de estudos de FOPA isolados ocorreram nas décadas de 60 e 90 utilizando-se procedimentos enzimáticos em ovários de camundongos (GROB, 1964) e mecânico (FIGUEIREDO et al., 1993) em ovários da espécie bovina.

Os métodos de isolamentos de folículos ovarianos pré-antrais pode ser realizado pelo método mecânico demonstrado em bovinos (BASSO et al., 2007; LUCCI et al., 2002; BASSO; ESPER, 2002), ovinos (CECCONI et al., 1999; AMORIM et al., 2000), caprinos (RODRIGUES et al., 1998) e suínos (ALVES, 2010). pelo o método enzimático aplicado em camundongos (CARROL et al., 1991), hamsters (ROY; GREENWALD, 1985), caninos (DURRANT et al., 1998), humanos (ROY; TREACY, 1993), suínos (HIRAO et al., 1994; KERONG et al. 2007) e a associação destes dois métodos, em bovinos (FIGUEIREDO et al., 1993).

O isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc) utilizando-se para isto instrumentos mecânicos como tissue chopper, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes associados ou não ao método enzimático que utiliza enzimas proteolíticas, entre elas collagenase, tripsina e pronase (FIGUEIREDO et al., 2007).

5 Principais avanços obtidos com a utilização de FOPA de mamíferos em sistema *in vitro*

Diferentes métodos de cultivo *in vitro* têm sido desenvolvidos a fim de se manter a viabilidade, promover o crescimento de FOPA *in vitro* e obter ovócitos maduros para produção *in vitro* (PIV) de embriões (CHAVES et al., 2010) (figura 6).



Fonte: CHAVES et al. (2010)

Figura 6 - Principais avanços obtidos com a utilização de FOPA de mamíferos cultivados *in vitro*.

Pesquisas sobre o principais avanços de folículos ovarianos pré-antrais de mamíferos cultivados *in vitro* constam que somente houve nascimento em camundongas (O'BRIEN et al., 2003), formação de embriões em ovelhas (ARUNAKUMARI et al., 2010), cabras (MAGALHÃES et al., 2010), porcas (WU et al., 2001) e búfalas (GUPTA et al., 2008), crescimento dos folículos pré-antrais em gatas (JEWGENOW et al., 1998) e em macacas (NAYUDU et al., 2003), cadelas (SERAFIM et al., 2010) e vacas (Mc CAFFERY et al., 2000) os folículos evoluíram somente até o estágio de desenvolvimento antral.

6 Criopreservação de FOPA

Estudada em várias espécies como humanos (OKTAY et al., 1998) na preservação de ovários de mulheres submetidas a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos e que desejam recuperar sua fertilidade após cura do câncer, em

camundongos (CANDY et al., 1997), felinos (LIMA, 2006; JEWGENOW et al., 1998), caprinos (RODRIGUES et al. 2005; RODRIGUES et al. 2004 ab), ovinos (AMORIM et al., 2006; AMORIM et al., 2003; SANTOS et al., 2006 ab), caninos (LOPES, 2008), bovinos (LUCCI et al., 2004) e suínos (BORGES et al., 2009) visando multiplicar animais de elevado valor genético bem como animais em via de extinção.

Esta biotecnologia é utilizada na preservação de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido a -196°C , onde a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrem muito lentamente, no qual podem permanecer por um período indeterminado e, futuramente, serem resgatadas ainda viáveis a fim de continuarem o seu desenvolvimento normal após descongelação (DERMICI et al., 2001).

Existem dois fatores letais às células quando não tratadas adequadamente podem levar à morte celular durante o congelamento/ descongelamento: a formação de gelo intracelular e o choque osmótico, que podem ser reduzidos ou evitados com a utilização de crioprotetores (SHAW, 2000).

Quando os crioprotetores são adicionados, a água intracelular (solvente) deixa a célula e os crioprotetores intracelulares (soluto) a penetram, interagindo com a membrana celular, estabilizando as proteínas intracelulares e reduzindo o ponto de congelação, minimizando a formação de cristais de gelo, de maneira a conservar as estruturas celulares, aumentando a viscosidade do meio, diminuindo riscos a danos osmóticos (VAJTA, 2000). Apesar da ação benéfica dos crioprotetores deve-se considerar a toxicidade destas substâncias, que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação (OKTAY et al., 1998).

Estudos têm demonstrado que crioprotetores intracelulares como glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol nas concentrações de 1,5 e 3,0 M foram utilizados com sucesso para a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais (RODRIGUES et al., 2004ab).

Método de congelamento bastante utilizado em folículos ovarianos pré-antrais é o congelamento lento, onde FOPA são expostas a baixas concentrações de crioprotetor, acondicionada em congelador programável previamente estabilizado à temperatura de -6°C . Seguido de cristalização manual com objeto metálico congelado em nitrogênio líquido e resfriamento lento $0,5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ até -32°C e posteriormente armazenamento das palhetas em nitrogênio líquido -196°C (BORGES, 2009).

A criopreservação de folículos pré-antrais apresenta vantagem em relação aos folículos antrais, pois são disponíveis em maior quantidade, mais tolerantes ao processo de criopreservação, devido a algumas características como tamanho do folículo, baixo metabolismo celular, menor quantidade de lipídio intracitoplasmático, zona pelúcida ausente ou parcialmente formada (SHAW et al., 2000).

Referências

- ALVES, B. G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos**. 2010. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- AMORIM, C. A.; RONDINA, D.; LUCCHI, C. M.; GOLÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, R. J.; GIORGETTI, A. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1077-1081, 2006.
- AMORIM, A. C.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; GONÇALVES, D. B. P.; FIGUEIREDO, R. J.; GIORGETTI, A. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethyleneglycol. **Theriogenology**, v. 60, p. 735-742, 2003.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCHI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 269-277, 2000.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, in press, 2010.
- BARNETT, K.R., SCHILLING, C., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v. 12, p. 537-55, 2006.
- BASSO, A. C.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo in vitro sobre o crescimento de folículos préantrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 44, p. 134-143, 2007.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 311-319, 2002.
- BORGES, E. N. **Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais suínos**. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37-49, 2010.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 1, p. 11-19, 1997.

CARROL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, p. 71-79, 1991.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, 1999.

COSTA, R. N.; LUNA, H. S.; LIJERON, L. A.; ZUCCARI, C. E. S. N.; LAURA, I. A. Exposição de diferentes crioprotetores e concentrações sobre o diâmetro e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 252-259, 2010.

DERMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANXX, M.; GUERIN, J. F. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertility and Sterility**, v. 75, p. 754-762, 2001.

DOMINGUES, S.F.S.; FERREIRA, H.S.; MUNIZ, J.A.P.C. et al. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, p.301-308, 2003.

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

FIGUEIREDO, J. R. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **O Embrião**, n. 44, p. 8, Nov/Dez. 2009.

FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P. R., AMORIN, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2.edição. São Paulo: Roca, 2008, p. 303-327.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R. SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; AMORIN, C. A.; LUCCI, C. M. GONÇALVES, P. B. D. Utilização do potencial de oócitos imaturos incluídos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. **Ciência Animal**, v. 8, n.1, p. 23-29, 1998.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.

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

GROB, H. S. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. **Science**, v.146, n.3640, p.73-74, 1964.

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

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7a ed, São Paulo, Manole, 2004, 513p.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; SATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 333-339, 1994.

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

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

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

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats- viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 183-193, 1996.

KERONG, S.; XUEFENG, Y.; LIYING, D.; DENGKE, P. A. N.; YUNHAI, Z.; YONGHUI, Z.; XUEMEI, D.; XIAOXIANG, H.; CHANGXIN, W.; NING, L. Advanced methods of isolation and identification of porcine primordial follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 1637-171, 2007.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientie Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.

LIMA, A. K. F. **Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

LOPES, C. A. P. **Utilização de biotécnicas de manipulação de ovócitos incluídos em folículos pré-antrais para a avaliação in vitro do potencial de anticorpos antizona pelúcida para a imunoesterilização de cadelas**. 2008. 154f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÃO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Therogenology**, v. 61, n. 6, p. 1101-1114, 2004.

LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÃO, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Therigenology**, v. 57, p. 1467-1483, 2002.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 223-236, 1999.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, *in press*, 2010

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAUJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.171-182, 2009.

MACHADO, V. P.; RODRIGUES, A. P. R.; BRASIL, A. F.; AMORIM, C. A.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, v. 12, p. 83-91, 2002.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 1, p.36-49. 2008.

McCAFFERY, F. H, LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 267–273, 2000.

NAYUDU, P. L.; WU, J.; MICHEKMANN, H. W. In vitro development of marmoset monkey oocytes by pre-antral follicle culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 90-96, 2003.

O`BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPING, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 1682-1686, 2003.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUSBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology. **Fertility and Sterility**, v. 354, p. 1-7, 1998.

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

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

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

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; BRASIL, A. F.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de oócitos mamíferos: importância, estado atual, limitações e perspectivas. **Ciências Animal**, v.11, n. 2. p. 101-112, 2001

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; LUCCHI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D.; BEM, A. R. Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 477-482, 1998.

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

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 783-790, 1993.

SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; FIGUEIREDO, J. R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré antrais ovinos utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 250-255, 2006a.

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

SENEDA, M. M.; SILVA, K. C. F. Epigenética e neo-oogênese: novos conceitos em foliculogênese Epigenetic and neo-oogenesis: new concepts on folliculogenesis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 3, p.111-117, 2009.

SERAFIM, M. K. B.; ALMEIDA, A. P.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, G. M.; ARAUJO, V. R.; CHAVES, R. N.; SILVA, L. D. M.; FIGUEIREDO, J. R, CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A. P. Canine preantral follicles culture at different concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, *in press*, 2010.

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

TELFER, E. E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. **Theriogenology**, v. 45, p.101-110, 1996.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 357-364, 2000.

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

WU, J.; BENJAMIN, R. E.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

Capítulo 2 - Quantificação e qualificação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente em diferentes intervalos de cortes

Quantificação e qualificação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente em diferentes intervalos de cortes

Resumo

Objetivou-se neste estudo isolar mecanicamente, em dois intervalos de secção, quantificar e qualificar folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes. Ovários ($n = 18$) de marrãs pré-púberes foram seccionados em tissue chopper em intervalos de 250 e 500 μm . A quantificação folicular foi realizada em câmara de Neubauer e a análise de viabilidade em microscópio, utilizando-se o corante fluorescente iodeto de propídeo. No intervalo de corte de 250 μm o número médio de folículos isolados foi de 168.889 ± 69.017 , enquanto que no corte de 500 μm o número médio foi de 180.000 ± 92.800 , sendo que em ambos os intervalos o número médio de folículos pré-antrais foram estatisticamente iguais. A taxa de viabilidade folicular foi de 76,50% e 74,08% nos intervalos de corte 250 e 500 μm , respectivamente, não apresentando diferença estatística. Conclui-se que ambos os intervalos de cortes (250 e 500 μm) podem ser utilizados no isolamento de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes com a mesma eficiência.

Palavras-chave: Iodeto de Propídeo. Ovário. Tissue Chopper. Marrãs.

Abstract

The aim of this study was to isolate mechanically, in two intervals of section, quantify and qualify preantral ovarian follicles from pre pubertal gilts. Eighteen ovaries (n = 18) of pre pubertal gilts were sectioned in tissue chopper in intervals of 250 and 500 μm . The follicular quantification was performed using Neubauer chamber and the analysis of viability in microscope using staining Propidium iodide. On the interval of 250 μm the mean number was 168.889 ± 69.017 , while on the section of 500 μm the mean number was 180.000 ± 92.800 , being that both intervals the mean number of preantral follicles were statistically the same. The rate of follicle viability was 76,50% and 74,08% on the intervals of section 250 and 500 μm , respectively, do not showing statistical difference. It concludes that both intervals of section (250 e 500 μm) can be used on the isolation of pre antral ovarian follicles from pre pubertal gilts with the same efficiency.

Key- words: Propidium iodide. Ovary. Tissue Chopper. Gilts.

Introdução

Os métodos atuais para a produção *in vitro* de embriões dependem de ovócitos competentes de folículos antrais ou de folículos pré-ovulatórios, que estão presentes no ovário. Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representam cerca de 90-95% de toda a população folicular (MACHADO et al., 2002) e podem ser importante fonte de ovócitos para pesquisas e, mesmo, no futuro, servirem comercialmente. A maioria da população de folículos pré-antrais (99,9%) presentes nos ovários mamíferos morre por atresia e somente 0,01% destes folículos chegam à ovulação (FIGUEIREDO et al., 1998).

Considerando que a maioria dos ovócitos será eliminada pelo processo de atresia, caso permaneçam no interior dos ovários, a biotécnica de manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) permite a obtenção de grande número de ovócitos provenientes de folículos pré-antrais, visando multiplicar animais de elevado valor genético bem como animais em via de extinção (LUCCI et al., 2002).

Os folículos pré-antrais podem ser isolados do tecido ovariano pelo método mecânico com auxílio de instrumentos como tissue chopper, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes, utilizado em bovinos (BASSO et al., 2007, LUCCI et al., 2002; BASSO; ESPER, 2002), ovinos (CECCONI et al., 1999; AMORIM et al., 2000), caprinos (RODRIGUES et al., 1998) e suínos (ALVES, 2010). Pelo método enzimático os folículos podem ser isolados com o uso de enzimas proteolíticas como colagenase, tripsina e pronase, já adotadas em estudos com camundongos (CARROL et al., 1991), caninos (DURRANT et al., 1998), humanos (ROY; TREACY, 1993), suínos (HIRAO et al., 1994; KERONG et al. 2007) ou associação destes dois métodos, bovinos (FIGUEIREDO et al., 1993).

Pesquisas sendo realizadas no sentido de estimar a população folicular ovariana em diversas espécies como em suínos (ALVES, 2010; KERONG et al., 2007; GREENWALD; MOOR., 1989), ovinos (AMORIM et al., 2000), caprinos (RODRIGUES et al., 1998), bovino (BASSO et al., 2002, LUCCI et al., 1999), felídeos (LIMA, 2006, JEWGENOW; STOLTE, 1996) e caninos (DURRANT et al., 1998).

Fatores como idade (DOMINGUES et al., 2003) e a espécie (JEWGENOW; STOLE, 1996) podem afetar quantitativamente a população folicular ovariana. Aproximadamente cerca de 90% da população ovariana é constituída por folículos

pré-antrais, sendo estes os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (MACHADO et al., 2002).

Objetivou-se com este estudo isolar mecanicamente, quantificar e classificar qualitativamente folículos ovarianos pré-antrais de marrãs utilizando dois diferentes intervalos de cortes.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nos laboratórios de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Morfologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

Foram utilizados 18 ovários de marrãs pré-púberes sem raça definida (SRD), de aproximadamente 150 dias de idade e peso médio de 90 Kg, obtidos de frigorífico local da cidade de Uberlândia-MG. Após a coleta, os ovários foram acondicionados em tubos plásticos com solução tampão fosfatada (PBS) resfriada a 4°C e conduzidos ao laboratório dentro de uma caixa térmica, conforme Lucci et al. (2007).

Os ovários foram divididos ao meio em duas partes iguais, com o auxílio de uma lâmina de bisturi. O procedimento de isolamento mecânico foi realizado em tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering CO, Gomshal, Surrey, England), sendo uma parte do ovário seccionada em 250 µm e a outra em 500 µm. Os cortes foram realizados nos eixos longitudinal e transversal. Os fragmentos ovarianos obtidos foram diluídos em 20 mL PBS. Os folículos foram dissociados mecanicamente por repetidos movimentos de sucção e ejeção, utilizando-se sucessivamente, pipetas de Pasteur com diâmetro de entrada de 1600 µm (40 movimentos) e 600 µm (40 movimentos). A suspensão obtida foi sucessivamente filtrada em malhas de náilon de 500 µm e 100 µm de diâmetro, respectivamente, com a finalidade de separar os folículos pré-antrais dos fragmentos de tecido ovariano (figura 1), baseado em AMORIM et al. (2000).

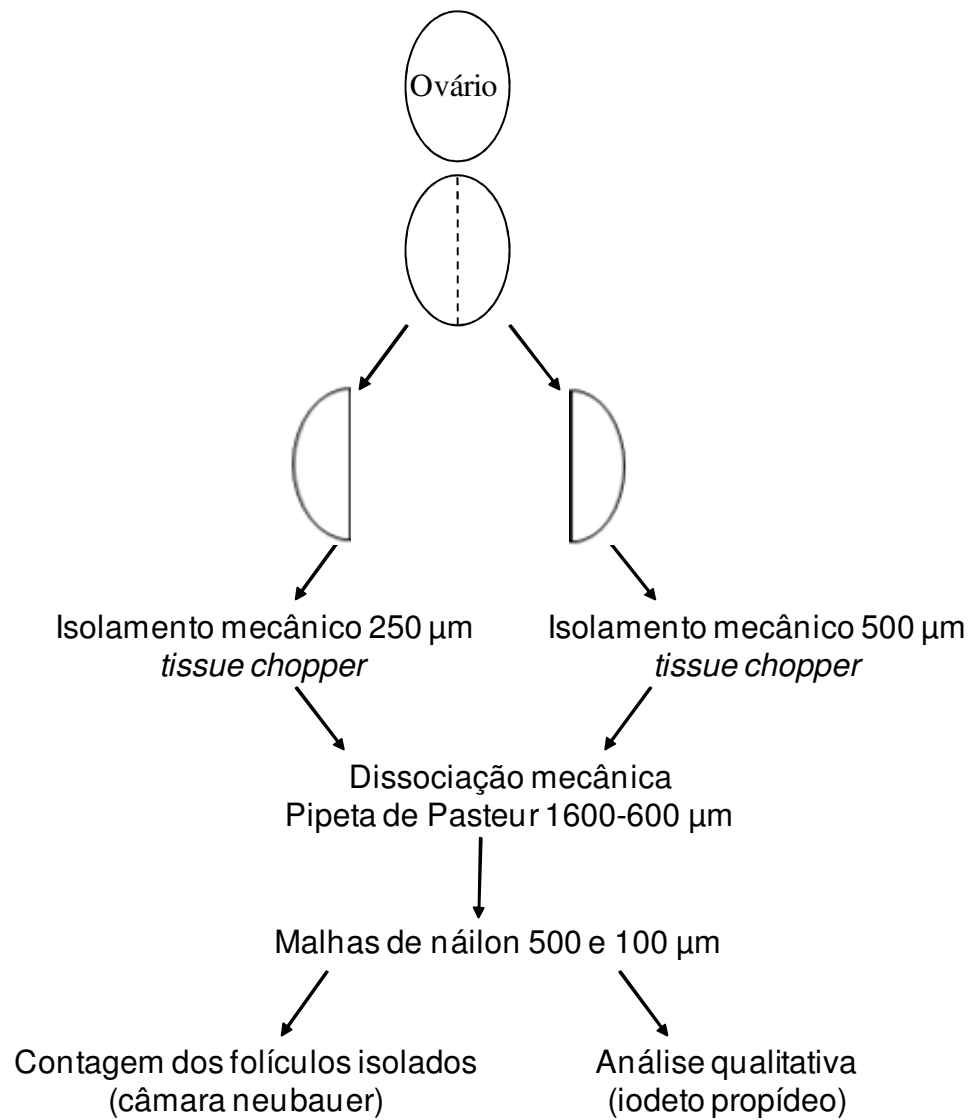
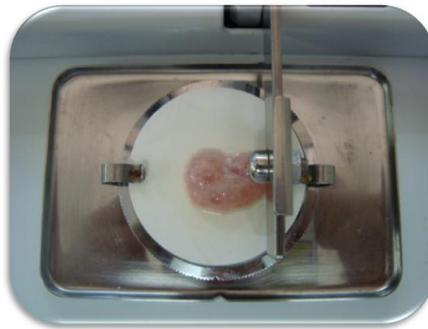


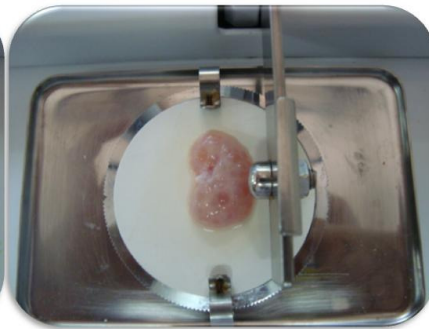
Figura 1 - Sequência da metodologia utilizada para isolamento mecânico, quantificação e análise qualitativa de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes



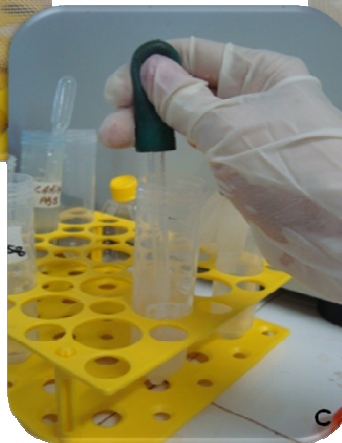
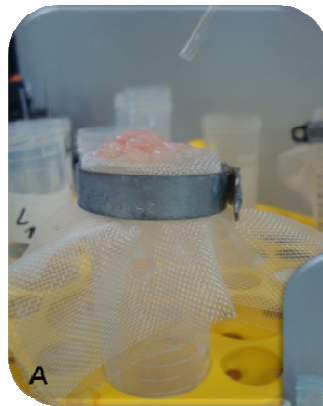
Tissue chopper



Corte longitudinal



Corte transversal



Arquivo pessoal

A: Malha de náilon de 500 µm; B: Malha de náilon de 100 µm e
C: Dissociação mecânica (Pipeta de Pasteur)

Figura 2 – Procedimento de isolamento mecânico

Os FOPA foram quantificados em câmara de Neubauer nos dois intervalos de cortes (250 e 500 μm). Foi retirada da suspensão de FOPA uma amostra de 1000 μL para cada intervalo de corte. Nas amostras foi adicionado 1 μL (10 μg) do corante fluorescente iodeto de propídeo (IP) (P3566: Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram incubadas em estufa a 37°C, ao abrigo da luz, por 20 minutos e posterior leitura em microscópio invertido, 200x (Axiovert® 200 M) (AMORIM et al., 2000).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Bioestat® 5.0. Os dados referentes à quantificação folicular em câmara de Neubauer foram submetidos ao teste t. Para a avaliação da viabilidade folicular utilizou-se o teste não paramétrico Man-Whitney. Os testes foram significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

O número de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente (tissue chopper) obteve grande variação nos dois intervalos de cortes (250 e 500 μm). No intervalo de corte de 250 μm o número médio de folículos isolados foi de 168.889 ± 69.017 (mínimo de 40.000 e máximo de 280.000) e no de 500 μm , observou-se média de 180.000 ± 92.800 (mínimo de 60.000 e máximo de 400.000), sendo ambos os intervalos de cortes estatisticamente iguais ($p > 0,05$, tabela 1).

Tabela 1 – Número médio de folículos pré antrais isolados mecanicamente, pelo tissue chopper, por ovário de marrãs pré-púberes em diferentes intervalos de cortes (250 e 500 μm)

Intervalo de cortes	Nº de folículos isolados/corte	
	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mínimo-Máximo
250 μm	168.889 ± 69.017 a	40.000 – 280.000
500 μm	180.000 ± 92.800 a	60.000 – 400.000

Valores com letras minúscula diferentes na mesma coluna diferem entre si. Teste t.

A viabilidade dos folículos analisada por meio do corante fluorescente IP foi de 76,50% e 74,08% nos intervalos de corte 250 e 500 μm , respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas ($p > 0,05$; tabela 2).

Os folículos que apresentaram núcleo corado de vermelho (iodeto propídeo) foram classificados como não viáveis e os não corados foram considerados viáveis, sendo estes de interesse na criopreservação e cultivo.

Tabela 2 – Porcentual de folículos ovarianos pré-antrais viáveis isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes em diferentes intervalos de cortes (250 e 500 μm)

Intervalo de cortes	% Viáveis	% Não Viáveis
250 μm	76,50 (420/549) a	23,49 (129/549) a
500 μm	74,08 (403/544) a	25,91 (141/544) a

Valores com letras minúscula diferentes na mesma coluna diferem entre si. Teste de Man-Whitney ($p < 0,05$)

Discussões

Os resultados obtidos demonstraram que os folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes podem ser isolados em grande número nos dois intervalos de corte testados. Ao longo da vida do animal, ocorre uma redução gradativa do número de FOPA. Essa redução deve-se a dois fenômenos que ocorrem naturalmente no ovário, à ovulação e a atresia. Somente uma pequena parte (0,01%) dos folículos primordiais chega à ovulação, enquanto os demais se tornam atrésicos.

Assim, como neste estudo e resultados disponíveis na literatura existe grande variação no número de folículos ovarianos pré-antrais isolados em diferentes espécies. No presente estudo o intervalo de corte de 500 μm apresentou média de 180.000 folículos/ ovário, valor próximo à média de folículos ovarianos de suínos (185.000 folículos/ovário) isolados enzimaticamente por Greenwald e Moor (1989). Alves (2010) isolou, por meio de procedimento mecânico (tissue chopper), média de 599.160 folículos/ovário de marrãs pré-púberes, entretanto a metodologia de contagem foi realizada em placa de Petri. Kerong et al. (2007) isolaram enzimaticamente média de 779.000 folículos/ ovário de fêmeas suínas. Em ovinos, Amorim et al. (2000) isolaram mecanicamente média de 1.592 folículos/ovário. Rodrigues et al. (1998) e Basso et al. (2002) isolaram mecanicamente em média 1.126 e 35.539 folículos/ovário em caprinos e bovinos, respectivamente. Já

Jewgenow e Stolte (1996), também por procedimento mecânico, observaram 2.892 e 1.867 folículos/ovário de felídeos domésticos e não domésticos, respectivamente.

Quanto ao método de isolamento a ser utilizado, é importante considerar algumas particularidades de cada procedimento. Ao contrário dos procedimentos mecânicos, a utilização de enzimas para isolamento de folículos pré-antrais requer maior controle, principalmente em relação ao tempo de exposição do tecido ovariano à enzima (GROB, 1964). A utilização de enzimas pode representar alguns riscos para os folículos, como por exemplo, danos à membrana basal e ruptura das junções entre as células foliculares (NICOSIA et al., 1975), além do comprometimento da viabilidade folicular (WANDJI et al., 1996).

O método ideal de isolamento de folículos deve ter maior número de folículos isolados e melhor viabilidade, porém nem sempre é possível conciliar estas duas características simultaneamente. É preferível isolar menor número de folículos pré-antrais viáveis a isolar número maior de FOPA de baixa viabilidade. Uma das formas de avaliar a viabilidade folicular é analisando a integridade da membrana celular com corantes fluorescentes, como o iodeto de propídeo, corante de coloração avermelhada que cora células que apresentam incapacidade de expulsar o mesmo pela desativação do sistema de transporte ativo (MATOS et al., 2007).

Alves (2010) utilizando o corante iodeto de propídeo no “pool” de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes obteve taxa de 76,44 % de viabilidade. Neste estudo a taxa de viabilidade foi bastante satisfatória (76,50 e 74,08%), respectivamente, para os cortes de 250 e 500 µm. Em folículos pré-antrais de fetos caprinos, Machado et al. (2002) observaram taxa de viabilidade 84,6% (método enzimático) e 75% (método mecânico). Em fetos bubalinos, corte de 75 µm, Santos et al. (2006) obtiveram 76% de viabilidade folicular.

Estudos relacionados à produção de embriões a partir de ovócitos de folículos pré-antrais desenvolvidos *in vitro* necessitam de grandes quantidades de folículos viáveis para os sistemas de cultivo. Os resultados deste estudo confirmaram a possibilidade de se obter número suficiente de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes pelo uso do fatiador de tecido (tissue chopper), de maneira a preservar a viabilidade dos folículos para que possam ser criopreservados e cultivados.

Conclusão

Os dois intervalos de cortes, 250 e 500 μm , podem ser utilizados no isolamento de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes com a mesma eficiência.

Agradecimento

À FAPEMG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão financeira.

Referências

ALVES, B. G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos**. 2010. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 269-277, 2000.

BASSO, A. C.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo in vitro sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p.134-143, 2007.

BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 311-319, 2002.

CARROL, J.; WHITTINGHAN, D. G.; WOOD, M. J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 93, p. 71-79, 1991.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, 1999.

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

FIGUEIREDO, J. R.; AMORIN, C. A.; LUCCI, C. M. GONÇALVES, P. B. D. Utilização do potencial de oócitos imaturos incluídos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. **Ciência Animal**, v. 8, n.1, p. 23-29, 1998.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p.789-799, 1993.

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

GROB, H. S. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. **Science**, v. 45 146, p. 73-74, 1964.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; SATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 333-339, 1994.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 183-193, 1996.

KERONG, S.; XUEFENG, Y.; LIYING, D.; DENGKE, P. A. N.; YUNHAI, Z.; YONGHUI, Z.; XUEMEI, D.; XIAOXIANG, H.; CHANGXIN, W.; NING, L. Advanced methods of isolation and identification of porcine primordial follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 1637-171, 2007.

LIMA, A. K. F. **Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

LUCCI, C. M.; SCHEREIER, L. L.; MACHADO, V. P.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; DOBRINSKY, J. R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 76-82, 2007.

LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of and efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, p. 1467-1483, 2002.

MACHADO, V. P.; RODRIGUES, A. P. R.; BRASIL, A. F.; AMORIM, C. A.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, v. 12, p. 83-91, 2002.

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

NICOSIA, S. V.; EVANGELISTA, I.; BATTÀ, S. K. Rabbit ovarian follicles. Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biology of Reproduction**, v. 13, p. 423-447, 1975.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D.; BEM, A. R. Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 477-482, 1998.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 783-790, 1993.

SANTOS, S. S. D.; BIONDI, F. C.; CORDEIRO, M. S.; MIRANDA, M. S.; DANTAS, J. K.; FIGUEIREDO, J. R. OHASHI, O. M. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p.1-15, 2006.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, 1996.

Capítulo 3 - Teste de toxicidade e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente utilizando glicerol

Teste de toxicidade e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente utilizando glicerol

Resumo

Objetivou-se neste estudo avaliar a toxicidade e a eficiência do glicerol na criopreservação, nas concentrações de 1,5 e 3 M, sobre a viabilidade de FOPA de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente, após exposição e criopreservação. Foram utilizados (n=12) ovários de marrãs pré-púberes e processados mecanicamente com fatiador de tecido (tissue chopper) com intervalo de corte de 250 µm. Para teste de toxicidade foram adicionados glicerol na concentração final de 1,5 e 3 M. A taxa de viabilidade dos folículos pré-antrais no grupo controle sem glicerol 72,72 %, após exposição ao glicerol 1,5 M (tox-1,5) e 3 M (tox-3) foi 62,15% e 12,07%, respectivamente, sendo que não houve diferença estatística entre o controle sem glicerol e o tox-1,5 e sim entre controle sem glicerol e tox-3 e entre tox-1,5 e tox-3. Após o procedimento de criopreservação/ descongelamento o número de folículos pré-antrais viáveis foi de 18,88% no grupo glicerol 1,5 M (crio-1,5) e 2,81% no grupo glicerol 3 M (crio-3) não apresentaram diferenças significativas . Em crio-1,5 e crio-3 as taxas de viabilidade em relação ao grupo controle sem glicerol (72,72%) apresentaram-se baixas e significativamente diferentes e entre crio-1,5 e crio-3 não foram significativas. A análise de viabilidade do teste de toxicidade e de criopreservação/ descongelamento com o glicerol, na concentração de 1,5 M (tox-1,5 e crio-1,5) foi significativamente menor em crio-1,5, enquanto que esta mesma análise na concentração 3 M (tox-3 e crio-3) não houve diferenças. Conclui-se que os folículos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes após exposição ao glicerol 1,5 M apresentaram melhor taxa de viabilidade, porém em ambas as concentrações 1,5 e 3 M a criopreservação não foi satisfatória.

Palavras-chave: Congelamento. Viabilidade. Ovário. Marrãs.

Test of toxicity and cryopreservation of pre antral ovarian follicle from gilts isolated mechanically using glycerol

Abstract

The aim of this study it was evaluate the toxicity and efficiency of glycerol on the cryopreservation on the concentration of 1, 5 and 3 M, on the viability of ovarian pre antral follicles from gilts isolated mechanically, after exposition and cryopreservation. Twelve ovaries from gilts (n=12) were used and processed mechanically with cutting tissue (tissue chopper) with interval of section com 250 µm. To the test of toxicity, glycerol was added on the final concentration of 1,5 and 3 M. The viability rate of preantral follicles on the control group without glycerol 72,72 %, after exposition to glycerol 1,5 M (tox-1,5) and 3 M (tox-3) was 62,15% and 12,07%, respectively, being that , there was no statistical difference between control without glycerol and tox-1,5 and there was between control without glycerol and tox-3 and between tox-1,5 and tox-3. After the cryopreservation/ thawing procedure the number of viable preantral follicles was 18,88% on the group 1,5 M (cryo-1,5) and 2,81% on the group glycerol 3 M (cryo-3) did not show significant difference. At cryo -1,5 and cryo-3 the rates of viability in relation to the control group without glycerol (72,72%) showed low and significantly different and between cryo-1,5 and cryo-3 was not significant. The analysis of the viability test and cryopreservation/thawing with glycerol, on the concentration 1,5 M (tox-1,5 and cryo-1,5) was significantly lower at cryo-1,5, while the same analysis on the concentration of 3M (tox-3 e cryo-3) there was no difference. In conclusion, the preantral follicles from gilts isolated mechanically after exposition to glycerol 1,5 M showed best rate of viability, however in both concentrations 1,5 and 3 M the cryopreservation was not satisfactory.

Key-words: Frozen. Viability. Ovary. Gilts.

Introdução

A manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica da reprodução que vem sendo aprimorada e consiste no isolamento, conservação (resfriamento e criopreservação) e/ou cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, visando à estocagem, ativação, crescimento e maturação *in vitro* dos folículos (FIGUEIREDO et al., 2007).

Desta forma, será possível obter de um único ovário milhares de FOPA cultivados e submetidos a outras biotécnicas da reprodução como a fecundação *in vitro*, viabilizando a produção *in vitro* de um grande número de embriões.

Na medicina veterinária, o principal objetivo desta biotécnica é recuperar um grande número de ovócitos inclusos nestes folículos por meio do isolamento e cultivo *in vitro*, visando multiplicar animais de elevado valor genético bem como contribuir na preservação de animais em via de extinção (LUCCI et al., 2002).

O isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc) utilizando-se para isto instrumentos mecânicos como tissue chopper, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes associados ou não ao enzimático que utiliza enzimas proteolíticas, entre elas collagenase, tripsina e pronase (FIGUEIREDO et al., 2007).

A criopreservação permite que as células sejam submetidas a uma redução do metabolismo, no qual podem permanecer por um período indeterminado e, futuramente, serem resgatadas ainda viáveis a fim de continuarem o seu desenvolvimento normal após descongelamento.

Criopreservar folículos ovarianos pré-antrais em suspensão (pool) é diferente de criopreservar estas células *in situ*. *In situ* a difusão dos crioprotetores é mais difícil, já que o estroma ovariano é muito rico em células, as quais estão juntamente posicionadas de maneira que há a formação de gelo no espaço intercelular podendo danificar as células.

Esta biotecnologia vem sendo estudada em várias espécies como humanos (OKTAY et al., 1998) na preservação de ovários de mulheres submetidas a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos e que desejam recuperar sua fertilidade após cura do câncer, em camundongos (CANDY et al., 1997), felinos (LIMA et al., 2006; JEWGENOW et al., 1998), caprinos (RODRIGUES et al., 2005;

RODRIGUES et al., 2004 ab), ovinos (AMORIM et al., 2006; AMORIM et al., 2003, SANTOS et al., 2006ab), caninos (LOPES, 2008), bovinos (COSTA et al., 2010; LUCCI et al., 2004) e suínos (BORGES et al., 2009), porém por meio de isolamento mecânico de FOPA com fatiador de tecidos (tissue chopper) pouco sabe sobre a viabilidade folicular após a exposição ao crioprotetor e à criopreservação/descongelamento.

Objetivou-se com este estudo avaliar a toxicidade (tox-1,5 e tox-3) e a eficiência do glicerol na criopreservação (crio-1,5 e crio-3,0), nas concentrações de 1,5 e 3 M, sobre a viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente, após exposição e criopreservação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nos laboratórios de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Morfologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

Foram utilizados 12 ovários de marrãs pré-púberes sem raça definida (SRD) de aproximadamente 150 dias de idade e peso médio de 90 Kg obtidos de frigorífico local da cidade de Uberlândia-MG. Cada tratamento foi repetido 12 vezes. Após a coleta, os ovários foram acondicionados em tubos plásticos com solução tampão fosfatada (PBS), resfriada a 4°C (LUCCI et al., 2007) e conduzidos ao laboratório dentro de uma caixa térmica.

O procedimento de isolamento mecânico foi realizado em tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering CO., Gomshal, Surrey, England), com intervalo de corte de 250 µm. Os cortes foram realizados nos eixos longitudinal e transversal. Os fragmentos ovarianos obtidos foram diluídos em 20 mL PBS. Os folículos foram dissociados mecanicamente por repetidos movimentos de sucção e ejeção, utilizando-se sucessivamente, pipetas de Pasteur com diâmetro de entrada de 1600 µm (40 movimentos) e 600 µm (40 movimentos). A suspensão obtida foi sucessivamente filtrada em malhas de náilon de 500 µm e 100 µm de diâmetro, respectivamente, com a finalidade de separar os de folículos pré-antrais dos fragmentos de tecido ovariano (AMORIM et al., 2000).

Para o teste de toxicidade glicerol a 1,5 M (tox-1,5) e glicerol a 3 M (tox-3) e criopreservação para glicerol a 1,5 M (crio1,5) e para glicerol a 3 M (crio3). Utilizou-se solução de glicerol à 3 e 6 M em PBS com 2% de soro fetal bovino (SFB). Para obter-se concentração final de 1,5 e 3,0 M adicionou-se 1 mL da solução de glicerol à 1 mL de cada amostra.

Da suspensão de FOPA foram retiradas 5 amostras de 1 mL cada. No grupo controle sem glicerol adicionou-se a 1 mL da amostra, 1 µL do (10 µg do iodeto de propídeo/µL), corante fluorescente iodeto propídeo (IP) (P3566: Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) que foi incubada em estufa a 37°C, ao abrigo da luz, por 20 minutos e, posterior, leitura em microscópio invertido 200x (Axiovert® 200 M)(AMORIM et al., 2000). Os folículos que apresentaram núcleo corado de vermelho (iodeto propídeo) foram classificados como não viáveis e os folículos não corados foram considerados viáveis, sendo estes de interesse na criopreservação.

No teste de toxicidade do glicerol adicionou-se a 1 mL da amostra, 1 mL da solução de glicerol à 3 M e 6 M (PBS a 2%SFB), respectivamente (tox-1,5 e tox-3) em tubos plásticos de 2 mL. Após período de estabilização de 20 minutos à temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas duas vezes (1000 rpm/ 20°/ 2 min.) para remoção do glicerol e posterior análise da viabilidade com IP conforme protocolo do grupo controle.

No processo de criopreservação os grupos crio 1,5 e crio 3 M receberam o mesmo glicerol do teste de toxicidade, respectivamente (3 e 6 M). Após o término do período de estabilização de 20 minutos à temperatura ambiente cada amostra foi envasada em quatro palhetas de 0,5 mL e acondicionada em congelador programável (TK 3000 SE COMPACTA) previamente estabilizado à temperatura de -6°C. Decorridos 2 minutos, com auxílio de uma pinça imersa em nitrogênio líquido era feita a cristalização manual (*seeding*), após 15 min iniciava-se o resfriamento lento 0,5°C/ min até -32°C, em seguida as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido - 196°C.

Após 10 dias de congelamento, as palhetas foram retiradas do nitrogênio e expostas à temperatura ambiente por 10 segundos e então colocadas em banho-maria a 37°C, até o completo descongelamento (30 segundos). As amostras descongeladas foram colocadas em tubos plásticos de 2 mL, centrifugadas e coradas com IP, seguindo o mesmo protocolo adotado para os grupos controle, tox-1,5 e tox-3.

As análises dos efeitos das concentrações de glicerol 1,5 e 3 M em relação ao controle sobre a viabilidade de FOPA isolados após a exposição e criopreservação/descongelamento foram realizadas pelo teste não paramétrico de Friedman utilizando-se o programa Instat 3.0, sendo valores considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

O método de isolamento mecânico utilizando fatiador de tecidos (tissue chopper) permitiu o isolamento de grande número de folículos pré-antrais. A taxa de viabilidade dos folículos pré-antrais no grupo controle sem glicerol 72,72%, após exposição ao glicerol 1,5 M (tox-1,5) e 3 M (tox-3) foi 62,15% e 12,07%, respectivamente, sendo que não houve diferença estatística entre o controle sem glicerol e o tox-1,5 e sim entre controle sem glicerol e tox-3 e entre tox-1,5 e tox-3 (tabela 1).

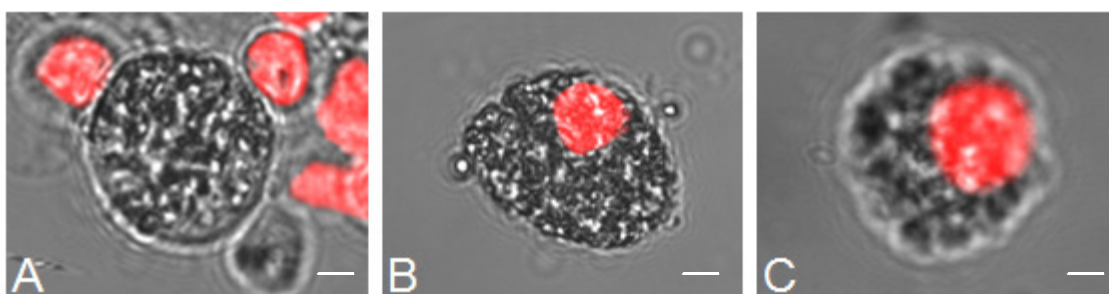


Figura 1 - Análise da viabilidade de folículos pré-antrais de mães pré-púberes isolados mecanicamente após exposição ao glicerol 1,5 e 3 M utilizando-se o corante fluorescente iodeto propílico em microscopia de fluorescência. (A) folículo pré-antral viável; (B) folículo não viável após glicerol 1,5 M e (C) folículo não viável após glicerol 3 M, barra 10 μm

Tabela 1 - Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis, após o exposição ao glicerol nas concentrações de 1,5 e 3 M

FOPA	Controle	Teste de toxicidade	
		Tox-1,5	Tox-3
Viáveis (%)	72,72 a	62,15 a	12,07 b
Viáveis/Total	264/363	225/361	39/323

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Friedman

Tox-1,5: Teste de toxicidade com glicerol a 1,5 M

Tox-3: Teste de toxicidade com glicerol a 3 M

Após o procedimento de criopreservação/ descongelamento a taxa de viabilidade folicular foi de 18,88% no grupo glicerol 1,5 M (crio-1,5) e 2,81% no grupo glicerol 3 M (crio-3) não apresentaram diferenças significativas. Em crio-1,5 e crio-3 as taxas de viabilidade em relação ao grupo controle sem glicerol (72,72%) apresentaram-se baixas e significativamente diferentes e entre crio-1,5 e crio-3 não foram significativas (tabela 2).

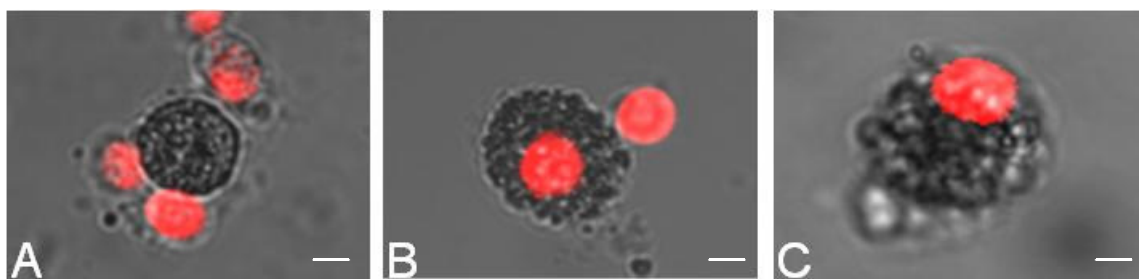


Figura 2 - Análise da viabilidade de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente após exposição ao glicerol 1,5 e 3 M utilizando-se o corante fluorescente iodeto propídeo em microscopia de fluorescência. (A) folículo pré-antral viável; (B) folículo não viável após criopreservação/ descongelamento com glicerol 1,5 M e (C) folículo não viável após criopreservação/ descongelamento com glicerol 3 M, barra 10 μ m

Tabela 2 - Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis, após a criopreservação/ descongelamento com glicerol nas concentrações de 1,5 e 3 M

Teste de criopreservação/ descongelamento			
FOPA	Controle	Crio-1,5	Crio-3
Viáveis (%)	72,72 a	18,88 b	2,81 b
Viáveis/Total	264/363	225/361	10/355

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste Friedman

Crio-1,5: Teste de criopreservação com glicerol a 1,5 M

Crio-3: Teste de criopreservação com glicerol a 3 M

A análise de viabilidade do teste de toxicidade e de criopreservação/ descongelamento com o glicerol, na concentração de 1,5 M (tox-1,5 e crio-1,5) foi significativamente menor em crio-1,5 (tabela 3), enquanto que esta mesma análise na concentração 3 M (tox-3 e crio-3) não houve diferenças (tabela 4).

Tabela 3 - Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis comparando o teste de toxicidade e criopreservação/ descongelamento com glicerol na concentração de 1,5 M

Teste de toxicidade e criopreservação/ descongelamento			
FOPA	Controle	Tox-1,5	Crio-1,5
Viáveis (%)	72,72 a	62,15 a	18,88 b
Viáveis/Total	264/363	225/361	225/361

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Friedman

Tox-1,5: Teste de toxicidade com glicerol a 1,5 M

Crio-1,5: Teste de criopreservação com glicerol a 1,5 M

Tabela 4 - Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes viáveis comparando teste de toxicidade e criopreservação/ descongelamento com glicerol na concentração de 3 M

Teste de toxicidade e criopreservação/ descongelamento			
FOPA	Controle	Tox-3	Crio-3
Viáveis (%)	72,72 a	12,07 b	2,81 b
Viáveis/Total	264/363	39/323	10/355

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Teste de Friedman

Tox-3: Teste de toxicidade com glicerol a 3 M

Crio-3: Teste de criopreservação com glicerol a 3 M

Discussões

Estudos têm demonstrado que a exposição do tecido ovariano ou de folículos pré-antrais isolados ao glicerol resulta em uma redução na porcentagem de folículos viáveis em diferentes espécies como em camundongos (CANDY et al., 1997), felinos (LIMA, 2006; JEWGENOW et al., 1998), caprinos (RODRIGUES et al. 2005; RODRIGUES et al. 2004ab), ovinos (SANTOS et al., 2006 ab; AMORIM et al., 2006; AMORIM et al., 2003), caninos (LOPES, 2008), bovinos (COSTA et al., 2010; LUCCI et al., 2004) e suínos (BORGES et al, 2009).

A viabilidade folicular no teste de toxicidade não apresentou diferença estatística entre o controle sem glicerol (72,72%) e o tox-1,5 (62,15%), entre o controle sem glicerol e o tox-3 (12,07%) e tox-1,5 e tox-3. Os folículos pré-antrais apresentaram-se sensíveis ao glicerol, apresentando redução no número de folículos viáveis (tabela 1).

Ao contrário deste estudo Lima (2006) observou em FOPA isolado mecanicamente de felinos diferença significativa entre grupo controle e toxicidade 1,5 M (98,6 versus 28,6%). Segundo este autor após a criopreservação *in situ* de folículos pré-antrais, também notou redução na taxa de viabilidade entre controle e glicerol 1,5 M (71,3 versus 39,3%). Rodrigues et al. (2004) observaram em FOPA após exposição ao glicerol 1,5 e 3 M taxas de viabilidades significativamente reduzidas quando expostos ao glicerol 3 M, como relatada neste estudo. Amorim et al. (2003) também identificaram que elevadas concentrações de crioprotetor prejudicam a viabilidade de folículos pré-antrais. Quando os crioprotetores são utilizados em altas concentrações ou em concentrações inadequadas, podem interagir com FOPA, comprometendo a viabilidade de suas estruturas (SANTOS et al., 2008). A temperatura e período de exposição adotada neste estudo, também podem ter influenciado na viabilidade folicular, como também evidenciado por SANTOS et al. (2008).

A viabilidade folicular após criopreservação/ descongelamento com glicerol 1,5 e 3 M 18,88% (crio-1,5) e 2,81% (crio-3) foram semelhantes. Em crio-1,5 (18,88%) e crio-3 (2,81%) as taxas de viabilidade em relação ao grupo controle sem glicerol (72,72%) apresentaram-se significativamente baixas (tabela 2). Rodrigues et al. (2004) relataram diferenças nas concentrações 1,5 e 3 M após criopreservação/ descongelamento de FOPA, mas observaram que o etilenoglicol 1,5 M apresentou-

se mais eficiente. Costa et al (2010), Borges (2009), Lima (2006) e Santos et al. (2006ab) compararam a viabilidade FOPA utilizando glicerol 1,5 e 3 M com outros crioprotetores como etilenoglicol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol, e observaram que após a criopreservação com glicerol 1,5 e 3 M os FOPA apresentavam baixa viabilidade. Isto pode ter ocorrido devido ao glicerol apresentar baixa capacidade de penetração à membrana celular, e ter causado danos às estruturas celulares, conseqüentemente baixa viabilidade folicular.

A comparação entre o teste de toxicidade e criopreservação/descongelamento com o glicerol, na concentração de 1,5 M apresentou viabilidade folicular de 62,15% para tox-1,5 e 18,88% para crio-1,5 e controle sem glicerol 72,72%, mostrando que nesta concentração ocorreu danos foliculares somente nos folículos criopreservados (crio-1,5). Na concentração de 3 M, viabilidade folicular de 12,07% para tox-3 e 2,81% para crio-3 e controle sem glicerol 72,72% identificou que tanto em tox-3 quanto em crio-3 houve redução significativa em relação ao controle, indicando a concentração 3 M de glicerol afetou tanto na viabilidade folicular no teste de toxicidade, quanto na criopreservação/descongelamento. SANTOS et al. (2006ab) nesta mesma análise notaram redução significativa com o uso de glicerol nas concentrações 1,5 e 3 M.

Embora existam estudos de criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais em diversas espécies como em camundongos (CANDY et al., 1997), felinos (LIMA, 2006; JEWGENOW et al., 1998), caprinos (RODRIGUES et al. 2005; RODRIGUES et al. 2004ab), ovinos (SANTOS et al., 2006 ab; AMORIM et al., 2006; AMORIM et al., 2003), caninos (LOPES, 2008), bovinos (COSTA et al., 2010; LUCCI et al., 2004) e suínos (BORGES et al, 2009), mais estudos com outros crioprotetores como etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol em diferentes concentrações devem ser realizados para criopreservação de folículos pré-antrais de marrãs pré-púberes isolados mecanicamente

Conclusão

Os folículos pré-antrais isolados mecanicamente de marrãs pré-púberes após exposição ao glicerol 1,5 M apresentaram melhor taxa de viabilidade, porém em ambas as concentrações 1,5 e 3M a criopreservação não foi satisfatória.

Agradecimento

À FAPEMG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão financeira.

Referências

AMORIM, C. A.; RONDINA, D.; LUCCI, C. M.; GOLÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, R. J.; GIORGETTI, A. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1077-1081, 2006.

AMORIM, A. C.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; GONÇALVES, D. B. P.; FIGUEIREDO, R. J.; GIORGETTI, A. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethyleneglycol. **Theriogenology**, v. 60, p. 735-742, 2003.

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

BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FUTINO, D. O.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; AMORIM, C. A. A.; BÃO, S. N. LUCCI, 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.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 11-119, 1997.

COSTA, R. N.; LUNA, H. S.; LIJERON, L. A.; ZUCCARI, C. E. S. N.; LAURA, I. A. Exposição de diferentes crioprotetores e concentrações sobre o diâmetro e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 252-259, 2010.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p.143-152. 2007.

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

LIMA, A. K. F. **Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica.** 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará.

LOPES, C. A. P. **Utilização de biotécnicas de manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais para a avaliação in vitro do potencial de anticorpos antizona pelúcida para a imunoesterilização de cadelas.** 2008. 154f. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

LUCCI, C. M.; SCHEREIER, L. L.; MACHADO, V. P.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; DOBRINSKY, J. R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of preantral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 76-82, 2007.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.; 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, n. 6, p. 1101-1114, 2004.

LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of and efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, p. 1467-1483, 2002.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUSBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology. **Fertility and Sterility**, v. 354, p. 1-7, 1998.

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

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

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

SANTOS, R. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p.9-15. 2008.

SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; FIGUEIREDO, J. R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré antrais ovinos utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 250-255, 2006a.

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

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, 1. M.; TROUNSON, A. O. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal of Reproduction Science**, v. 60, p. 357-364, 2000.