

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

***AVALIAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SUÍNOS APÓS  
RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO***

**JULIANA CALDAS PEREIRA PLÁCIDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO 2009**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

***AVALIAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAISSUÍNOS APÓS  
RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO***

**JULIANA CALDAS PEREIRA PLÁCIDO**

**ORIENTADORA: CAROLINA MADEIRA LUCCI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO 2009**

## **Ficha Cartográfica**

Plácido, Juliana Caldas Pereira.

Avaliação de folículos pré-antrais suínos após resfriamento e criopreservação.

Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.  
Universidade de Brasília. 2009.

xvii + 46p: il.

Dissertação: Mestrado em Biologia Animal

1. conservação 2. oócito; 3. morfologia; 4. ultraestrutura.

I – Universidade de Brasília

II – Título

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

***AVALIAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI SUÍNOS APÓS  
RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO***

**JULIANA CALDAS PEREIRA PLÁCIDO**

**DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao Programa de Pós –  
Graduação em Biologia Animal, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau Mestre em Biologia Animal.**

**APROVADA POR:**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dra. (UnB)**  
**(ORIENTADOR) CPF: 490390241-20 e-mail: [cmlucci@unb.br](mailto:cmlucci@unb.br)**

---

**ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA, Dra. (UnB)**  
**(EXAMINADOR) CPF: e-mail: [aamresil@unb.br](mailto:aamresil@unb.br)**

---

**JOSÉ RICARDO DE FIGUEIREDO, Dr.(UECE)**  
**(EXAMINADOR) CPF: 564852556-72 e-mail: [jrfiq@cnpq.br](mailto:jrfiq@cnpq.br)**

---

**MÔNICA PEREIRA GARCIA, Dra. (UnB)**  
**(SUPLENTE) CPF e-mail:**

**BRASÍLIA/DF, 16 de fevereiro de 2009.**

***“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham,  
ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de  
oferecer”.***

***Leonardo da Vinci***

*Aos meus pais com muito amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Registro aqui a minha gratidão a todos que estiveram presentes em minha vida durante a jornada de realização deste trabalho e que contribuíram para que essa etapa fosse concluída.*

*Agradeço a Deus pelo maravilhoso dom da vida e Sua eterna presença.*

*Aos meus pais, Antonio e Esmeralda, sou eternamente grata por todos os valores morais que me ensinaram, por terem me proporcionado carinho, dedicação e a educação que tenho hoje.*

*Ao meu irmão, Leandro, pela presença em minha vida e pela ajuda nas dúvidas do mundo digital.*

*Ao meu Anjo, Henrique Garcia, tenho incontáveis motivos para agradecer, citando aqui apenas alguns. Muito obrigada pelo amor, carinho, dedicação, paciência, incentivo, compreensão, auxílio e também por ensinar-me a sempre ir de encontro aos meus sonhos.*

*Ao Luk, meu cachorrinho, companheiro em todas as horas, sempre trazendo alegria e sempre ao meu lado, especialmente durante a escritura desta dissertação.*

*À minha orientadora Carol, por ter me proporcionado a chance de realização do mestrado, por sua dedicação, integridade e determinação dignas de serem seguidas como exemplo. Além disto, pela sua amizade, incentivo e companheirismo. Carol é uma pessoa que consegue ser ao mesmo tempo uma “orientadora – amiga” sempre com as mãos estendidas para nos receber.*

*À minha tia Goret, pelo carinho inigualável desde a infância e incentivo ao meu crescimento e realização pessoal e profissional.*

*À minha madrinha Ruthe, pelo amor, apoio e preocupação com minha formação.*

*À minha amiga, Sheila Rodrigues, uma pessoa fantástica que percorreu essa trilha junto comigo, prestando auxílio sempre que necessário, pelos momentos de muitas risadas e pelo ombro amigo sempre à disposição.*

*À minha amiga, Cecília Fraga, por quem tenho imenso carinho e admiração, pela preciosa amizade, carinho, pelo companheirismo, pelos momentos de estudos, inclusive nos estudos de preparação para a realização da prova do mestrado, por toda prestatividade, atenção, preocupação e ajuda na reta final do mestrado.*

*Aos meus médicos Dra. Berenice, Dr. Neto e Dra Teresinha pelo cuidado com minha saúde e apoio na vida profissional.*

*À minha amiga, Nadja Romera, presente durante toda a graduação, pelo apoio, preocupação e disposição.*

*Ao André Garcia, pela disponibilidade de tempo e pela atenção prestada durante a reta final desta trajetória.*

*À Aline Oliveira, que no pouco tempo que esteve fazendo estágio em Brasília muito me ajudou na microscopia eletrônica.*

*À Ingrid Oliveira e Rosângela Vasconcelos que muito me ensinaram quando eu ainda era estudante de Iniciação Científica e pela amizade.*

*À Adriana Reis, pela amizade, dedicação, apoio, incentivo e ajuda sempre presente nos experimentos.*

*À Emily Borges, pela amizade, apoio, ensinamentos não só no meio científico e pela ajuda prestada nos experimentos.*

*Ao José Jivago, pela amizade e pela grande força que me deu na histologia.*

*À Patrícia Cunha, um doce de pessoa, pela amizade e pela atenção durante o Estágio em docência.*

*À Shélida Braz, pelo auxílio na Microscopia eletrônica.*

*Um agradecimento mais do que especial eu devo a duas pessoas maravilhosas que se revelaram amigas fantásticas:*

*Débora Cintra, chamada carinhosamente de Debs e Paula Aben Athar, também chamada carinhosamente de Paulinha por serem pessoas especiais e que foram essenciais na reta final do mestrado. Ambas estiveram comigo na fase mais difícil do mestrado e estiveram ao meu lado na semana do Natal e do ano-novo e muito me ajudaram nas diversas etapas desta técnica. Débora esteve presente exatamente em todos os dias deste período de festas e inclusive no final de semana para que conseguíssemos obter resultados. Agradeço pela amizade construída, pelo ombro amigo nos momentos de lágrimas e também pelos momentos de muitas e inúmeras risadas juntas.*

*À professora Sônia Bão, pela disponibilização dos equipamentos de microscopia eletrônica de transmissão e atenção.*

*Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo, pela oportunidade oferecida para a realização do Estágio em Docência.*

*Ao professor Umberto Euzébio, pela disponibilização de seu laboratório e simpatia contagiante.*

*Ao Antonio Djalma Santos, técnico do laboratório de Morfologia e Morfogênese, pela atenção e ensinamentos.*

*Ao laboratório de Morfologia e Morfogênese (IB-UnB) pela disponibilização do espaço físico.*

*À Asa alimentos (Bonasa) pela atenção e fornecimento de material para a pesquisa.*

*À CAPES pela bolsa concedida durante o período de realização do mestrado.*

*À FINATEC e à FAP-DF pelo apoio financeiro.*

## Sumário

	Página
<b>Agradecimentos</b>	VII
<b>Resumo Geral</b>	XIV
<b>Abstract</b>	XVI
<b>Índice de figuras</b>	XII
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	XIII
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão de literatura</b>	3
2.1 Folículos Ovarianos	3
2.2 Foliculogênese e Oogênese	5
2.3 Atresia	7
2.4 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).	8
2.4.1 Técnicas de Isolamento	8
2.4.2 Conservação das células germinativas	10
2.4.3 Cultivo <i>In vitro</i>	12
2.5 Métodos para análise dos folículos pré-antrais	12
<b>3. Justificativa</b>	14
<b>4. Objetivo</b>	16
4.1.2 Objetivo Geral	16
4.1.3 Objetivos Específicos	16
<b>5. Material e Métodos</b>	17
5.1 Animais	17
5.2 Coleta dos ovários	17
5.3 Fragmentação dos ovários	18
5.4 Transporte dos fragmentos ovarianos	20
5.5 Resfriamento das amostras – duração 18h	20
5.6 Criopreservação	20

5.7 Descongelamento	21
5.8 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	22
5.9 Microscopia de luz (ML)	22
5.9.1 Avaliação dos folículos	23
5.9.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	23
5.9.3 Análise Estatística	23
<b>6. Resultados</b>	24
6.1 Microscopia de luz	24
6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	26
<b>7. Discussão</b>	33
<b>8. Conclusão</b>	37
<b>9. Referências Bibliográficas</b>	38

## Índice de Figuras

	Página
<b>Figura 1:</b> Fases do desenvolvimento de um folículo ovariano	4
<b>Figura 2:</b> Representação dos suínos doadores de ovários	17
<b>Figura 3:</b> Fragmentos do córtex ovariano (arquivo pessoal)	18
<b>Figura 4:</b> Delineamento experimental	19
<b>Figura 5:</b> Equipamento de congelamento lento programável (Dominiun K, Biocom)	20
<b>Figura 6:</b> Curva de congelamento lento usada para criopreservação	21
<b>Figura 7:</b> Análise histológica de folículos morfologicamente normais	25
<b>Figura 8:</b> Análise histológica de folículo pré-antral suíno	25
<b>Figura 9:</b> Porcentagens (MÉDIA ± DP) de folículos morfologicamente normais nos tratamentos: C.A., RESFRI, CRIO, CRIO-CIV e CCIV	26
<b>Figura 10:</b> Micrografias eletrônicas de FOPA suíno morfologicamente normal	27
<b>Figura 11:</b> Micrografias eletrônicas de FOPA suíno morfologicamente normal	28
<b>Figura 12:</b> Micrografias de folículo pré-antral suíno do tratamento de criopreservação com morfologia aparentemente normal	29
<b>Figura 13:</b> Folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO	30
<b>Figura 14:</b> Folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO	31
<b>Figura 15:</b> Folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO	32

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de Variância
°C	Graus centígrados
C.A	Controle abate
CCIV	Controle cultivo <i>in vitro</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CRIO	Criopreservação
CRIO-CIV	Criopreservação – cultivo <i>in vitro</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
DP	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfoxido
EG	Etilenoglicol
FMN	Folículos morfológicamente normais
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
GLY	Glicerol
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Horas
HE	Hematoxilina-Eosina
ICSI	Injeção intracitoplasmática
ITS	Insulina-trasferrina-selênio
L	Litros
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
µg	Microgramas
µm	Micrometros
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
ML	Microscopia de luz
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
PBS	Tampão salina fosfato
p.H	Potencial de hidrogênio
PROH	Propanodiol
%	Porcentagem
RESFRI	Resfriamento
ZP	Zona pelúcida

## **Resumo Geral**

### ***AVALIAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI SUÍNOS APÓS RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO***

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito do resfriamento seguido da criopreservação do tecido ovariano na morfologia e ultraestrutura dos folículos pré-antrais suínos. Ovários de 7 porcas foram coletadas em abatedouro local. De cada ovário foram retiradas 4 finas fatias do córtex (~ 1cm<sup>2</sup>) e uma fatia foi imediatamente fixada em Carnoy (grupo controle-C.A.). As amostras foram colocadas em PBS e mantidas a 4°C por 18 horas. Após isto, uma amostra foi fixada (grupo resfriamento-RESFRI.). As outras duas amostras foram criopreservadas em 1.5 M de EG com 0.4% de sacarose em tampão PBS. Após 7 dias, as amostras foram descongeladas e o crioprotetor removido. Então, uma das amostras foi fixada (grupo criopreservação-CRIO) e as outras amostras foram colocadas em cultivo *in vitro* (grupo CRIO-CIV) por 2h juntamente com amostras frescas de tecido ovariano (grupo controle cultivo-CCIV), e então fixadas. Para análise histológica as amostras foram desidratadas em álcool, clarificados com xileno e embebidos em parafina. Secções (5µm) foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas por microscopia de luz (ML). As amostras também foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A porcentagem de folículos morfologicamente normais (FMN) foi comparada entre os tratamentos por ANOVA e Teste de Tukey. Na análise histológica, os folículos pré-antrais do resfriamento, criopreservação e cultivo *in vitro* apresentaram morfologia similar ao do controle. A grande maioria dos folículos demonstrou aparência normal. A porcentagem de FMN nos grupos C.A., RESFRI, CRIO, CRIO- CIV e CCIV foram respectivamente: 83±9, 81±9, 83±9, 73±10 e 87±4. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (P>0,05). A análise por MET, entretanto, mostrou danos irreversíveis às organelas dos folículos pré-antrais criopreservados após 18 horas de resfriamento. Os principais danos observados foram alteração na granulação do citoplasma do oócito, ruptura da membrana nuclear, inchaço das mitocôndrias com perda das cristas, desorganização das

células da granulosa e descolamento destas do oócito. Em conclusão, a associação do resfriamento e criopreservação do tecido ovariano não preserva a ultraestrutura dos folículos pré-antrais suínos.

**Palavras chaves:** conservação, oócito, morfologia, ultraestrutura.

## **Abstract**

### ***EVALUATION OF PIG PREANTRAL FOLLICLES AFTER CHILLING AND CRYOPRESERVATION***

The aim of this work was to test the effect of cooling followed by freezing of ovarian tissue on the morphology and ultrastructure of pig preantral follicles. Ovaries from 7 gilts were collected at a local slaughterhouse. From each ovary 4 slim slices of cortex ( $\sim 1\text{cm}^2$ ) were cut, and 1 slice was immediately fixed in Carnoy fixative (Control Group – C.A). Samples were placed in PBS and kept at  $4^\circ\text{C}$  for 18 hours. After that, one sample was fixed (Chilling Group - RESFRI). The other two samples were cryopreserved in 1.5M of EG with 0.4% sucrose in PBS. After 7 days, samples were thawed and cryoprotectant was removed. Then, one of the samples was fixed (Cryopreservation Group - CRIO) and the other sample was placed in *in vitro* culture (Cryopreservation-CIV Group - CRIO-CIV) for 2h, together with fresh ovarian tissue samples (CIV Control Group - CCIV), and then fixed. For histological analysis samples were dehydrated in alcohol, clarified with xylene and imbedded in paraffin wax. Sections ( $5\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin–eosin (HE) and analyzed by light microscopy (ML). Samples were also processed for transmission electron microscopy (TEM). The percentage of morphologically normal follicles (MNF) was compared among treatments by ANOVA and Tukey test. The percentages of MNF observed under light microscopy in C.A., RESFRI, CRIO, CRIO-CIV and CCIV treatments were respectively:  $83\pm 9$ ,  $81\pm 9$ ,  $83\pm 9$ ,  $73\pm 10$  e  $87\pm 4$ . No statistical difference was observed among treatments ( $P>0.05$ ). The analysis by TEM, however, showed irreversible damage to the oocyte organelles of preantral follicles cryopreserved after 18 hours of cooling. Damages as alteration in granulation of ooplasm, nuclear membrane rupture, swollen mitochondria, disorganization of granulosa cells and detachment from oocyte. In conclusion, the association of colling and freezing of ovarian tissue did not preserve the ultrastructure of pig ovarian preantral follicles.

**Key-words:** conservation, oocyte, morphology, ultrastructure.

## 1. Introdução

A reprodução animal assistida, realizada em laboratórios especializados, tem tido um grande incremento com o surgimento de novas tecnologias. Esse avanço permitiu o desenvolvimento de protocolos inovadores e promissores. Um dos principais alvos dos estudos é a reprodução de animais em vias de extinção ou com alto valor genético. Portanto, têm sido realizados diversos estudos utilizando o resfriamento e a criopreservação de células germinativas femininas (oócitos), masculinas (espermatozóides) e também de embriões com a finalidade de construção de um banco de germoplasma.

Na espécie suína (*Sus scrofa*), várias raças nativas do Brasil apresentam um número cada vez mais reduzido, tais como Piau, Nilo, Pirapetinga, Caruncho, Casco de Mula, Rabo de Peixe e Monteiro (Mariante et al., 2003). Estas raças representam um grande potencial a ser explorado, devido a características como rusticidade, adaptabilidade e resistência a doenças. Sendo assim, é de grande importância a conservação dessas raças por meio da preservação de seu material genético.

A conservação de células germinativas femininas pode ser realizada usando oócitos puncionados de folículos ovarianos antrais, ou oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (FOPA). De modo geral, a criopreservação de oócitos inclusos em folículos antrais ainda apresenta resultados insatisfatórios, especialmente na espécie suína (Didion et al., 1990) (Nagashima et al., 1994., McEvoy et al., 2000). Em vista disto tem sido estudado como alternativa a criopreservação de oócitos inclusos em FOPA para conservar as células germinativas femininas.

Os oócitos de FOPA são mais tolerantes ao processo de criopreservação, em função de possuírem algumas características que os tornam menos vulneráveis a crioinjúria, como por exemplo, o pequeno tamanho do oócito e um menor número de células foliculares, o baixo metabolismo do oócito, a menor quantidade de lipídeo intracitoplasmático, a ausência de zona pelúcida e grânulos da cortical nos estádios iniciais e o núcleo em vesícula germinativa (Oktay et al.,

1998; Shaw et al., 2000). O resfriamento e a criopreservação de oócitos de FOPA, tanto inclusos em tecido ovariano como isolados, oferece vantagens, pois estes folículos podem ser recuperados em grande quantidade e independente da idade ou do estágio do ciclo reprodutivo da fêmea em questão (Shaw et al., 2000).

Para a conservação de material genético duas formas têm sido consideradas: o resfriamento e a criopreservação. O resfriamento possibilita a diminuição do metabolismo dos oócitos, minimizando o gasto de energia e retardando o processo de degeneração. Desta forma é possível promover a manutenção de baixos padrões metabólicos, o que é essencial para preservar a viabilidade das células durante o transporte ou o preparo dos procedimentos de rotina no laboratório (Roy & Treacy, 1993). A criopreservação tem por finalidade conservar o material em nitrogênio líquido, por longos períodos, sendo necessário o uso de crioprotetores a fim de evitar danos celulares durante o processo de congelamento. Esta técnica possibilita a conservação de material genético por períodos superiores à expectativa de vida dos indivíduos.

Neste sentido, a associação de protocolos de resfriamento e criopreservação de tecido ovariano pode ser útil para a conservação de material genético animal. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos desta associação em oócitos inclusos em FOPA presentes em tecido ovariano suíno.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Folículos Ovarianos

Os folículos ovarianos são a estrutura morfofuncional presente dos ovários e possuem duas funções bem definidas: função exócrina e função endócrina (Hafez & Hafez, 2004).

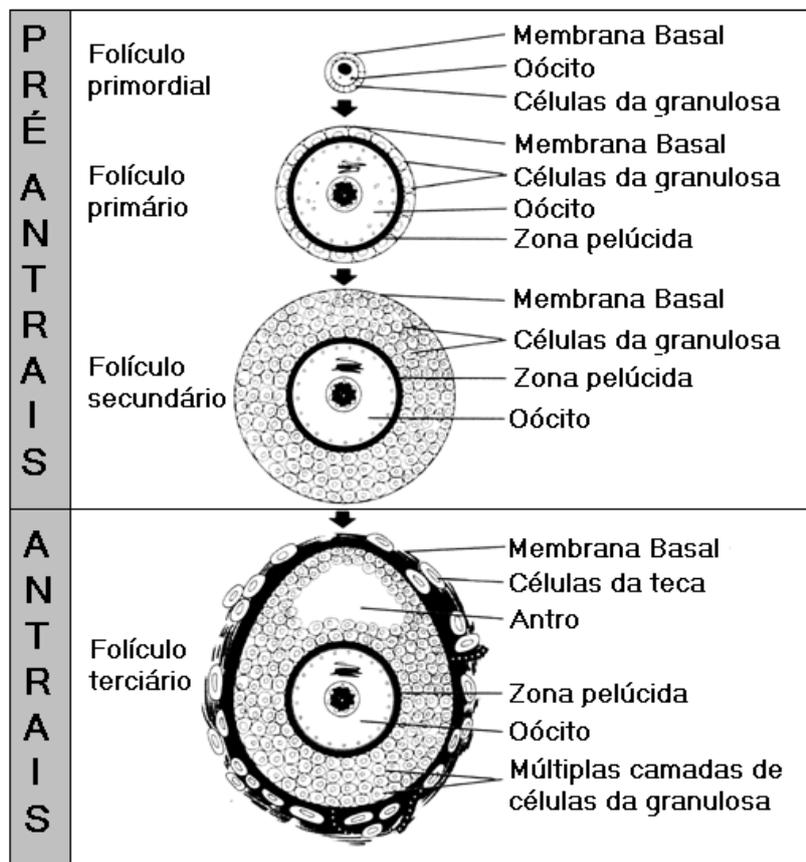
- Função exócrina: produção de oócitos fertilizáveis a cada ciclo
- Função endócrina: produção e liberação de alguns hormônios esteróides e peptídeos.

Essa estrutura morfofuncional constitui-se de um oócito circundado por células foliculares (da granulosa e da teca). As células foliculares são essenciais para manutenção da viabilidade oocitária, pois assegura o crescimento, a maturação e a liberação de cada oócito maduro durante o processo de ovulação (Figueiredo et al., 2002).

Os folículos são classificados em dois grupos principais: folículos pré-antrais e folículos antrais. A diferença entre estes dois grupos está na presença de uma cavidade (antro) nos folículos antrais, que acomoda o chamado líquido folicular. Este contém proteoglicanas, diversas proteínas (incluindo as que captam esteróides) e altos teores de estrógeno (Junqueira & Carneiro, 1999).

Os folículos pré-antrais podem ainda ser subdivididos em primordiais, transição, primários e secundários. Essa classificação é feita de acordo com o

estádio de desenvolvimento no qual se encontram. Uma figura esquemática representa as fases de desenvolvimento dos folículos e suas respectivas classificações (Figura 1).



**Figura 1:** Fases do desenvolvimento de um folículo ovariano. Folículo primordial apresentando uma única camada de células da granulosa com formato achatado. Folículo primário apresentando também uma só camada de células da granulosa, porém já em formato cubóide e início da formação da zona pelúcida. Folículo secundário apresentando várias camadas de células da granulosa e zona pelúcida formada. Folículo terciário ou antral apresentando antro e células da teca. Adaptado de:

<http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/CicloMenstrual/classfolicle.gif>

## 2.2 Foliculogênese e Oogênese

O processo de formação, crescimento e maturação do folículo é denominado foliculogênese. Já o processo conhecido como oogênese trata-se da formação dos gametas femininos, desde a proliferação das células germinativas primordiais até a formação de um oócito haplóide fecundado (n). Estes dois processos iniciam-se ainda na fase fetal do desenvolvimento das fêmeas, mas a foliculogênese encerra-se no momento da ovulação e a oogênese termina somente quando ocorre a fecundação (Figueiredo et al., 2002).

O início da oogênese pode ser marcado pela formação da oogônia (célula-mãe). As células de origem extragonadal (durante o desenvolvimento fetal) migram do saco vitelínico para as cristas gonadais e então sofrem mitoses de forma sucessiva dando origem as chamadas oogônias. Estas células, por sua vez, iniciam a primeira divisão meiótica que fica estagnada na prófase I originando milhares de oócitos primários. Os oócitos primários são então circundados por células epiteliais achatadas organizadas em uma única camada, formando o folículo primordial (Hafez & Hafez, 2004). Há então uma interrupção na multiplicação das células da pré-granulosa e os folículos encontram-se em um estágio de quiescência (dormência), o qual só é interrompido com a ativação desses folículos (Hirshfield, 1991).

Os folículos primordiais são ativados por fatores de crescimento. No entanto, a ativação folicular e seu desenvolvimento subsequente ainda não é um mecanismo muito bem esclarecido (Figueiredo et al., 2002).

Quando os folículos primordiais são ativados ocorre uma série de alterações, a primeira delas é a modificação do formato das células da granulosa de achatado para o formato cúbico, proliferação das células da granulosa e aumento do tamanho do oócito mudando a classificação do folículo, de primordial para primário. As células da granulosa começam então a se proliferar e o folículo passa a ser chamado de secundário quando apresentar mais de duas camadas destas células ao redor do oócito. Paralelamente a estas modificações há

inúmeras alterações ocorrendo, tais como: aumento do tamanho do oócito, multiplicação das organelas, formação da zona pelúcida entre as células da granulosa e o oócito, acúmulo de lipídeos, aumento na síntese de RNA e absorção de nutrientes. O antro, cavidade folicular, começa a ser formada com o desenvolvimento do folículo. O líquido folicular é sintetizado pelas células foliculares ou células da granulosa e os folículos tornam-se então terciários ou antrais (Figueiredo et al., 2002).

A finalização da foliculogênese depende de gonadotrofinas e é caracterizada pelo recrutamento, seleção e dominância dos folículos antrais. Este processo final, somente ocorre durante a puberdade, fase esta caracterizada pela liberação de gametas e comportamento sexual proeminente nos animais. O início da puberdade é regulado pela maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A partir desta maturação a liberação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) é alterada e passa a atuar de forma mais eficiente, influenciando a liberação das principais gonadotrofinas pela adenohipófise. As principais gonadotrofinas são o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), os quais atuam nos ovários (Hafez et al., 2004).

A principal função do FSH é induzir o crescimento e o desenvolvimento de folículos antrais, estimulando um aumento rápido do seu volume por meio do acúmulo de líquido folicular (Figueiredo et al., 2002; Fortune et al., 2001; Adams et al., 1992). O FSH estimula a mitose das células da granulosa e a formação do líquido folicular no folículo pré-ovulatório. Além disto, aumenta o número de receptores para LH, aumentando, portanto, a sensibilidade das células da granulosa a este hormônio (Hafez & Hafez, 2004).

Já no que se refere ao LH, este atua em níveis basais juntamente com o FSH para induzir a secreção de estrógeno do folículo ovariano desenvolvido. O pico de LH ocasiona uma ruptura da parede folicular, ocorrendo a ovulação e posterior luteinização das células foliculares remanescentes (Hafez et al., 2004). Os padrões de secreção, concentração e proporção de LH, FSH e outros hormônios determinam o crescimento, o desenvolvimento, a ovulação e a posterior luteinização dos folículos antrais. O FSH e o LH são liberados na forma

de ondas durante o ciclo estral, e estas ondas são controladas por um feedback negativo das gônadas. Um aumento na concentração de estrógeno circulante causa um feedback positivo que gera um segundo tipo de liberação de FSH e LH que é denominado pico pré-ovulatório. Há então uma indução de liberação de GnRH e conseqüente pico pré-ovulatório de LH e FSH.

Retomando a oogênese, o oócito permanece em prófase I da meiose durante todo o processo de foliculogênese descrito. Em função da liberação pré-ovulatória de LH, horas antes da ovulação, a meiose é retomada, a vesícula germinativa se rompe e há expulsão do primeiro corpúsculo polar, havendo desta maneira a formação do oócito secundário, o qual inicia a segunda divisão meiótica que também é interrompida, só que em metáfase II e só é retomada com a fecundação (Figueiredo et al., 2002).

### 2.3 Atresia

Os folículos primordiais correspondem à reserva de folículos em estágio quiescente (Beckers et al., 1996) e compreendem cerca de 90% da população folicular nos ovários de mamíferos (Erickson, 1986). De todos esses folículos, somente cerca de 0,1% será ovulado, com a probabilidade de ser fecundado. Os demais sofrerão um processo de morte celular, denominada de atresia, pelas próprias condições do ambiente ovariano (Figueiredo et al., 2002). Esta morte celular compreende um processo fisiológico que ocorre por via apoptótica, com duração desconhecida. Estes folículos que sofrem atresia são cercados por células do sistema imunológico e a área que antes ocupavam é preenchida por tecido conjuntivo, ficando uma cicatriz que é denominada de corpo atrésico (Cunningham, 1993).

Este processo de atresia parece ser uma forma de controlar a quantidade de folículos selecionados até o período de ovulação, mas pouco se sabe sobre a sua duração deste processo (Figueiredo et al., 2002). Nesta ocasião o folículo perde sua integridade devido a mudanças degenerativas. A atresia pode ocorrer em qualquer estágio do ciclo do desenvolvimento folicular e do ciclo ovariano,

entretanto ocorre com maior frequência nos estádios avançados do crescimento folicular (Hafez & Hafez, 2004). Embora seja um fenômeno natural, intrínseco ao organismo feminino, este processo reduz de maneira significativa a quantidade de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva (Figueiredo et al., 2002).

#### 2.4 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

A MOIFOPA é uma biotecnologia que trabalha essencialmente com folículos ovarianos pré-antrais e tem por objetivo explorar ao máximo o potencial de reprodução da fêmea. Considerando que mais de 90% dos oócitos encontram-se inclusos em FOPA e que a grande maioria deles sofrerá atresia em algum estágio do seu desenvolvimento, esta biotécnica visa aumentar o aproveitamento dos oócitos que seriam desperdiçados ao longo da vida reprodutiva de uma fêmea. Esta tecnologia consiste em cultivar os folículos pré-antrais, *in situ* ou isolados do tecido ovariano, fazendo-os chegar a um estágio de desenvolvimento em que seus oócitos possam ser maturados e fertilizados para gerar embriões. Alternativamente, os oócitos inclusos em folículos pré-antrais podem ser conservados para uso futuro.

##### 2.4.1 Técnicas de Isolamento

O isolamento dos folículos do tecido ovariano pode ser feito de diferentes maneiras. Sendo que várias metodologias já foram desenvolvidas em diversas espécies tais como: camundongos (Eppig, 1976), bovinos (Figueiredo et al., 1993; Hulshof et al., 1994), caprinos (Lucci et al., 1999), ovinos (Amorim et al., 2000), suínos (Lazzari et al., 1992) e humanos (Roy & Treacy., 1993). As metodologias mais utilizadas são três:

- uso de enzimas proteolíticas
- separação mecânica do folículo
- associação das duas técnicas anteriores: química e mecânica

O uso de enzimas proteolíticas apresenta um maior rendimento de folículos isolados, porém é o método com o maior custo financeiro. São utilizadas em geral três enzimas proteolíticas principais: a tripsina (Lazzari et al., 1992), a colagenase (Roy & Treacy, 1993) e a pronase (Roy & Greenwald, 1985).

Autores têm descrito que a colagenase mostrou-se mais eficiente e menos deletéria para oócitos, apesar dos folículos ficarem desprovidos das células da teca e formarem um complexo granulosa-oócito sob uma membrana basal parcialmente degradada (Buccione et al., 1990). A separação enzimática pela colagenase resultou em um grande número de folículos pré-antrais a partir de ovários de camundongos (Torrance et al., 1989) e a colagenase associada a DNAase, por um período de 1 hora à 37°C, não causou danos morfológicos aos folículos pré-antrais humanos (Roy & Treacy, 1993) e de cães (Bolamba et al., 2002).

Os métodos mecânicos costumam ser o mais baratos, mas geralmente apresentam um rendimento mais baixo de folículos isolados em relação aos métodos enzimáticos. A separação mecânica foi descrita em bovinos por Figueiredo et al., 1993, Hulshof et al., 1994, em caprinos (Lucci et al., 1999), em ovinos (Amorim et al., 2000). Os métodos de isolamento mecânico mais comuns são o *tissue-chopper* (Figueiredo et al., 1993) e a microdissecção sob lupa com auxílio de tesourinhas especiais (*spring scissors*) e agulhas de insulina (Telfer et al., 2000).

Em suínos, Lazzari et al. (1992) descreveram o isolamento enzimático de folículos ovarianos pré-antrais provenientes de leitões recém-nascidos. Greenwald & Moor (1989) também isolaram folículos suínos com o uso de colagenase. Usaram então um gradiente descontínuo de Percoll para separar os folículos de outros tipos celulares. Telfer et al. (2000) relataram que o método mecânico em suínos é mais adequado para o isolamento dos folículos pré-antrais maiores, em função de o estroma ser mais frouxo.

#### 2.4.2 Conservação das células germinativas

Os folículos pré-antrais já isolados ou inclusos no tecido ovariano possuem duas opções de períodos de conservação, uma de curto prazo, que é o resfriamento, e outra opção de longo prazo, que se trata da criopreservação.

O resfriamento causa a redução da temperatura tecidual, a qual proporcionará ao folículo uma diminuição do metabolismo celular e conseqüentemente reduzindo o consumo de energia e retardando o processo de degeneração. Portanto, uma das razões pela qual o resfriamento é utilizado é o desenvolvimento de protocolos de transporte dos folículos ovarianos de locais distantes dos laboratórios. Geralmente animais de alto valor genético encontram-se em locais distantes de laboratórios especializados, e quando há necessidade da coleta de material germinativo deste animal faz-se necessário um protocolo adequado para o transporte de forma a minimizar ao máximo os danos durante o transporte.

O resfriamento ovariano é feito em geral a 4°C ou 20°C, para que haja a manutenção da estrutura morfológica normal do folículo. Essas temperaturas foram usadas para conservação de folículos pré-antrais de ovinos (Andrade et al., 2001), caprinos (Carvalho et al., 2001) e bovinos (Lucci et al., 2004).

Em suínos, Lucci et al. (2007) observaram na avaliação histológica que a estocagem dos folículos ovarianos pré-antrais a 4°C por um período de até 18h e 20°C por até 6h não afetou a morfologia folicular. Posteriormente, Brito (2008) observou através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) que os FOPA conservados à 4°C por 18h apresentaram ultraestrutura normal.

A outra forma de estocagem (de longo prazo) é a criopreservação, na qual as células germinativas são armazenadas em nitrogênio líquido por período indeterminado. Mas para que o tecido possa ser criopreservado sem maiores danos é necessário o uso de substâncias chamadas crioprotetores. Estas substâncias têm por objetivo minimizar possíveis danos durante o processo de congelamento, já que evitam a formação cristais de gelo. Os principais

crioprotetores usados são etilenoglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO), glicerol (GLY) e propanodiol (PROH).

Com relação a criopreservação de tecido ovariano, vários estudos foram feitos em: bovinos (Lucci et al., 2004b), caprinos (Rodrigues et al., 2004ab), ovinos (Gosden et al., 1994; Salle et al., 1998; Demirci et al.; 2001; Capacchietti et al., 2004), camundongos (Aubard et al., 1998), coelhos (Neto et al., 2007), e humanos (Hovata et al., 1996; Gosden, 2000., Schmidt et al.; 2003). Borges et al. (2007) observaram que o desempenho do EG e do DMSO foi melhor quando comparados aos demais crioprotetores na criopreservação de tecido ovariano suíno. Os folículos ovarianos criopreservados foram analisados por microscopia de luz (ML) e por microscopia eletrônica e apresentaram morfologia similar aos do controle. É importante ressaltar que este é o único trabalho de criopreservação de FOPA em suínos.

Devido à sua grande sensibilidade ao frio, especialmente em temperaturas abaixo de 15°C (Didion et al., 1990), existe uma grande dificuldade de conservação dos oócitos inclusos em folículos antrais. Outras características dos folículos antrais tais como o maior tamanho do folículo, e a grande quantidade de lipídeos citoplasmático são fatores que também dificultam o resfriamento das células germinativas ovarianas (Nagashima et al., 1994; Mc Evoy et al., 2000). Os FOPA são usados como uma alternativa para conservação das células germinativas femininas em virtude de características que os tornam menos vulneráveis à crioinjúria, como por exemplo, o pequeno tamanho do oócito e o menor número de células foliculares, o baixo metabolismo do oócito, a menor quantidade de lipídeo intracitoplasmático, a ausência de zona pelúcida e grânulos da cortical nos estádios iniciais e o núcleo em vesícula germinativa (Oktay et al., 1998; Shaw et al., 2000).

### 2.4.3 Cultivo *In vitro*

O cultivo visa proporcionar um ambiente com características similares as das condições *in vivo*. Essas condições devem ser estabelecidas de acordo com o estágio de desenvolvimento do folículo (Telfer., 2001).

Diversos estudos usando o cultivo *in vitro* já foram realizados em diferentes espécies. Gupta et al. (2008) relataram que é possível o desenvolvimento de embriões bubalinos por meio da fertilização *in vitro* de oócitos provenientes de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Gutierrez et al. (2000) descreveram o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos até o estágio antral. Porém, os melhores resultados foram obtidos em camundongos, folículos pré-antrais foram desenvolvidos *in vitro* com sucesso, obtendo-se jovens vivos após o isolamento dos folículos, maturação do oócito, fertilização *in vitro* e transferência de embriões (Eppig & Schroeder, 1989). Esta biotecnologia referente a camundongos encontra-se em um estágio mais avançado diante das demais espécies. Sendo possível a obtenção de fetos vivos e viáveis inclusive a partir de folículos criopreservados e isolados de camundongos (Carrol et al., 1990; Carrol et al., 1993).

Em suínos, foi relatado que os oócitos oriundos de folículos pré-antrais podem crescer até o tamanho final e adquirir competência meiótica (Hirao et al., 1994). Wu et al. (2001) descreveram que folículos pré-antrais de suínos cultivados por um período de apenas 4 dias apresentaram antro, estes oócitos foram então maturados e fertilizados por injeção de espermatozóide intracitoplasmática (ICSI) e se desenvolveram até o estágio de blastocisto.

## 2.5 Métodos para análise dos folículos pré-antrais

Após os tratamentos de resfriamento e criopreservação os folículos têm que ser avaliados para detecção de possíveis danos sofridos no processo.

Uma das maneiras de avaliar morfologicamente os FOPA é o cultivo *in vitro* do material que sofreram tratamentos. O cultivo *in vitro* de curto prazo (cerca de

duas horas) permite a observação de possíveis danos nas amostras, já que mimetiza as características ovarianas *in vivo* tais como temperatura, p.H, ausência de luz, presença de nutrientes e outros. A morfologia dos FOPA pode ser avaliada por meio da ML. A ML é uma das formas de análise quantitativa e morfológica dos folículos, mas é limitada no que se refere à resolução. Para isto, MET é um instrumento de avaliação mais detalhado, uma vez que é possível a observação da ultraestrutura folicular. O poder de resolução da MET é 1000 vezes maior que da ML. Porém, a MET não oferece possibilidade de análise estatística, devido ao pequeno número de amostras analisadas. O ideal, portanto, é uma associação das duas metodologias de análise (ML e MET). Um ponto importante a ser ressaltado é que a MET é capaz de revelar resultados diferentes da ML. Um exemplo disto pode ser demonstrado no trabalho de Carvalho et al. (2001), no qual a ML revelou que os folículos pré-antrais de caprinos estavam morfológicamente normais após 24h a 4°C. Porém, já na MET foi revelado que estes folículos estavam normais apenas até 12h a 4°C. Matos et al. (2007) ressaltam a importância da utilização concomitante de diferentes sistemas (cultivo *in vitro*, histologia e MET) para avaliação dos FOPA.

Além da MET e da ML existem também os corantes vitais para avaliar a viabilidade de folículos isolados em diferentes espécies. O cultivo *in vitro* de longa duração também permite a avaliação dos folículos (Matos et al., 2007).

### **3. Justificativa**

A criopreservação de folículos pré-antrais, dentro do tecido ovariano ou isolados, pode ser de grande importância para a conservação de material genético de animais de grande valor zootécnico ou ameaçados de extinção, especialmente em suínos uma vez que a conservação de material genético feminino destes animais não apresenta resultados satisfatórios. A associação de duas técnicas (resfriamento e criopreservação) pode ter resultados adequados, permitindo a criação de um banco de germoplasma suíno e, conseqüentemente, o resgate de espécies suínas em extinção. Este protocolo pode oferecer uma importante contribuição no que se refere à recuperação da fauna ameaçada de extinção, como exemplos estão: Piau, Nilo, Pirapetinga, Caruncho, Casco de Mula, Rabo de Peixe e Monteiro que se encontram em número cada vez mais reduzido (Mariante et al., 2003) e que representam um grande potencial a ser explorado, devido às diversas características como rusticidade, adaptabilidade e resistência a doenças.

Apesar de existirem trabalhos sobre resfriamento (Lucci et al., 2007; Brito, 2008) e criopreservação (Borges et al., 2007) de tecido ovariano suíno ainda não se realizou um estudo com a associação de protocolos em suínos. O resfriamento exerce uma importante função no que se refere ao transporte do tecido ovariano até os laboratórios especializados, mas por um curto período de tempo. Já a criopreservação apresenta a vantagem de conservação das células germinativas por um tempo indeterminado, porém é difícil de ser realizado a campo. Portanto, a associação destas duas técnicas seria interessante de forma que o material (fragmentos ovarianos) possa ser coletado facilmente no local onde se encontra o

animal e transportado à baixa temperatura (resfriado) até laboratórios especializados, onde então os oócitos/FOPA poderiam ser criopreservados.

## **4.Objetivos**

### **4.1.2 Objetivo geral**

- Estudar o efeito da associação entre um protocolo para resfriamento e um para criopreservação de tecido ovariano nos folículos pré-antrais de suínos.

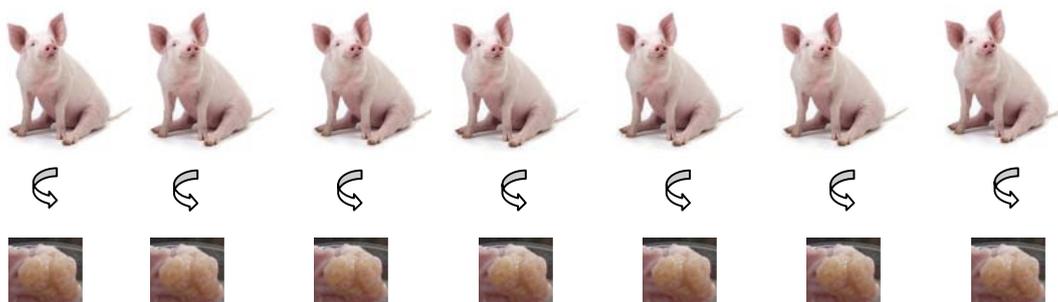
### **4.1.3 Objetivos específicos**

- Estudar o efeito da associação dos protocolos de resfriamento e criopreservação na porcentagem de folículos pré-antrais suínos morfológicamente normais antes e após um período de cultivo *in vitro* por microscopia de luz;
- Verificar o efeito da associação dos protocolos de resfriamento e criopreservação na ultraestrutura dos folículos pré-antrais suínos.

## 5. Materiais e Métodos

### 5.1 Animais

Em abatedouro local, Asa Alimentos, sete porcas pré-púberes com cerca de 167 dias de vida e peso médio de 110 kg foram utilizadas como doadoras de 7 ovários (um de cada animal - Figura 2).



**Figura 2:** Representação dos suínos doadores de ovários.

### 5.2 Coleta dos ovários

Imediatamente após o abate dos animais, os ovários foram retirados das extremidades da tuba uterina com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Cada ovário retirado foi lavado duas vezes em álcool 70% e duas vezes em soro fisiológico 0.9%.

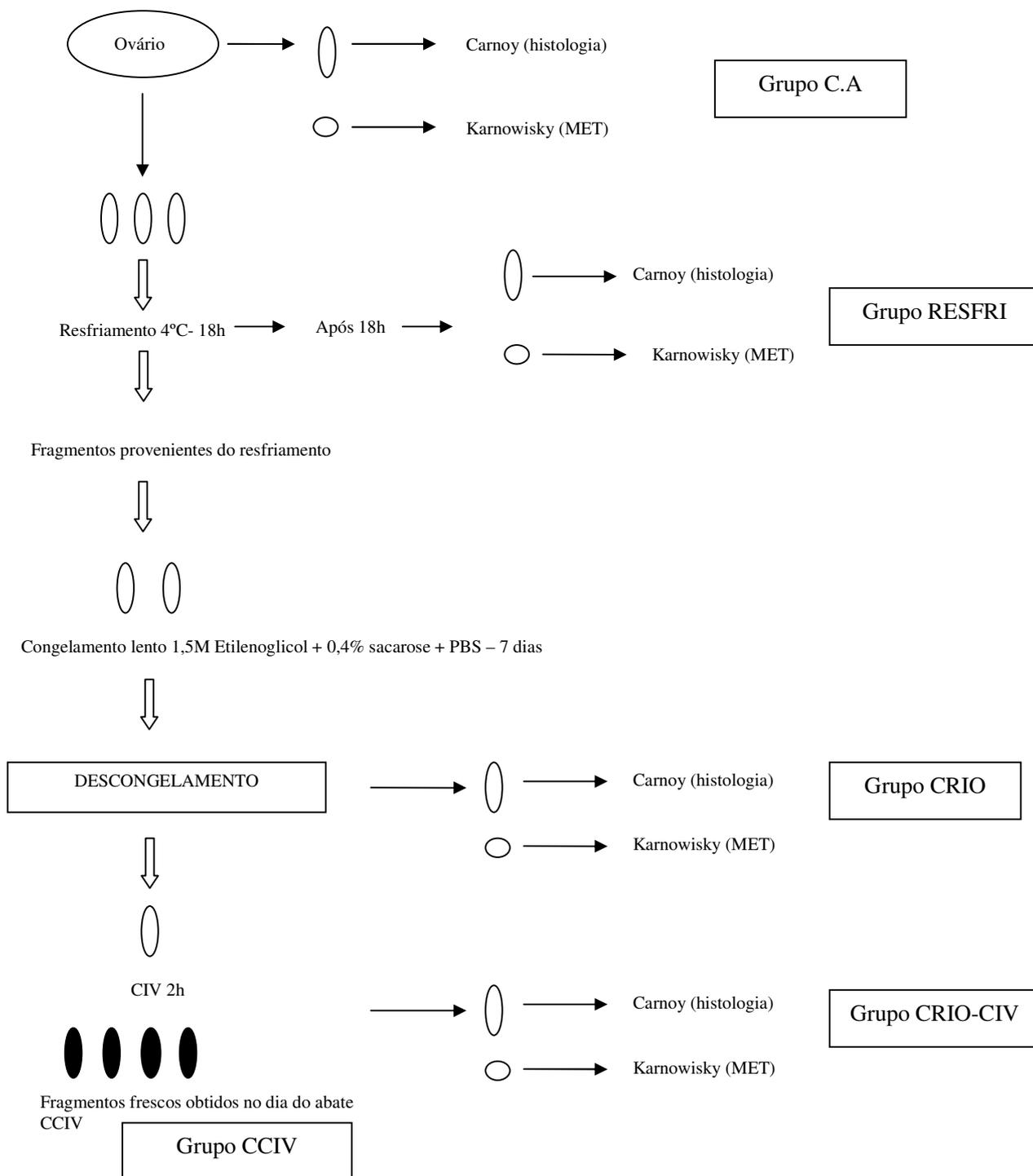
### 5.3 Fragmentação dos ovários e delineamento experimental

Ao sair da linha de abate, de cada ovário foram retirados 4 fragmentos com cerca 1cm<sup>2</sup> com bisturi. Um dos fragmentos foi imediatamente fixado e os outros 3 foram submetidos ao início do resfriamento (Figura 3).



**Figura 3:** Fragmentos do córtex ovariano (arquivo pessoal)

Foi definido como controle abate (C.A.) fragmentos do córtex ovariano que foram fixados imediatamente após o abate, ainda no abatedouro. Uma pequena porção era fixada em Karnowsky para MET e a porção restante deste mesmo fragmento era fixada para histologia (Carnoy). Os demais fragmentos seguiram para o laboratório em solução salina tamponada (PBS-Phosphate Buffered Saline) à 4°C. As 3 amostras restantes retiradas do córtex ovariano foram submetidas ao resfriamento à 4°C por 18h. Após o resfriamento um fragmento teve sua maior porção retirada para histologia e a outra porção menor para MET. Os dois fragmentos resultantes seguiram para a criopreservação. Após o descongelamento um fragmento foi retirado para ML e para MET. A última amostra restante seguiu para o cultivo *in vitro* (CIV) por um período de duas horas juntamente com fragmentos frescos obtidos no dia do cultivo (controle-cultivo). Após o CIV as amostras também foram processadas para ML e MET. Um esquema do experimento pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4:** Delineamento experimental. CIV (Cultivo *in vitro*), CCIV (Controle Cultivo *in vitro*), MET (Microscopia eletrônica de transmissão).

#### 5.4 Transporte dos fragmentos ovarianos

O transporte dos fragmentos ovarianos até o laboratório foi feito em tubos Falcon contendo 10 ml de solução PBS em isopor com gelo e água à 4°C no período máximo de 1 hora.

#### 5.5 Resfriamento das amostras – duração total 18h

Ao chegar no laboratório, as amostras eram imediatamente colocadas na geladeira à 4°C e nesta permaneciam até completar 18h (Brito et al., 2007). Após as 18h retirava-se um fragmento como controle do tratamento resfriamento (RESFRI), e procedia-se a fixação para MET e histologia. Os fragmentos restantes seguiam para o congelamento.

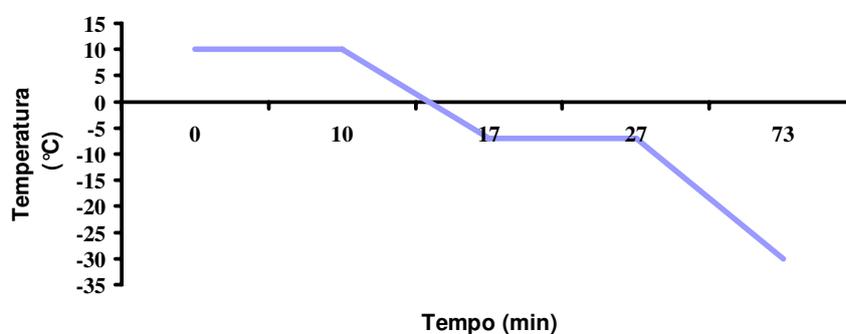
#### 5.6 Criopreservação

As amostras destinadas a criopreservação foram congeladas pelo método de congelamento lento conforme Borges et al. (2007) em congelador programável (Dominiun K, Biocom - Figura 5) e seguiam para o botijão de nitrogênio.



**Figura 5:** Equipamento de congelamento lento programável (Dominiun K, Biocom).

Resumidamente, as amostras foram equilibradas em PBS contendo 0,4% de sacarose e 1,5 M Etilenoglicol por 20 minutos. Em seguida, foram transferidas para o equipamento de congelamento programável, onde foram submetidas à seguinte curva de congelamento: 1°C/min até -7°C, permanecendo a esta temperatura por 10 min para se proceder ao *seeding* manual. Em seguida, a temperatura foi reduzida a uma taxa de 0,3°C/min até -30°C (Figura 6). Os tubos foram então transferidos para nitrogênio líquido (-196°C) e estocados por uma semana.



**Figura 6:** Curva de congelamento lento usada para criopreservação.

### 5.7 Descongelamento

O descongelamento das amostras foi feito da seguinte maneira: os criotubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 segundos e em seguida imersos em água a 37°C até o seu completo descongelamento. Cada amostra foi então lavada durante 5 minutos em PBS contendo 0,4% de sacarose para a completa remoção do crioprotetor, essa lavagem foi feita 3 vezes. Das amostras do tratamento de criopreservação também foi retirado um fragmento (CRIO) do qual uma pequena porção foi retirada para MET e o restante deste mesmo fragmento fixado para histologia. A amostra restante foi colocada em cultivo *in vitro*.

### 5.8 Cultivo *in vitro* (CIV)

O CIV foi feito imediatamente após o descongelamento e retirada do crioprotetor das amostras (CRIO – CIV). Fragmentos frescos eram obtidos no dia do cultivo para servir como controle do cultivo (CCIV). As amostras de tecido ovariano fresco seguiram juntamente com as amostras descongeladas para estufa à 38°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar por 2h. Os fragmentos de tecido ovariano foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc, Roskild, Denmark) contendo 1 ml de meio Waymouth MB 752/1 (Sigma) suplementado com: 2,24g /L de bicarbonato de sódio, 5% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 0,23 mM de piruvato, 100 µg/ml de ácido ascórbico e ITS ( 6,25 µg/ml de insulina, 6,25 µg/ml de transferrina e 6,25 ng/ml de selênio). Após o término do cultivo os fragmentos foram fixados.

O objetivo do cultivo *in vitro* por um curto período é o restabelecimento do metabolismo celular e temperatura, sem intenção de que haja crescimento. Com este cultivo visou-se que as células pudessem expressar morfologicamente possíveis danos moleculares sofridos durante o tratamento.

### 5.9 Microscopia de luz

As amostras de todos os tratamentos foram processadas para análise histológica. Todas as amostras foram fixadas durante 3 horas em Carnoy e posteriormente acondicionadas em álcool 70% até o processamento. Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados em 3 banhos de xilol, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo à uma espessura de 5µm. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas contendo os cortes com as amostras foram avaliadas em microscópio de luz Olympus BX41.

### 5.9.1 Avaliação dos folículos

Somente os folículos pré-antrais que apresentavam núcleo foram contabilizados. Os folículos foram classificados como morfológicamente normais ou degenerados. Considerou-se como degenerado o folículo que apresentasse uma das seguintes características: núcleo picnótico, células da granulosa desorganizadas, citoplasma do ovócito retraído ou baixa densidade celular.

### 5.9.2 Microscopia eletrônica de Transmissão

As amostras para MET foram fixadas em Karnowsky por 3h (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3) e então acondicionadas em tampão cacodilato de sódio até o início do procesamento. A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio (0,8%) e cloreto de cálcio (2,5 mM). A contrastação *in bloc* foi feita com acetato de uranila aquoso 0,5% por 2h no escuro. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina Spurr. Foram feitos cortes semi-finos de 3µm que foram corados com azul de toluidina e observados em ML para localização dos folículos. Somente folículos morfológicamente normais nos cortes semi-finos foram selecionados para cortes ultra-finos. Após a localização dos folículos foram feitos cortes ultra-finos (70nm) que foram colocados sobre telinhas de cobre e então analisados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan).

### 5.9.3 Análise Estatística

As porcentagens de folículos pré-antrais morfológicamente normais e degenerados na ML foram comparadas entre os tratamentos utilizando ANOVA e teste de Tukey. Os dados foram transformados para  $\arcsen\sqrt{\quad}$ .

Diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

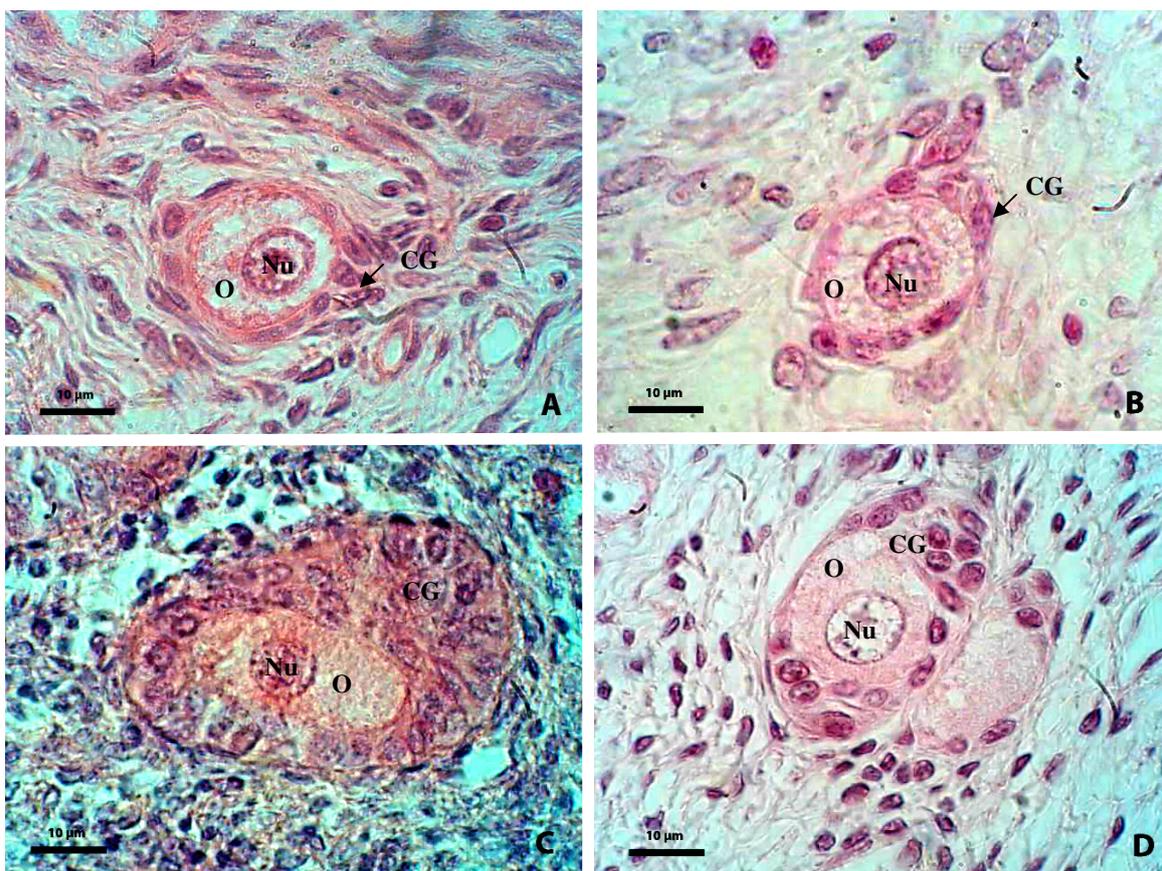
## 6. Resultados

### 6.1 Microscopia de luz

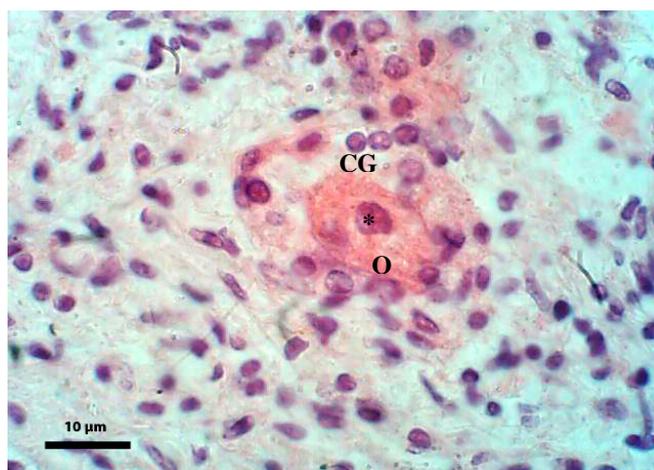
Para a ML foram analisados um total de 791 folículos pré-antrais suínos. Nos tratamentos C.A., RESFRI, CRIO, CRIO-CIV e CCIV foram analisados respectivamente 226, 198, 262, 105 e 221 folículos. Folículos morfologicamente normais (FMN) de cada tratamento podem ser vistos por análise histológica na figura 7.

Na análise morfológica feita pela histologia, as porcentagens (média  $\pm$  DP) de folículos morfologicamente normais no C.A, RESFRI, CRIO, CRIO-CIV e CCIV foram respectivamente  $83\pm 9$ ,  $81\pm 9$ ,  $83\pm 9$ ,  $73\pm 10$  e  $87\pm 4$  (Figura 9). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos.

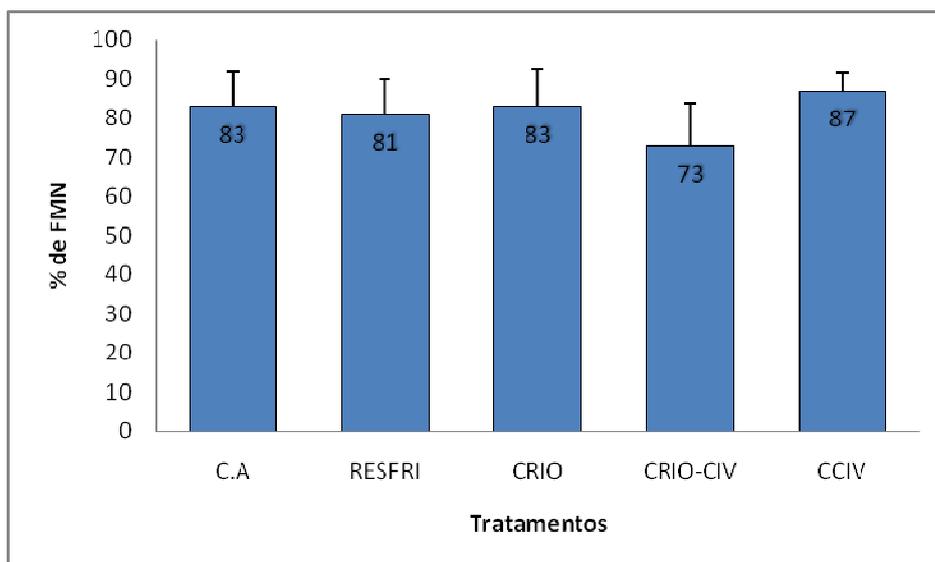
Dentre as degenerações em todos os tratamentos as encontradas com maior frequência foram retração do citoplasma do oócito e núcleo picnótico, conforme pode ser observado na figura 8.



**Figura 7:** Análise histológica de folículos pré-antrais suínos morfologicamente normais. A) do controle abate, B) após 18h de resfriamento, C) após criopreservação e D) após criopreservação e posterior cultivo. Nu = Núcleo; O = Oócito; CG = Células da Granulosa.



**Figura 8:** Análise histológica de folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO-CIV apresentando oócito retraído com núcleo picnótico (asterisco) e desorganização das células da granulosa. O = Oócito; CG = Células da Granulosa.

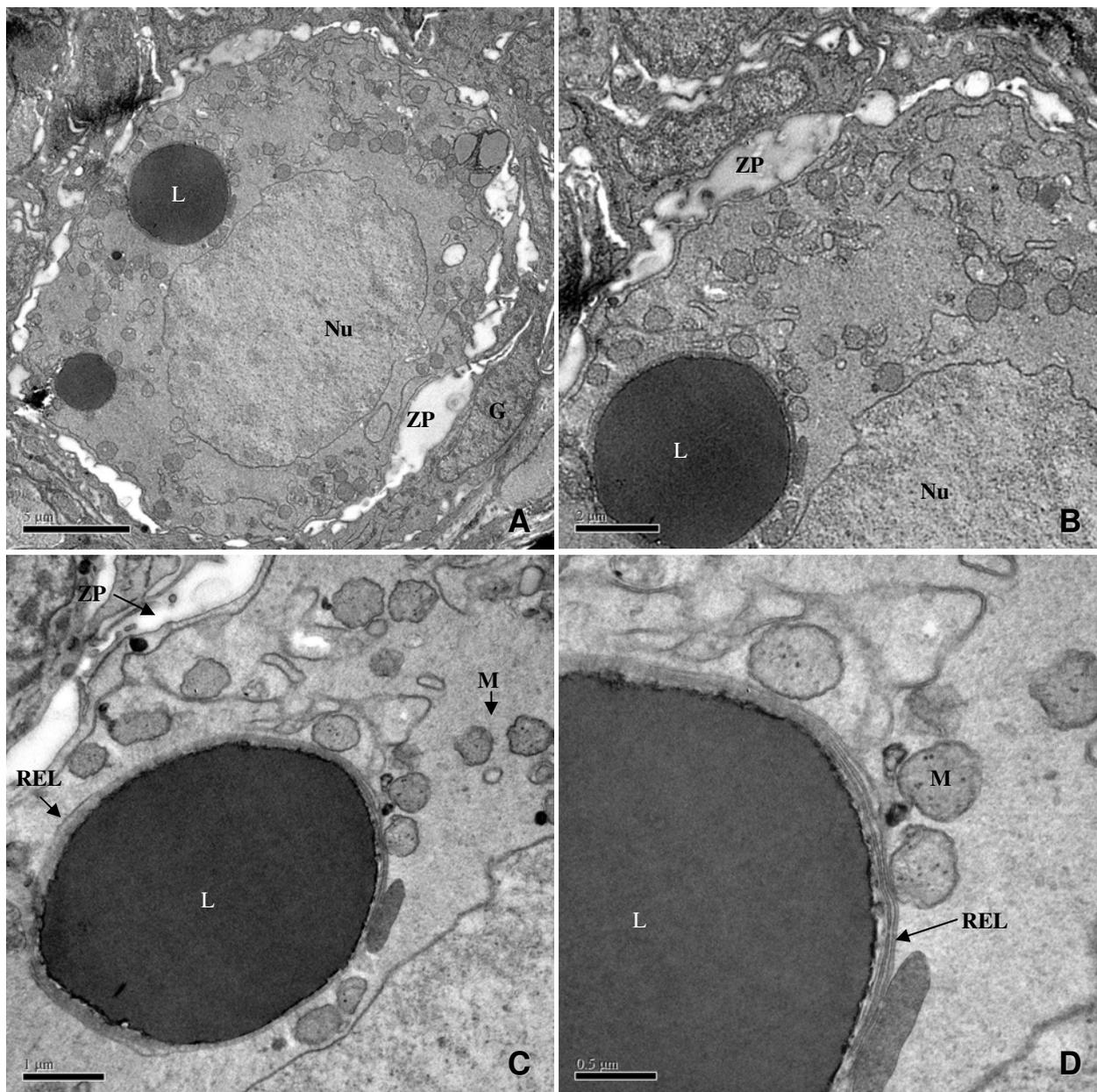


**Figura 9:** Porcentagens (MÉDIA ± DP) de folículos morfologicamente normais nos tratamentos: C.A., RESFRI, CRIO, CRIO-CIV e CCIV. Dados sem significância estatística ( $P > 0,05$ ).

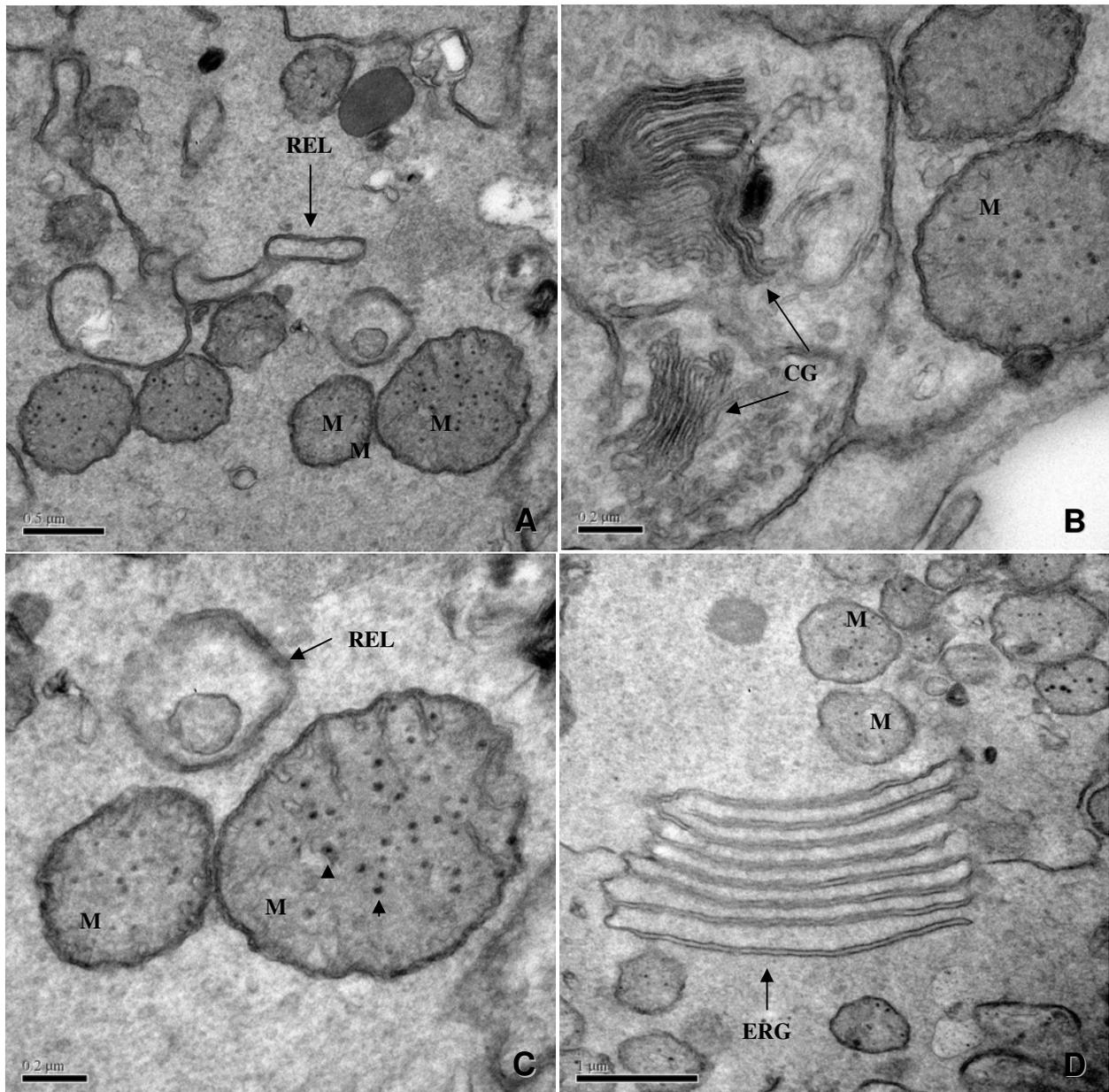
## 6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise ultraestrutural apenas os FMN observados nos cortes semi-finos ( $3\mu\text{m}$ ) foram avaliados. Os folículos foram observados e avaliados quanto à aparência geral e detalhada, considerando aspectos tais como: integridade do núcleo, aspecto das células da granulosa, granulação do citoplasma, morfologia e distribuição das organelas, presença de gotas de lipídeos e integridade da membrana citoplasmática.

Os FOPA do C.A. apresentaram-se morfologicamente normais quando observados ao MET. Pôde-se observar que as membranas citoplasmática e nuclear mantiveram-se íntegras, e o citoplasma apresentou granulação fina típica. O oócito apresentou abundância de retículo endoplasmático liso associado a gotas de lipídeo (Figura 10). As mitocôndrias eram predominantemente arredondadas com cristas discretas e apresentaram acúmulo de cálcio em sua matriz (Figuras 10 e 11). Também foram observados presença de Complexo de Golgi em perfeito estado morfológico e ergastoplasma (Figura 11).



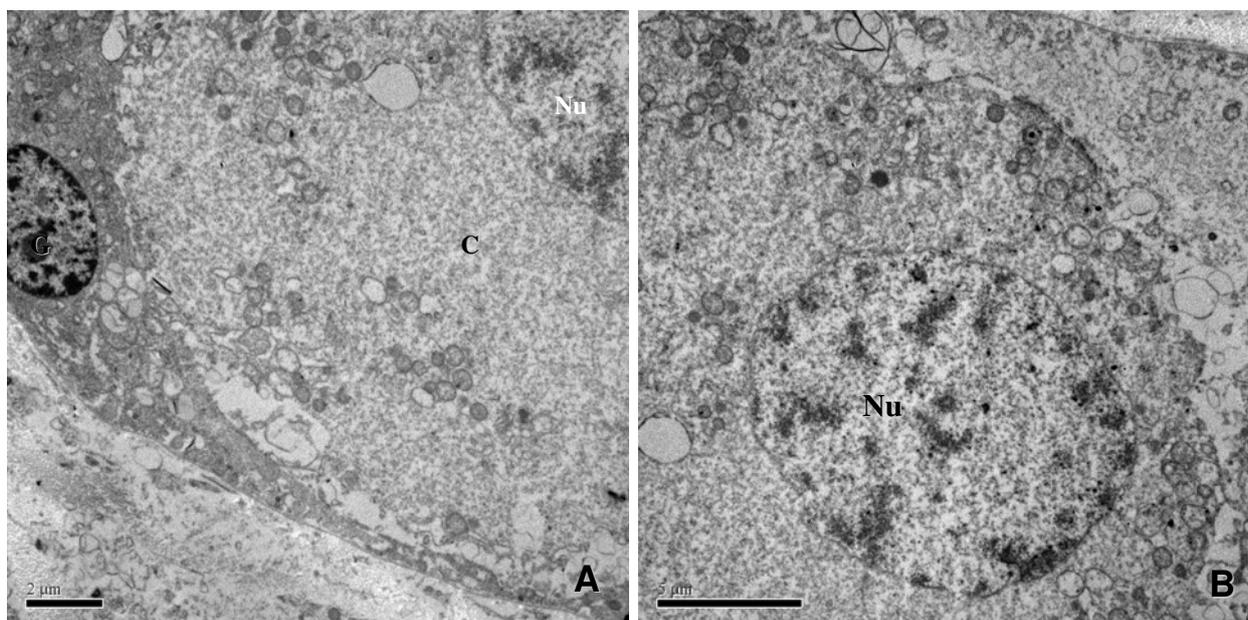
**Figura 10:** Micrografias eletrônicas de FOPA suíno morfologicamente normal do grupo controle. A) Vista panorâmica apresentando estruturas íntegras. Barra = 5  $\mu\text{m}$ . B) Detalhe do oócito, citoplasma com granulação normal. Observar início de deposição de material da zona pelúcida entre oócito e células da granulosa. Barra = 2  $\mu\text{m}$ . C) Vista da gota de lipídeo associada com retículo endoplasmático liso e mitocôndrias. Barra = 1  $\mu\text{m}$ . D) Mitocôndrias associadas ao retículo endoplasmático liso e apresentando acúmulos de cálcio. Barra = 0,5  $\mu\text{m}$ . Notar a granulação delicada do citoplasma do oócito. Nu= núcleo; L= lipídeo;G= célula da granulosa; ZP= Zona Pelúcida; M= Mitocôndria; REL= Retículo endoplasmático liso.



**Figura 11:** Micrografias eletrônicas de FOPA suíno morfologicamente normal do grupo controle. A) Retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com acúmulo de cálcio. Barra = 0,5 μm. B) Complexo de Golgi. Barra = 0,2 μm. C) Mitocôndrias com cristas e acúmulo de cálcio (cabeças de seta). Barra = 0,2 μm. D) Detalhe de ergastoplasma. Barra = 1 μm. Observar a granulação delicada do citoplasma. M= mitocôndria; REL= Retículo endoplasmático liso; CG = Complexo de Golgi; ERG= Ergastoplasma

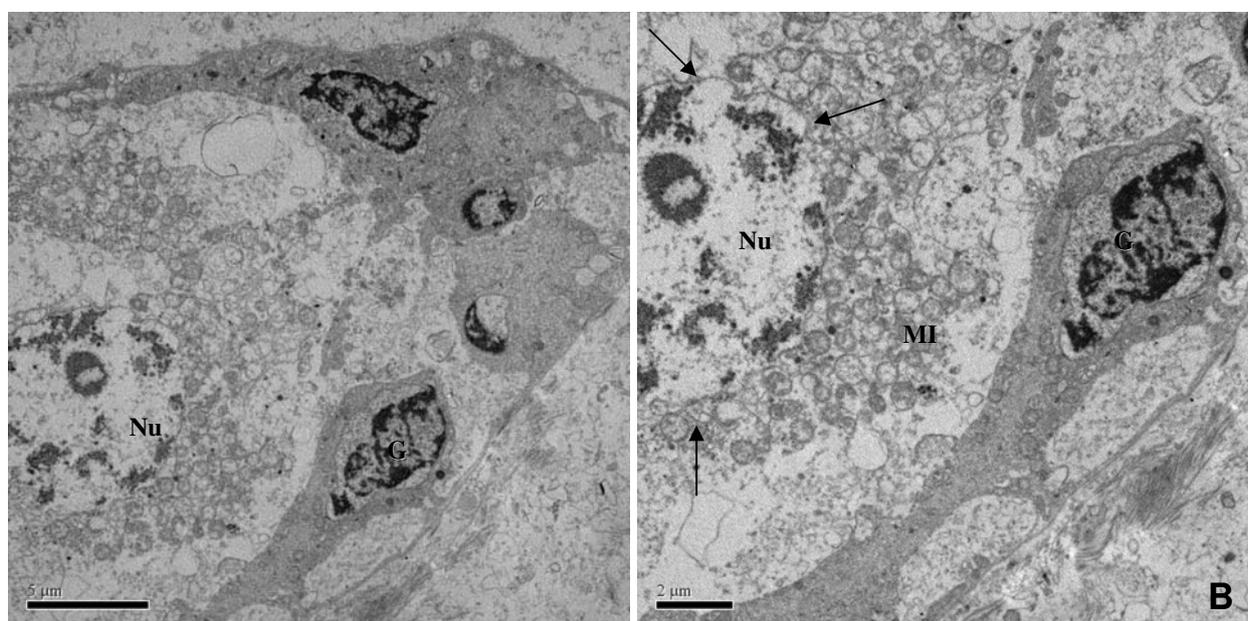
A visualização ultraestrutural das amostras submetidas a criopreservação permitiu a detecção de danos severos e irreversíveis nos folículos pré-antrais. Vale a pena ressaltar que estes danos ultraestruturais não puderam ser observados pela histologia.

Dentre um total de 13 folículos ovarianos submetidos ao tratamento de CRIO avaliados, apenas 1 mostrou morfologia próxima da normal (Figura 12).

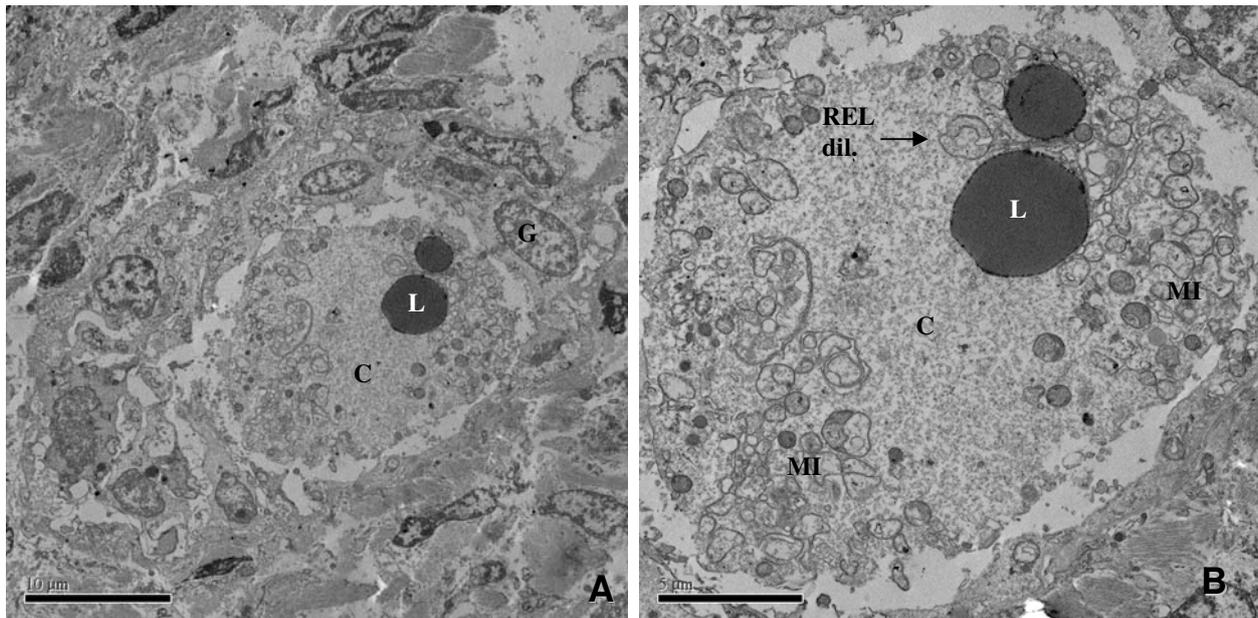


**Figura 12:** Micrografias de folículo pré-antral suíno do tratamento de criopreservação com morfologia aparentemente normal. Notar a granulação do citoplasma ligeiramente alterada. Barra = 2 µm. A) Oócito e célula da granulosa. B) Detalhe do núcleo do oócito. Barra = 5 µm. G= célula da granulosa; C= citoplasma do oócito; Nu= Núcleo

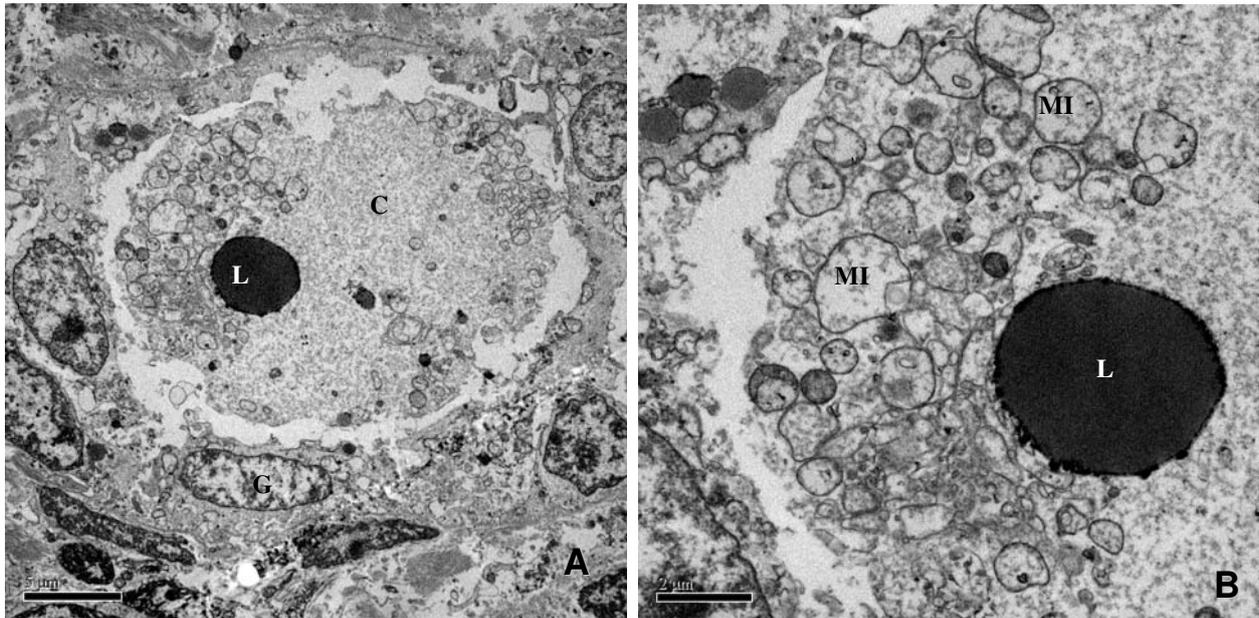
Os outros FOPA tratados (CRIO) apresentaram danos irreversíveis: granulação citoplasmática grosseira, ruptura da membrana nuclear (Figura 13) e cromatina nuclear alterada. Também houve inchaço das mitocôndrias com desaparecimento de suas cristas, inchaço das cisternas de retículo endoplasmático (Figuras 13B, 14B, 15 A e B). As células da granulosa estavam desorganizadas e com morfologia alterada e por vezes descoladas do oócito (Figuras 14A e 15A). Gotículas de lipídeo demonstraram-se quase sempre presentes no citoplasma do oócito (Figuras 14 e 15).



**Figura 13:** Folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO. A) Visão geral. Barra = 5 µm. B) Detalhe do citoplasma e núcleo do oócito. Barra = 2 µm. Notar ruptura da membrana nuclear (setas), mitocôndrias inchadas e sem cristas. Nu= Núcleo; MI= Mitocôndrias inchadas; G= célula da granulosa



**Figura 14:** Folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO. A) Visão geral. Notar desorganização das células da granulosa e seu descolamento do oócito. Barra = 10 µm. B) Detalhe do citoplasma do oócito. Barra = 5 µm. Presença de gotículas de lipídeo, mitocôndrias inchadas com ausência de cristas e cisternas de retículo endoplasmático dilatadas. REL dil. = Retículo endoplasmático dilatado; MI= Mitocôndrias inchadas; C= Citoplasma; L= Lipídeo; G= célula da granulosa



**Figura 15:** Folículo pré-antral suíno do tratamento CRIO. A) Visão geral. Barra = 5  $\mu\text{m}$ . Notar células da granulosa desorganizadas, com morfologia alterada e descoladas do oócito. B) Detalhe do citoplasma do oócito. Barra = 2  $\mu\text{m}$ . Presença de gotículas de lipídeo e mitocôndrias inchadas com ausência de cristas. Notar a granulação grosseira do citoplasma do oócito. L= Lipídeo; C= Citoplasma; G= célula da granulosa; MI= Mitocôndrias inchadas

## 7. Discussão

Este trabalho mostra que após resfriado e criopreservado há uma nítida alteração dos folículos pré-antrais e que, portanto, não foi possível conservar as células germinativas suínas com o método utilizado. Na análise histológica não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. No entanto, no tratamento CRIO-CIV o número total de folículos observados nas lâminas (105) foi menor do que nos outros tratamentos (198 a 262). O fato de não ter sido possível contar um número de folículos neste tratamento semelhante aos dos outros tratamentos pode estar relacionado com danos sofridos aos folículos, ou seja, possivelmente os folículos sofreram degeneração e não foram identificados no tecido ovariano durante as análises. Ainda na histologia, as degenerações observadas com maior frequência foram retração do citoplasma do oócito e núcleo do oócito picnótico, independente do tratamento. Este achado está de acordo com Jorio et al. (1991), que descreveram que em FOPA o oócito é mais sensível que as células da granulosa, diferentemente do que ocorre em folículos antrais.

Embora não fosse possível detectar os danos pela análise histológica, a análise ultraestrutural revelou com clareza as modificações morfológicas sofridas pelo oócito e pelas células da granulosa. A MET foi, portanto, um instrumento indispensável para avaliação detalhada dos folículos pré-antrais suínos, já que apresentam um poder de resolução 1000 vezes superior ao ML. Por isso um ponto importante a ser ressaltado é que a MET é capaz de revelar resultados diferentes da ML. Um exemplo disto pode ser demonstrado no trabalho de Carvalho et al. (2001), no qual a ML revelou que os folículos pré-antrais de caprinos resfriados à

4°C estavam morfológicamente normais após 24h. Porém, já na MET foi revelado que estes folículos estavam normais apenas até 12h.

Trabalhos realizados somente com resfriamento de folículos pré antrais em várias espécies e inclusive em suínos foram descritos com sucesso. Andrade et al. (2001) realizou o resfriamento em ovinos em diferentes temperaturas: 4, 20 e 39°C por 4, 12 e 24h em solução salina 0,9% e em solução de Braun-Collins, obtendo sucesso à 4°C em ambas soluções por um período de até 24h. Já em caprinos, Carvalho et al. (2001) confirmou sucesso a 4°C por um período de até 12h (período inferior comparado com o de ovelhas) também em solução salina 0,9% e em solução Braun-Collins. A conservação de folículos pré-antrais em baixas temperaturas foi realizada também em bovinos por Lucci et al. (2004), no qual houve sucesso na conservação a 4°C por 18h sem danos morfológicos e também a 20°C, mas somente por um período de até 6h.

Em suínos, Lucci et al. (2007) demonstrou que a estocagem de folículos pré-antrais à 4°C por até 18h não demonstrou alteração morfológica. Posteriormente, Brito (2008) observou através da microscopia eletrônica de transmissão que os FOPA conservados a 4°C por 18h apresentaram ultraestrutura normal. No entanto, estes dois trabalhos estudaram apenas o resfriamento, e não foi realizada posterior criopreservação.

Com relação a criopreservação de tecido ovariano, sem resfriamento prévio, vários estudos foram feitos em bovinos (Lucci et al., 2004), camundongos (Aubard et al., 1998) caprinos (Rodrigues et al., 2004ab), coelhos (Neto et al., 2007), ovelhas (Gosden et al., 1994; Salle et al., 1998; Demirci et al.; 2001; Capacchietti et al., 2004), e humanos (Hovata et al., 1996; Gosden, 2000., Schmidt et al.; 2003). De um modo geral, os trabalhos sugerem que os crioprotetores que obtiveram melhores resultados em espécies domésticas foram DMSO e EG (Lucci et al., 2004; Rodrigues et al., 2004ab, Capacchietti et al., 2004).

Em suínos, Borges et al. (2007) realizaram a criopreservação de FOPA testando quatro diferentes crioprotetores (DMSO, EG, PROH e GLY), obtendo

melhores resultados com DMSO e EG. Em todos estes trabalhos houve resultados promissores, porém nenhum associou a criopreservação a um resfriamento prévio.

A idéia da associação entre uma técnica de resfriamento e uma de criopreservação se deve as características intrínsecas de cada tratamento. O resfriamento permite o transporte de material ovariano de locais longínquos até laboratórios especializados sem que haja perda significativa das funções dos folículos ovarianos que é um fator bastante importante (Roy & Treacy, 1993). Um bom exemplo é a perda de um animal com alto valor genético em um local afastado dos laboratórios. Uma temperatura mais baixa mantém o metabolismo lento e desta forma minimiza a ocorrência de possíveis danos. Já a criopreservação permite a estocagem das células em questão por um longo período de tempo.

O único trabalho que realizou a associação de protocolos (resfriamento e criopreservação) em espécies de animais domésticos foi feito em bovinos por Celestino et al.(2008). Estes autores trabalharam com fragmentos ovarianos bovinos contendo folículos pré-antrais utilizando 2 protocolos distintos de resfriamento (a 20°C por 1h ou a 4°C por 24h) em solução salina 0,9%. Além disso, utilizou diversos crioprotetores (DMSO, EG, PROH e GLY). O protocolo que usou o resfriamento a 4°C por 24h e criopreservação com 1,5 M de EG comprovou a eficácia da metodologia na viabilidade dos folículos pré-antrais. Porém, o protocolo bastante similar utilizado neste estudo (alterando só o tempo de resfriamento para 18h) não alcançou o resultado desejado nos folículos pré-antrais suínos.

O insucesso da associação de protocolos de resfriamento e criopreservação em tecido ovariano suíno pode se dever a vários fatores. Um destes fatores é a diferença entre espécies. No entanto, a maior dificuldade no que se refere à conservação de oócitos suínos em baixas temperaturas, especialmente inferiores a 15°C, é a alta sensibilidade ao frio (Didion et al., 1990), devido à grande quantidade de lipídeos presente no citoplasma dos oócitos (Nagashima et al., 1994; Mc Evoy et al., 2000). Um estudo mais aprofundado no que se refere à taxa e composição lipídica da membrana e das inclusões

citoplasmáticas dos folículos ovarianos de suínos seria interessante para uma maior compreensão do mecanismo de sensibilidade ao frio. Portanto, para que se possa chegar a um protocolo ideal e se torne possível à criação de um banco de germoplasma, estudos relativos à dosagem de lipídeos e a composição de ácidos graxos presentes nos oócitos e folículos ovarianos suínos são de fundamental importância.

De um modo geral mais estudos precisam ser feitos, testando diferentes tempos e temperaturas de resfriamento e talvez diferentes métodos de criopreservação para que esta associação mantenha a ultraestrutura dos folículos pré-antrais suínos.

## **8. Conclusão**

O presente trabalho demonstrou que a associação dos protocolos de resfriamento e criopreservação de tecido ovariano suíno não preserva a ultraestrutura dos folículos ovarianos pré-antrais.

Da forma como foi realizado, o resfriamento de tecido ovariano seguido de criopreservação não é viável para suínos.

## 9. Referências Bibliográficas

ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C.H., GINTHER, O.J. 1992. Association between surges of folliclestimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 94: 177-188.

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

ANDRADE, E., RODRIGUES, A.P., C.A; CARVALHO , F.C., DODE, M.A., FIGUEIREDO, J.R. 2001. Short term maintenance of sheep preantral follicles *in situ* in 0.9% saline and Braun- Collins solution. *Small Ruminant Research.*, 41: 141-149.

AUBARD, Y., NEWTON, H., SCHEFFER, G., GOSDEN, R. 1998. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.*, 79: 83–87.

BECKERS, F.J., DRION, P.V, FIGUEIREDO, J.R., et al. 1996. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. *Reproduction in Domestic Animals.*, 31: 543-548.

BOLAMBA, D., RUSS, K.D., OLSON, M.A., SANDLER, J.L., DURRANT, B.S. 2002. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology.*, 58: 1689-1703.

BORGES, E.N., SILVA, R. C., FUTINO, D.O., BRITO, R.C.B., AMORIM, C.A., BÁO, S.N., LUCCHI, C.M. 2007. Efeito de diferentes crioprotetores na criopreservação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano suíno. *Acta Scientiae Veterinariae.*, 35 (Supl.3): 977.

BRITO, R.C.B. 2008. Efeito da conservação de ovários a baixas temperaturas na morfologia de ovócitos imaturos inclusos em folículos ovarianos primordiais suínos. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília /Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária: 40p.

BUCCIONE, R., SCHROEDER, A.C., EPPIG, J.J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction.*, 43: 543-547.

CAPACHIETTI G., CECCONI, S., GIOIA, L., TURIANI, M. 2004. Effect of Cryoprotectant Agents on the Potential Development of Sheep Preantral Follicles. *Veterinary Research Communications.*, 28: 173-176.

CARROL, J., WOOD, M.J., WHITTINGHAN, D.J., TELFER, E., GOSDEN, R.G. 1990. Extra -ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 90: 321-327.

CARROL, J., WOOD, M.J., WHITTINGHAN, D.J. 1993. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biology of Reproduction.*, 48: 606-612.

CUNNINGHAM, J.G. 2004. Tratado de Fisiologia Veterinária. Ed. Guanabara Koogan, 579p.

CARVALHO, F.C.A., LUCCI, C.M., SILVA, J.R.V., ANDRADE, E.R., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R. 2001. Effect of Braun-Collins and Saline solution at different temperatures and incubation times on quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Animal Reproduction Science.*, 66:195-208.

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

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

DIDION, B.A., POMP, D., MARTIN, M.J., HOMANCIS, G.E., MARKERT, C.L. 1990. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Journal of Animal Science.*, 68:2803-2810.

EPPIG, J.J. 1976. Analisis of mouse oogenesis *in vitro*. Oocyte isolation in the utilization of exogenous energy sources by grownthing oocytes. *Journal of Experimental Zoology.*, 198: 375-382.

EPPIG, J.J., SCHROEDER, A.C. 1989. Capacity os mouse oocytes from preantral follicles undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction.*, 41: 268-276.

ERICKSON, G.F. 1986. Analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology.*, 4:233-254.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. 2002. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Varela Editora e Livraria LTDA, p. 227-260.

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

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C.O., TURZILLO, A.M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction.*, 65: 648-654.

GOSDEN, R.G. 2000. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology.*, 163:125-129.

GOSDEN, R.G., BAIRD, D.T., WADE, J.C., WEBB, R. 1994. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Human Reproduction.*, 9 (4):597-603.

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

GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I., WEBB, R. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term of culture *in vitro*. *Biology Reproduction.*, 62: 1322-1328.

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

HAFEZ, E.S.E., Jainudeen, M.R., Rosnina, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. 2004. In Hafez, E.S.E. and Hafez, B. *Reprodução Animal*. Ed. Manole, p.33-54.

HAFEZ, E.S.E and HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In Hafez, E.S.E. and Hafez, B. 2004. *Reprodução Animal*. Ed. Manole, p.69-82.

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

HIRSHFIELD, A.N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovarian. *International Review of Cytology.*, 124, 43-101.

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

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovines ovaries. *Veterinary Quart.*, 16: 78-80.

JORIO, A., MARIANA, J.C., LAHLOU-KASSI, A. 1991. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Animal Reproduction Science.*, 26:239–250.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Histologia Básica. 1999. Ed.Guanabara Koogan,. p. 367-374.

LAZZARI, G., GALLI, C., MOOR, R.M. 1992. Centrifugal Elutriation of porcine oocytes isolated from ovaries of newborn piglets. Analytical Biochemistry., 200: 31-35.

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

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

LUCCI, C.M., KACINSKIS, M.A., RUMPF, R., BÀO, S.N. 2004b. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. Theriogenology, 61: 461–472.

LUCCI, C.M., SCHREIER, L.L., MACHADO, G.M., AMORIM, C.A., BÀO, S.N., DOBRINSKY, J.R. 2007. 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 Animal., 42: 76-82.

MARIANTE, A.S., CASTRO, S.T.R., ALBUQUERQUE, M.S.M. 2003. Pig biodiversity in Brazil. Archivos de Zootecnia., 52: 245-248.

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

McEVOY, T.G., COULL, G.D., BROADBENT, P.J., HUTCHINSON, J.S., SPEAKE, B.K. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 118:163-170.

NAGASHIMA, H., KASHIWAZAKI, N., ASHMAN, R.J., GRUPEN, C.G., SEAMARK, R.F., NOTTLE, M.B. 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology of Reproduction.*, 51:618-622.

NETO, V., BUFF, S., LORNAGE, J., BOTTOLLIER, B., GUÉRIN, P., JOLY, T. 2008. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertility and Sterility.*, 89:1348-1356.

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

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

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

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

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

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

SCHMIDT, K.L.T., ERNST, E., BYSKOV, A.G., ANDERSEN, A.N., ANDERSEN, C.Y. 2003. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Human Reproduction.*, 18: 2654–2659.

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

TELFER, E.E., BINNIE, J.P., MCCAFFERY, F.H., CAMPBELL, B.K. 2000. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology.*, 163: 117-123.

TELFER, E.E. 2001. *In Vitro* development of pig preantral follicles. *Reproduction.*, 58: 81-90. (suppl.)

TORRANCE, C., TELFER, E.E., GOSDEN, R.G. 1989. Quantitative study of development of oocytes isolated mouse preantral follicles in collagen gel culture. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 87: 367-374.

WU, J. EMERY, B.R., CARREL, D.T. 2001. *In Vitro* growth, maturation, fertilization and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction.*, 64: 375-381.