

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ADELINE DE ANDRADE CARVALHO

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO CAPRINO

TERESINA
2010

ADELINE DE ANDRADE CARVALHO

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO CAPRINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia, fisiopatologia, biotécnicas da reprodução e fisiopatologia do stress.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA
2010

Vitrificação de tecido ovariano caprino

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Adeline de Andrade Carvalho

Aprovada em: 28/01/2010

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa
Orientador- Universidade Federal do Piauí-
UFPI

Prof^ª.Dr^ª. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
Co-Orientadora – Universidade Estadual do Ceará –
UECE

Prof. Dr. Gregório Elias Nunes Viana
Examinador – Universidade Federal do Piauí –
UFPI

Prof. Dr. Rômulo José Vieira
Examinador – Universidade Federal do Piauí –
UFPI

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram
para esta conquista através do apoio, carinho e
ensinamento.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por criar oportunidade e me dar força para alcançar meus objetivos;

Aos meus professores, desde ensino fundamental até a pós-graduação, por todos os ensinamentos;

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela formação profissional e oportunidade a mim concedida de realizar minha pós-graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pelo incentivo, oportunidade e crescimento, tanto profissional como pessoal;

À Universidade Estadual do Ceará, sobretudo ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), por me receber de braços abertos e permitir a execução deste trabalho;

Ao Professor José Ricardo de Figueiredo, por me incentivar desde o primeiro contato e me aceitar em seu laboratório, sem jamais haver distinção entre mim e os demais orientados;

À Professora Ana Paula Ribeiro Rodrigues, por ser mais que uma co-orientadora, ser uma orientadora sempre paciente em sanar minhas dúvidas e me ajudar a vencer minhas dificuldades;

Ao Professor Cláudio Cabral, por pacientemente realizar a estatística do meu experimento, refazê-la e explicar-me quantas vezes fosse necessário;

Ao Professor Rômulo José Vieira, por ter me instigado o interesse pela reprodução, me incentivado a realizar o estágio que me permitiu o vínculo para a execução dessa dissertação, pela orientação e tempo sempre concedido quando precisei (apesar de oficialmente não ser meu orientador), pelos conselhos sempre tão valiosos quanto ao sucesso profissional e realização pessoal (muito obrigada!);

Ao Professor Amilton Paulo Raposo Costa, por me aceitar como orientanda em um período conturbado e por exercer tão bem esse cargo (obrigada pelos conselhos, oportunidades, confiança e paciência);

Aos demais professores que me acompanharam e me apoiaram nessa jornada, sou muito grata;

A todos os servidores, tanto da UFPI quanto da UECE, pois sem o auxílio dos mesmos seria inviável a execução deste trabalho;

A todos os “lamofopenses”, pela receptibilidade e conhecimentos transmitidos, em especial à “crioequipe”, por ser uma equipe pequena, porém unida, por me incluírem tão prontamente e tão naturalmente ao grupo e por estarem sempre dispostos a trabalhar e ajudar, mesmo que isso custasse noites e noites de sono perdidas;

Aos pós-graduandos Luciana Faustino e Cleidson Silva, por transmitirem ensinamentos, tranquilidade e a certeza de que todo nosso esforço não seria em vão. Da mesma forma, ao Rafael Rosseto, que junto com o Cleidson e a equipe da CRIO tornaram toda essa etapa menos difícil e mais alegre;

Aos meus padrinhos (Mônica e Paulo) e ao amigo Alencar, por me ajudarem em momentos difíceis e pelo carinho e atenção sempre destinados a mim;

Aos amigos (grandes amigos) de pós-graduação, em especial ao Ednaldo Filho (Tico!), Márcio Costa (Marcinho) e Flaviane (Super-Fla), por fazerem dessa jornada bem mais que um aprendizado e torná-la sempre agradável e prazerosa (muitas saudades!);

A todos da Patologia, por me aceitarem como “agregada” e compartilharem do convívio e ensinamentos (por mais que este trabalho não esteja ligado à patologia, aprendi muito com todos vocês);

A todos os amigos de toda a vida, pois a distância não nos separa nem minimiza nosso carinho. Impossível citar a todos, mas a colaboração de vocês em minha vida é sempre essencial;

Ao Kleverton (Mô), pelo apoio e confiança (até quando nem eu mesma tinha), pelo carinho e cumplicidade e por me ajudar a superar essa distância dolorosa;

A toda minha família, especialmente meus tios e primos, que mesmo a distância não diminui esse amor. Sei que estão sempre torcendo e vibrando com cada conquista minha (a recíproca é sempre verdadeira);

À minha irmã (Aline) por ser mais que uma irmã, e também mais que uma amiga, na verdade não tenho palavras para descrever sua importância, só sei que é fundamental para mim;

Ao presentinho mais fofo que poderia ganhar nesse ano, minha sobrinha (Dudinha) que mesmo tão pequena já enche a tia de alegria e saudades;

Ao meu irmão, que apesar da distância e das brigas (ou até mesmo por elas!) me ajudou a ser mais paciente;

Aos meus pais (Adelaide Andrade e Luiz Sampaio) por me darem a educação, instrução e amor que fizeram de mim o que sou hoje. Tudo faço para retribuir e orgulhá-los, amo vocês!

Aos que infelizmente não são aqui citados, mas que colaboraram direta ou indiretamente, seja no âmbito profissional ou pessoal. Cada palavra e cada incentivo estão guardados em minha memória com imenso carinho;

Muito Obrigada!

*“O que sabemos é uma gota; o que
ignoramos é um oceano”*

Isaac Newton

RESUMO

Atualmente, na criobiologia, a vitrificação tem sido uma alternativa aos protocolos de congelamento lento de células, tecidos e órgãos reprodutivos como o ovário, sobretudo pela capacidade de reduzir a formação de gelo intracelular, bem como pelo baixo custo, praticidade e rapidez na execução. Diversos tipos de técnicas e soluções têm sido utilizados com sucesso para a realização da vitrificação, no entanto, ainda não existe disponível uma solução com composição ideal que garanta a preservação de um grande número de folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano caprino independente da técnica utilizada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar por histologia e coloração por Azul de Tripán o tecido ovariano fresco (não vitrificado - controle) com o tecido ovariano após vitrificação em palhetas francesas (PT), superfície sólida (SS) e macrotubo (MT). Além disso, foi avaliado também o efeito de seis diferentes soluções de vitrificação sobre a morfologia folicular ovariana. As soluções foram compostas por um meio base (MB) constituído por meio essencial mínimo (MEM) e etilenoglicol (EG) 6 M, sem ou adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) e duas diferentes concentrações (0,5 e 0,25 M) de sacarose, constituindo as soluções de vitrificação 1 a 6 (SV1:MB; SV2:MB+SFB; SV3:MB+Sac 0,25 M; SV4:MB+Sac 0,25 M+SFB; SV5:MB+Sac 0,50 M e SV6:MB+Sac 0,50 M+SFB). No tocante à análise estatística, foi utilizado o teste de Dunnett para a comparação entre o controle e os grupos vitrificados. Já o teste Student-Newman-Keuls (SNK) foi utilizado para comparar os resultados obtidos com a utilização das diferentes técnicas, bem como as seis diferentes soluções de vitrificação utilizadas. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram expressos em média \pm DP. O procedimento de vitrificação, independente da técnica ou solução utilizada, reduziu significativamente o percentual de folículos morfologicamente normais quando comparado ao tecido fresco (88%). Dentre as diferentes técnicas, verificou-se que em PT e MT o percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normais (FPMN) foi menor do que para SS, quando a SV2 foi utilizada. Resultados similares foram observados em PT quando comparado com MT e SS utilizando as soluções SV3 e SV6. Por outro lado, não houve diferença entre as soluções SV1, SV4 e SV5 quando realizada a vitrificação por MT ou SS, no entanto, a SV4 foi a única solução que mostrou um resultado significativamente melhor quando as palhetas foram utilizadas. Após análise de viabilidade (Azul de Tripán) realizada apenas com a solução SV4 nas três técnicas de vitrificação, observou-se que a SS foi a única capaz de manter a viabilidade folicular. Com base nestes resultados pode-se concluir que a adição de 0,25 M de sacarose e 10% de SFB associada à vitrificação por SS, apesar de reduzir o percentual de FPMN mantém a viabilidade folicular após vitrificação.

Palavras-chave: Criopreservação. Vitrificação. Tecido ovariano. Folículos pré-antrais.

ABSTRACT

Currently, in cryobiology, vitrification has been an alternative to slow freezing protocols of cells, tissues and reproductive organs, such as ovary, especially the ability to reduce intracellular ice formation and the low expense, convenience and speed of execution. Several techniques and solutions have been used successfully to achieve vitrification, however, yet is unavailable a solution that preserve large number of preantral follicles present in ovarian tissue goat independent of the technique used. Thus, this study aimed measure by histology and staining Trypan Blue the fresh ovarian tissue (non-vitrified - control) and ovarian tissue after vitrification in straw plastic (PT), solid surface (SS) and makrotube (MT). Furthermore, it also evaluated the effect of six different vitrification solutions in ovarian follicular morphology. The solutions were composed of a basic medium (MB) constituted from minimum essential medium (MEM) and ethylene glycol (EG) 6 M, without or adding 10% fetal calf serum (FCS) and two different concentrations (0.5 and 0.25 M) of sucrose, constituting the vitrification solutions 1 to 6 (SV1: MB; SV2: MB + FCS; SV3: MB + 0.25 M Suc, SV4: MB + 0.25 M Suc + FCS; SV5: MB + 0.50 M Suc and SV6: MB + 0.50 M + Suc + FCS). Regarding the statistical analysis, we used the Dunnett test for compare control and vitrified groups. Since the test Student-Newman-Keuls (SNK) was used to compare the results obtained in different techniques, as well as six different vitrification solutions used. Differences were considered significant when $P < 0.05$ and results were expressed as mean \pm SD. The vitrification procedure, regardless of the technique or used solution, significantly reduced the percentage of morphologically normal follicles when compared to fresh tissue (88%). Among the different techniques, it was found that PT and MT in the percentage of preantral follicles with normal morphology (FPNM) was lower than for SS when SV2 was used. Similar results were observed in PT when compared with MT and SS solutions using SV3 and SV6. Moreover, there was no difference between the solutions SV1, SV4 and SV5 when performed vitrification MT or SS, however, the SV4 was the only solution that showed a significantly better when straws plastic were used. After viability analysis (Trypan Blue) performed only with solution SV4 in three vitrification techniques, observed that the SS was only one able to maintain follicular viability. In conclusion the addition of 0.25 M sucrose and 10% FCS associated vitrification SS, although reducing the percentage of FPNM maintain follicular viability after vitrification.

Keywords: Cryopreservation. Vitrification. Tissue ovarian. Preantral follicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura morfológica do ovário onde se observa a região medular, responsável pela irrigação e inervação ovariana, e a cortical, onde estão dispostos os folículos em diferentes estádios de desenvolvimento. (ZILLGITT 2009).....17

Figura 2. Representação esquemática do desenvolvimento folicular desde o folículo primordial até o folículo pré-ovulatório. Respectivamente, em A, B e C, estão representados os folículos primordiais, primários, e secundários (folículos pré-antrais) e, em D e E, respectivamente, os folículos terciários e pré-ovulatórios (folículos antrais). Os componentes foliculares são também indicados: 1) oócito; 2) células do estroma; 3) células da pré-granulosa em formato pavimentoso; 4) células da granulosa de formato cúbico; 5) zona pelúcida; 6) células da granulosa; 7) membrana basal; 8) cavidade antral; 9) camadas de células da teca externa; 10) camada de células da teca interna; 11) células do cumulus e 12) núcleo do oócito em metáfase II (SIMÕES et al, 2002).....18

Figura 3. Representação esquemática do recrutamento e atresia folicular, onde se percebe que do *pool* de folículos primordiais recrutados para o crescimento, apenas um chegará à ovulação. Adaptado de Kaipia e Hsueh (1997).....20

Figura 1. Representação esquemática da organização molecular em estado líquido (A), no qual as moléculas de água possuem uma maior movimentação por encontrarem-se unidas por ligações fracas (pontes de hidrogênio). Durante a realização do procedimento de congelamento lento, forma-se um estado cristalino caracterizado por um sólido organizado (B), no qual as moléculas estão unidas por um maior número de ligações e estas se dispõem de forma fixa e hexagonal, resultando em um afastamento das moléculas e formação de cristais. Já no processo de vitrificação, observa-se um estado de não-equilíbrio, conhecido como estado vítreo (C), caracterizado por um sólido amorfo em que parte das cadeias moleculares encontra-se desorganizada, permitindo certa flexibilidade entre as moléculas.....29

Figura 2. Desenho representativo da técnica de OPS, na qual o meio de criopreservação contendo os oócitos preenche a OPS por capilaridade.....31

Figura 3. Foto representativa da técnica de DVC (<i>Direct Cover Vitrification</i>). A amostra submetida à vitrificação é coberta por N ₂ líquido, proporcionando uma brusca redução na temperatura. Adaptado de Chen et al., 2006.....	32
Figura 4. Foto representativa da técnica de <i>cryoloop</i> , na qual a amostra submetida à vitrificação permanece ligada ao laço de nylon pela tensão obtida através da viscosidade da solução crioprotetora. Adaptado de Luster, 1999.....	33
Figura 5. Foto representativa da vitrificação em espátula, evidenciando a extremidade plana e a gota com o material a ser vitrificado. Adaptado de Tsang e Chow, 2009.....	33
Figura 6. A figura representa a técnica de vitrificação por superfície sólida, no qual o fragmento (A) é sobreposto em um cubo metálico (B) parcialmente submerso em N ₂ líquido.....	34
Figura 7. Foto representativa de um <i>cryotop</i> . Observa-se a palheta de polipropileno (a) acoplada a uma alça plástica (b). A tampa plástica (c) recobre a palheta, impedindo o contato direto com o N ₂ líquido (d). Adaptado de Kuwayama, 2005.....	35
Figura 1. Desenho experimental dos procedimentos de vitrificação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de cabras	51
Figura 2. Características morfológicas de folículos pré-antrais antes (A, B e C) e após vitrificação (D a I). Em A, observa-se um folículo normal com uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso. Em B e C, respectivamente, folículos também normais com uma e duas camadas de células da granulosa de formato cúbico. Folículos normais após a vitrificação em PT/SV3 (D); MT/SV5 (E) e SS/SV5 (F). Em G (PT/SV5) verifica-se folículos degenerados apresentando picnose nuclear e uma leve retração citoplasmática. Intensa retração do citoplasma e desorganização das células da granulosa são observadas em H e I (SS/S5). CGp- células da pré-granulosa de formato pavimentoso; CGc- células da granulosa de formato cúbico; CO- citoplasma do oócito; NO- núcleo do oócito, NP- núcleo picnótico, seta fina- retração citoplasmática; seta larga- desorganização das células da granulosa.....	55

Figura 3. Fotomicrografias de folículos pré-antrais mecanicamente isolados e expostos ao corante vital azul de tripan. (A) Folículo pré-antral viável (não corado). (B) Folículo pré-antral não viável (corado).....56

Figura 4. Análise de viabilidade folicular por azul de Tripan em folículos pré-antrais viáveis no controle ou vitrificados por PT, MT ou SS.

^{a, b} Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões.....	37
Tabela 2. Resultados mais relevantes obtidos com a vitrificação de oócitos.....	39
Tabela 3. Principais resultados obtidos com a vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais.....	41
Tabela 1. Percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais no tecido ovariano fresco ou não vitrificado (controle) e após vitrificação. * $P<0.05$, difere significativamente do córtex ovariano não vitrificado (controle). ^{A,B} Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa entre as técnicas de vitrificação ($P<0.05$). ^{a,b} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre as soluções de vitrificação ($P<0.05$).....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1. Estrutura morfológica e ciclo do ovário mamífero.....	16
<i>1.1.1. Estrutura morfológica do ovário.....</i>	<i>16</i>
<i>1.1.2. Ciclo ovariano.....</i>	<i>17</i>
1.2. Dinâmica folicular no ovário mamífero.....	18
<i>1.2.1. Folículos ovarianos.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2. Depleção dos folículos ovarianos.....</i>	<i>19</i>
1.3. Aplicação da Criopreservação na Reprodução Assistida.....	21
<i>1.2.1. Princípios gerais da criopreservação</i>	<i>21</i>
<i>1.2.2. Vitrificação.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.3. Porque criopreservar tecido ovariano.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.3.4. Avanços recentes na vitrificação de tecido ovariano em animais domésticos...</i>	<i>24</i>
2. CAPÍTULO I - Vitrificação: alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas para a implantação de criobancos.....	26
3. CAPÍTULO II - Avaliação de folículos pré-antrais caprinos vitrificados usando diferentes técnicas e soluções de vitrificação.....	48
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
5. REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Estrutura morfológica e ciclo do ovário mamífero

1.1.1. Estrutura morfológica do ovário

O ovário mamífero é um órgão endócrino complexo, que possui duas funções principais: *i*) a produção de esteróides sexuais responsáveis por preparar a fêmea adulta para a reprodução, ou seja, permitir o desenvolvimento das características sexuais secundárias e fornecer suporte para a gestação, e *ii*) a diferenciação e liberação de oócitos maduros em intervalos apropriados durante o período fértil para a propagação das espécies (MCGEE e HSUEH, 2000). Estruturalmente, como mostrado na Figura 1, o ovário é composto por uma região medular e uma cortical. Na medula encontram-se principalmente tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e nervos. Já o córtex ovariano é composto por folículos em diferentes fases, isto é, desde folículos primordiais em repouso (grande maioria) até grandes folículos pré-ovulatórios. Além dos folículos, também estão presentes corpos lúteos e corpos albicans, distribuídos no estroma ovariano (MAGOFFIN et al., 2005).

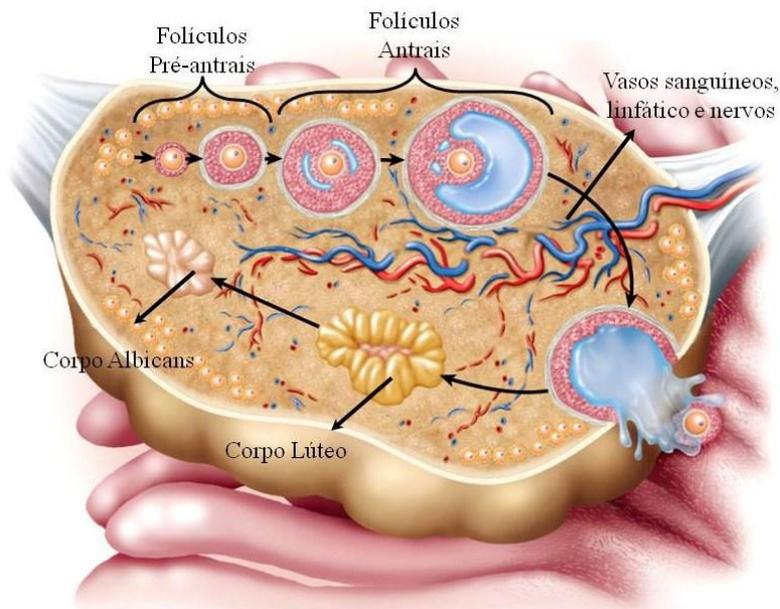


Figura 1. Estrutura morfológica do ovário onde se observa a região medular, responsável pela irrigação e inervação ovariana, e a cortical, onde estão dispostos os folículos em diferentes estádios de desenvolvimento (ZILLGITT 2009).

1.1.2. Ciclo ovariano

O ciclo ovariano tem início com a formação das células germinativas primordiais (CGP) e pode ser dividido em quatro fases. Na primeira delas, ainda na embriogênese, a população de CGP e células somáticas torna-se uma massa ovariana integrada que constitui os folículos primordiais. Essa primeira fase, conhecida por *foliculogênese*, inicia-se ainda no útero, quando ainda é independente de gonadotrofinas. Na segunda fase, a qual tem início na puberdade e é dependente de gonadotrofinas, ocorrem os processos de *oogênese*, *granulogênese* e *tecoogênese*. Nesta fase, os folículos primordiais crescem e desenvolvem-se até o estágio pré-ovulatório ou são perdidos por atresia. A terceira fase, desencadeada pelo hormônio luteinizante, se caracteriza pela *ovulação*, a qual se caracteriza pela liberação de um ócito maturo possível de ser fertilizado. Na última e quarta fase do ciclo ovariano, o folículo, agora sem ócito, sofre uma luteinização, transformando-se em uma estrutura endócrina, denominada corpo lúteo (SUH et al., 2002; MALTARIS et al., 2009).

1.2. Dinâmica folicular no ovário mamífero

1.2.1. Folículos ovarianos

O folículo, unidade morfofuncional do ovário mamífero, é constituído basicamente por um oócito localizado centralmente e envolto por células somáticas (células da granulosa e da teca) e, dependendo do estágio de desenvolvimento, apresenta zona pelúcida e cavidade antral preenchida por líquido folicular (Figura 2). Essa estrutura é formada ainda durante a embriogênese e tem seu desenvolvimento controlado por fatores endócrinos e parácrinos (McGEE e HSUEH, 2000).

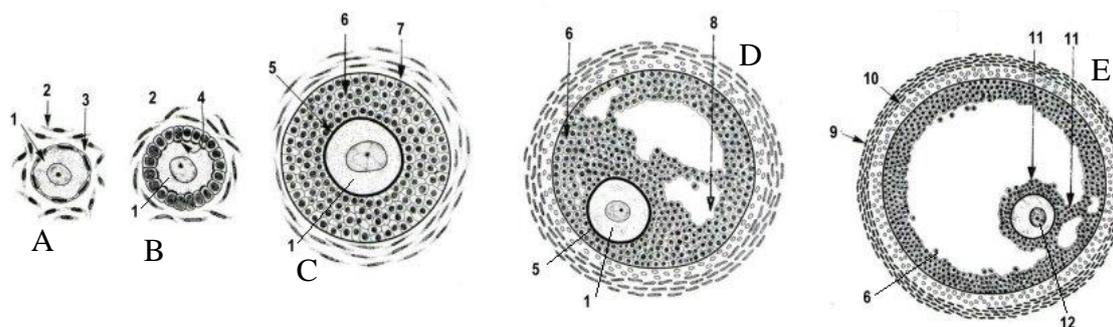


Figura 2. Representação esquemática do desenvolvimento folicular desde o folículo primordial até o folículo pré-ovulatório. Respectivamente, em A, B e C, estão representados os folículos primordiais, primários, e secundários (folículos pré-antrais) e, em D e E, respectivamente, os folículos terciários e pré-ovulatórios (folículos antrais). Os componentes foliculares são também indicados: 1) oócito; 2) células do estroma; 3) células da pré-granulosa em formato pavimentoso; 4) células da granulosa de formato cúbico; 5) zona pelúcida; 6) células da granulosa; 7) membrana basal; 8) cavidade antral; 9) camadas de células da teca externa; 10) camada de células da teca interna; 11) células do cumulus e 12) núcleo do oócito em metáfase II (SIMÕES et al., 2002).

Os diferentes tipos de folículos presentes no ovário estão divididos em duas grandes classes, isto é, os folículos pré-antrais ou não cavitários e os folículos antrais ou cavitários (Figura 3). Os folículos pré-antrais representam a fase inicial do desenvolvimento folicular e compreendem os folículos primordiais, primários e secundários. A partir de então, os folículos desenvolvem-se para o estágio terciário e pré-ovulatório e passam a conter uma cavidade (antro) repleta de fluido (VARGHESE et al., 2008).

O folículo primordial encontra-se no estágio de dormência ou repouso é constituído por um oócito estacionado na fase de prófase I, envolto por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso, delimitada por uma membrana basal. Com o desenvolvimento, os folículos passam do estágio primordial para o primário, caracterizado por conter uma camada de células da granulosa de formato cúbico. Com a multiplicação e consequente surgimento de mais camadas de células da granulosa, o folículo passa a ser denominado secundário.

Quando há a formação da cavidade antral, os folículos passam ao estágio terciário e pré-ovulatório (MAGOFFIN et al., 2005; RAJKOVIC et al., 2006). É nesta fase que apenas um dos folículos recrutados desenvolver-se-á até a ovulação e os demais sofrerão atresia (EDSON et al., 2009) causando a depleção folicular.

1.2.2. Depleção dos folículos ovarianos

Este processo se dá principalmente por apoptose (morte celular programada) das células da granulosa em resposta a privação hormonal (KIESS e GALLAHER, 1998) e acomete mais de 99% dos folículos. A depleção ocorre tanto em folículos antrais como pré-antrais, não estando exclusivamente relacionado com a dominância folicular (TILLY, 1996; MAGOFFIN et al., 2005). Contudo, a atresia de folículos imaturos permanece imperceptível devido à remoção eficiente e rápida dos detritos celulares (corpos apoptóticos) por macrófagos residentes (TILLY, 1996). Na figura 3 observa-se o desenvolvimento folicular, evidenciando-se o recrutamento dos folículos (término do estágio de dormência e início do desenvolvimento folicular), ovulação e atresia.

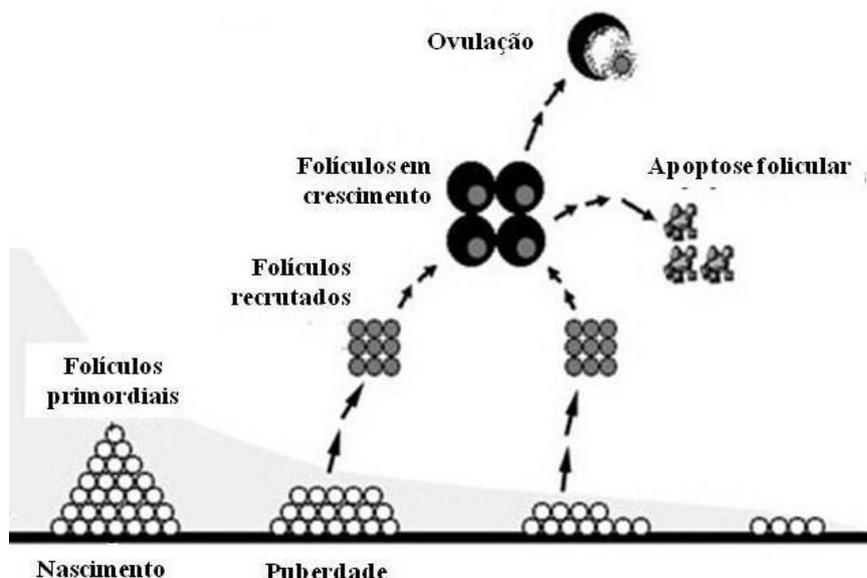


Figura 3. Representação esquemática do recrutamento e atresia folicular, onde se percebe que do *pool* de folículos primordiais recrutados para o crescimento, apenas um chegará à ovulação. Adaptado de Kaipia e Hsueh (1997).

A apoptose no ovário tem um papel fundamental na limitação do número de folículos que chegarão à ovulação e, conseqüentemente, reduz o número de embriões por fêmea (KIESS e GALLAHER, 1998). Este é um processo ativo e autônomo, que evita a inflamação (FINK e COOKSON, 2005). É considerado um processo hormonal complexo que envolve supostos fatores de sobrevivência (fatores de crescimento e estrógeno) e indutores de atresia (andrógenos e hormônio liberador de gonadotrofinas), sendo a ação destes fatores dependente da fase folicular (KIESS e GALLAHER, 1998; STOUFFER, 2006).

A perda folicular também pode ocorrer em decorrência de fatores externos como tratamentos de radio e/ou quimioterapia. A ionização ocasionada pela radiação resulta em efeitos adversos nos ovários, em todas as fases do desenvolvimento folicular, sobretudo em folículos primordiais. As altas doses de radioterapia utilizadas em tratamentos contra o câncer podem resultar em falência ovariana prematura e depleção da reserva de folículos primordiais, ocasionando esterilidade. Quanto à quimioterapia, todas as drogas quimioterápicas atuam

interrompendo processos celulares vitais e cessando ciclo de proliferação celular normal (MALTARIS et al., 2009). Atualmente, vários estudos relacionados à reprodução humana (ISACHENKO et al., 2009; KEROS et al., 2009) têm mostrado algumas alternativas para manter a fertilidade feminina antes do início de tratamentos contra o câncer. A criopreservação de tecido ovariano, por exemplo, tem sido uma técnica utilizada com sucesso, pois, além de conservar os folículos ovarianos por décadas (RUBINSKY, 2003), ainda permite o restabelecimento da função reprodutiva após o transplante de ovário previamente criopreservado (BORDES et al., 2005).

1.3. Aplicação da Criopreservação na Reprodução Assistida

A criopreservação funciona como uma estratégia para a preservação do estoque de folículos ovarianos que seriam perdidos pelo processo natural de atresia ou pela radio/quimioterapia.

1.2.1. Princípios gerais da criopreservação

A criopreservação por definição consiste na preservação de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -150°C (KARTHA, 1985). A capacidade de um material biológico sobreviver ao processo de criopreservação está diretamente ligada à sua resistência às etapas do procedimento (congelamento lento ou vitrificação) utilizado. Independente da congelamento lento ou vitrificação, a criopreservação é constituída por cinco etapas fundamentais: 1) exposição ao agente crioprotetor (ACP); 2) resfriamento e redução gradual da temperatura ou vitrificação; 3) estocagem em nitrogênio (N_2) líquido; 4) descongelamento ou aquecimento e 5) remoção do ACP (SANTOS et al., 2008).

A congelação lenta tem como característica principal a redução gradual da temperatura, no entanto, há o risco da formação intracelular de gelo que está correlacionada com danos de membrana (ACKER e McGANN, 2003). Neste âmbito, a vitrificação mostra-se como uma alternativa, uma vez que a redução brusca de temperatura proporciona a passagem do líquido para um estado vítreo amorfo, sem a formação de cristais de gelo (RUBINSKY, 2003). Além disso, a vitrificação é uma técnica prática e de custo reduzido, o que facilita seu emprego a campo. Em virtude dessas vantagens a técnica de vitrificação será apresentada nesse trabalho com maiores detalhes.

1.2.2. Vitrificação

A vitrificação baseia-se na formação de um sólido amorfo (vítreo), não cristalino no qual não há a formação de cristais de gelo. No processo de vitrificação, a transição para o estado vítreo ainda não está bem elucidada (YAMAKI et al., 2002) porém, sabe-se que o líquido super-congelado mantém as propriedades físicas de um líquido até que a temperatura de vitrificação seja atingida. Dessa maneira, o líquido adquire propriedades físicas de um sólido, mas o arranjo molecular desorganizado é mantido (WOWK, 2009), obtendo-se uma substância com características semelhantes ao estado líquido e outras próprias de um sólido cristalino (YAMAKI et al., 2002). Para a vitrificação, é necessária uma alta viscosidade, alcançada pela elevada concentração de ACP, e rápida redução da temperatura (WOWK, 2009). A vitrificação pode ser realizada por meio de várias técnicas, divididas basicamente em dois grupos: *i)* com contato direto com o N₂ líquido e *ii)* sem contato direto com o N₂ líquido.

O contato direto com o N₂ parece favorecer a vitrificação, uma vez que há uma redução mais rápida da temperatura, o que facilita e acelera o processo (CHEN et al., 2000; 2006). Por outro lado, essa forma pode contribuir para a contaminação do material vitrificado, inclusive por contaminantes que podem estar presentes no N₂ líquido (GROUT e MORRIS,

2009). Com a finalidade de estabelecer uma técnica mais segura e eficiente, vários estudos têm realizado a vitrificação em grades de microscopia eletrônica (KIM et al., 2006), em espátula (TSANG e CHOW, 2009), em agulhas (WANG et al., 2008) e *cryoloop* (SUCCU et al., 2007).

Dentre os métodos que não têm contato direto com o N₂, a vitrificação em palhetas convencionais tem sido largamente utilizada (KASAI et al., 1990; CETIN e BASTAN, 2006). Além dessa, destacam-se também as técnicas de palhetas fechadas (CHEN et al., 2001), hemipalhetas (LIEBERMANN e TUCKER, 2002) e *cryotop* (KUWAYAMA, 2005). Ambas as formas de vitrificação (com ou sem contato direto com o N₂ líquido) têm sido utilizadas para a criopreservação de tecido ovariano e estão detalhadamente descritas no capítulo I desta dissertação.

1.2.3. *Porque criopreservar tecido ovariano*

O ovário mamífero alberga o *pool* de folículos pré-antrais que funciona como a reserva oocitária por toda a vida da fêmea (PARIS et al., 2009). Centenas de oócitos imaturos, no interior desses folículos encontram-se no córtex ovariano e podem ser criopreservados *in situ* (inclusos no tecido ovariano) sem estimulação hormonal (ZHOU et al., 2009). Os oócitos imaturos presentes no interior dos folículos pré-antrais parecem ser mais resistentes ao processo de criopreservação do que oócitos maduros, por diversas características. Dentre as quais, pode-se destacar: a) o pequeno tamanho do oócito; b) baixa taxa metabólica; c) estágio do ciclo celular (parado em prófase I); d) pequeno número de células de suporte; e) ausência de zona pelúcida; f) ausência de grânulos corticais e g) pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos (SHAW et al., 2000; KAGAWA et al., 2009).

A grande vantagem da criopreservação do córtex é que a colheita independe da idade e fase do ciclo estral (SHAW et al., 2000) além de envolver menos questões éticas e sociais que

a criopreservação de oócitos e embriões, sobretudo quando esse processo é realizado na espécie humana (ZHANG et al., 2009). Essa característica é extremamente interessante para a reprodução clinicamente assistida, especialmente para mulheres que necessitam iniciar de imediato o tratamento contra o câncer, não havendo atraso no tratamento (ZHOU et al., 2009). A criopreservação de tecido ovariano também é uma alternativa para meninas que ainda não tenham atingido a puberdade ou mulheres que não possuam parceiros para a doação de gametas masculinos (VARGHESE et al., 2008). Para a medicina veterinária, a criopreservação de tecido ovariano também tem uma grande importância, sobretudo para animais domésticos de alto valor genético que venham a óbito de forma inesperada (SHAW et al., 2000), ou até mesmo para os programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção.

1.2.3.4. Avanços recentes na vitrificação de tecido ovariano em animais domésticos

A vitrificação tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos em várias espécies, sobretudo em camundongos, utilizados como modelo para a aplicação desta técnica. Eimani et al. (2007) utilizando a técnica de *cryotop* em tecido ovariano de camundongas, mostraram que apesar de haver uma redução significativa na sobrevivência folicular do tecido vitrificado, folículos pré-antrais isolados e cultivados *in vitro* por quatro dias, retomaram o crescimento folicular similarmente ao observado em folículos não vitrificados. Nessa mesma espécie, Kagawa et al. (2007) realizaram o transplante de tecido ovariano fresco ou previamente vitrificado também por *cryotop* e posteriormente realizaram a fertilização *in vitro* de oócitos oriundos do tecido ovariano enxertado. Os autores não observaram diferenças significativas para a taxa de fertilização e clivagem entre o tecido ovariano fresco e vitrificado. Além disso, foi obtido uma taxa de implantação de 42%, que resultou no nascimento de 10 crias saudáveis após a vitrificação e transplante do tecido ovariano.

As técnicas que permitem o contato direto com o N₂ líquido parecem favorecer o processo de vitrificação. Chen et al. (2006) e Lin et al. (2008) realizaram a vitrificação de tecido ovariano de camundongas, respectivamente pelas técnicas de cobertura direta e superfície sólida e mostraram um percentual de sobrevivência folicular e ultraestrutura similar entre o tecido ovariano fresco e vitrificado. Com relação às espécies domésticas, o tecido ovariano bovino vitrificado por superfície sólida sem excesso de solução (*cryotissue*), resultou em morfologia e arquitetura foliculares semelhantes ao tecido fresco (KAGAWA et al., 2009). No tocante a espécie caprina, de grande importância econômica para a região Nordeste, os estudos ainda são bastante escassos. Santos et al. (2007) mostraram que nessa espécie a vitrificação, tanto em palheta convencional como por superfície sólida na presença de uma solução de vitrificação composta por sacarose (0,5 M) e etilenoglicol (35%) , resultou em percentual de folículos morfologicamente normais semelhante ao controle. No entanto, a viabilidade folicular após 24 de cultivo do tecido ovariano foi inferior ao tecido não vitrificado, sugerindo que a composição da solução de vitrificação utilizada por esses autores foi insatisfatória. Neste sentido, torna-se indispensável determinar a composição de uma solução de vitrificação que possa ser utilizada independente da técnica empregada.

2. CAPÍTULO I

Vitrificação: alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas para a implantação de criobancos

(Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material of females to implementation cryobanking)

Adeline de Andrade *Carvalho*^{1,2*}, Luciana Rocha *Faustino*¹, José Ricardo de *Figueiredo*¹,
Ana Paula Ribeiro *Rodrigues*¹, Amilton Paulo Raposo *Costa*²

¹Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais
LAMOFOPA - Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil

²Laboratório de Biotecnologia e Reprodução, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina,
Piauí, Brasil.

*Correspondência:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi

Fortaleza - CE - Brasil

CEP: 60740-000

TEL: (85)3101.9852

FAX: (85) 3101.9840

E-mail: adelineandrade@gmail.com

Resumo

A vitrificação é um método de criopreservação barato, rápido e fácil de ser realizado e tem sido usado com relativo sucesso para a preservação de embriões e oócitos obtidos a partir de folículos antrais e pré-antrais. A presente revisão descreve os diferentes métodos de vitrificação, os principais resultados obtidos, bem como sua importância para a tecnologia de reprodução assistida em humanos, animais de genética superior e espécies mamíferas ameaçadas de extinção.

Palavras-chave: blastocisto, oócito, folículo ovariano pré-antral

Abstract

Vitrification is a cryopreservation method's cheap, fast and easy to perform and has been used, with relatively success, for the preservation of embryos and oocytes from preantral and antral follicles. The present review describes the different methods of vitrification, the main results obtained so far as well as its important for the assisted reproduction technologies in human, genetic superior animal and endangered mammalian species.

Keywords: blastocyst, oocyte, preantral follicle

Introdução

A aplicação de determinadas técnicas na Reprodução Assistida (RA) tem evidenciado a necessidade de preservação de embriões e células reprodutivas para a manutenção de bancos de germoplasma (Bogliolo et al., 2007). Nesse contexto, diversos estudos foram realizados na área de criopreservação para o estabelecimento de protocolos eficientes que permitam a manutenção da viabilidade celular (Chian et al., 2004).

Atualmente, são relatados dois métodos para criopreservação, isto é, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta, também conhecida como congelação convencional, é caracterizada pela utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores e pela redução gradual da temperatura, controlada por um freezer programável (Mukaida et al., 2003; Naik et al., 2005). Apesar deste método ser amplamente difundido, a sua aplicação em programas de RA, apresenta um custo relativamente alto devido a necessidade de equipamentos sofisticados. Além disso, a formação de cristais de gelo intracelulares (CGI)

que ocorre durante a realização do processo de congelação representa um grande desafio a ser vencido, tendo em vista que esse fenômeno é um dos principais responsáveis por danos celulares irreversíveis durante a criopreservação (Morató et al., 2008). Portanto, para se obter uma preservação efetiva é necessária a utilização de um sistema ou técnica que previna a cristalização da água. Desta forma, a vitrificação solucionaria esse problema, uma vez que nesse método, há a produção de um estado vítreo com os sistemas biológicos em que as células vivas podem sobreviver (Pegg, 2007).

O principal objetivo de um protocolo de criopreservação é atingir temperaturas criogênicas sem danos químicos e sem formação de gelo intracelular e isso pode ser idealmente alcançado pela vitrificação (Rubinsky, 2003). O método de vitrificação foi reportado pela primeira vez no começo da década de 40 por Luyet para a preservação de sêmen de sapo após desidratação em sacarose (Luyet, 1940). Desde então, vários pesquisadores têm relatado diferentes resultados obtidos com a utilização da vitrificação de células germinativas em inúmeras espécies.

O objetivo desta revisão é apresentar a descrição das diferentes técnicas de vitrificação, bem como os principais resultados obtidos para a preservação de embriões e células de linhagem reprodutiva feminina.

Processo de vitrificação

A vitrificação é caracterizada por altas concentrações de agentes crioprotetores (ACP), proporcionando viscosidade à solução de vitrificação a um valor suficientemente alto para comportar-se como um sólido, porém sem cristalização (Ali e Shelton, 1993; Dobrinski et al., 2000; Rubinsky, 2003, Chian et al., 2004). A termodinâmica mostra que se um líquido é resfriado suficientemente rápido a temperaturas criogênicas (resultando em queda de temperatura $>10.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$), pode-se evitar a congelação por se transformar em um estado altamente viscoso e amorfo, conhecido como vidro ou vítreo sólido (Fig.1). Conceitualmente, algo que está no estado vítreo amorfo (diferentemente de um cristal) é essencialmente um fluido com as propriedades mecânicas de um sólido (Rubinsky, 2003; Naik et al., 2005; Balaban et al., 2008).

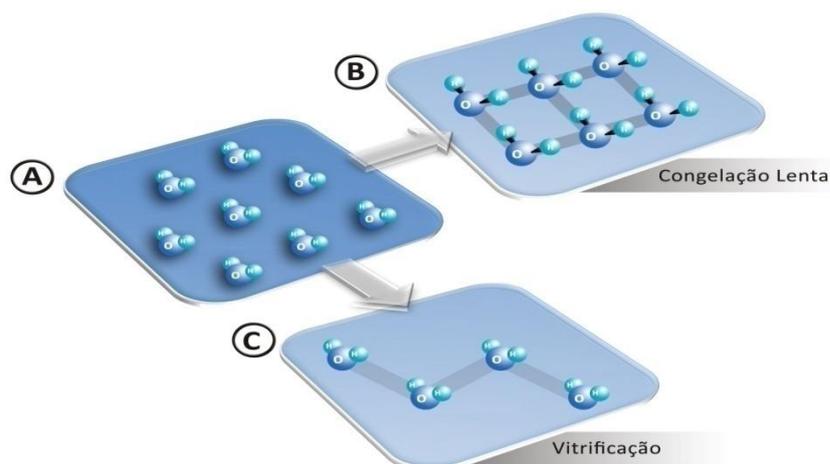


Figura 1. Representação esquemática da organização molecular em estado líquido (A), no qual as moléculas de água possuem uma maior movimentação por encontrarem-se unidas por ligações fracas (pontes de hidrogênio). Durante a realização do procedimento de congelamento lento, forma-se um estado cristalino caracterizado por um sólido organizado (B), no qual as moléculas estão unidas por um maior número de ligações e estas se dispõem de forma fixa e hexagonal, resultando em um afastamento das moléculas e formação de cristais. Já no processo de vitrificação, observa-se um estado de não-equilíbrio, conhecido como estado vítreo (C), caracterizado por um sólido amorfo em que parte das cadeias moleculares encontra-se desorganizada, permitindo certa flexibilidade entre as moléculas.

A vitrificação foi rapidamente adotada como um método prático alternativo à congelamento lento de espermatozóides, oócitos e embriões usados na medicina reprodutiva humana e, em animais de produção devido à simplicidade na sua execução, rentabilidade econômica e velocidade do procedimento de preservação (Vajta, 1998). Atualmente, vários trabalhos também têm mostrado a utilização desse método para a criopreservação de tecido ovariano (Dela Peña et al., 2002; Isachenko et al., 2003; Choi et al., 2008; Moniruzzaman et al., 2009). Embora, tenha sido demonstrado uma sobrevivência equivalente entre um material vitrificado e o fresco ou não criopreservado (Boonkusol et al., 2006; Chen et al., 2006; Sheehan et al., 2006; Santos et al., 2007), a grande maioria dos resultados ainda não apresenta repetibilidade. Esse fato pode ser devido às situações requeridas no processo de vitrificação como: (a) o uso de altas concentrações de ACP, as quais podem ser tóxicas quando introduzidos nas células; (b) o uso de altas taxas de resfriamento, e (c) de aquecimento, as quais também podem ser difíceis de serem atingidas quando utilizados grandes volumes de solução (Rubinsky, 2003). O conjunto de todas essas características representa a necessidade

de mais estudos nessa área, na tentativa de desenvolver protocolos ideais de vitrificação para a preservação de células reprodutivas de mamíferos.

Técnicas desenvolvidas para a vitrificação

Desde a primeira descrição do processo de vitrificação (Luyet, 1940) diversas técnicas, têm sido empregadas na busca de minimizar a quantidade de solução de vitrificação, bem como obter maior redução da temperatura, sem causar grandes perdas celulares. Dentre as diferentes técnicas de vitrificação, pode-se mencionar: **(a)** vitrificação convencional; **(b)** vitrificação em palhetas fechadas (CPS); **(c)** vitrificação em palhetas abertas (OPS); **(d)** pipetas de desnudamento *flexipet* (PDF); **(e)** vitrificação em grades de microscopia eletrônica; **(f)** vitrificação por cobertura direta (DVC); **(g)** *cryoloop*; **(h)** vitrificação em espátula; **(i)** vitrificação por imersão em agulhas; **(j)** vitrificação por superfície sólida; **(l)** *cryotop*. A descrição de cada uma dessas técnicas é apresentada a seguir.

a) *Vitrificação convencional* – Consiste no uso de palhetas francesas preenchidas com a solução de vitrificação e o material a ser criopreservado, sendo estas palhetas seladas e imediatamente imersas em nitrogênio (N₂) líquido (Ali e Shelton, 1993; Dela Peña et al., 2002). Uma adaptação deste método, como forma de reduzir a quantidade de solução crioprotetora, é o *método de hemi-palhetas*, no qual a palheta francesa de 0,25 ml é cortada ao meio e em sua superfície interna é inserida uma gota da solução de vitrificação com o material a ser vitrificado. A hemi-palheta é, então, mergulhada em N₂ líquido e, em seguida, inserida em uma palheta francesa de 0,5 ml para estocagem (Liebermann e Tucker, 2002). De modo similar à palheta francesa, são empregados criotubos, que suportam uma maior quantidade de solução crioprotetora (Bordes et al., 2005; Ishijima et al., 2006) e nossa equipe de pesquisa do LAMOFOPA (Laboratório de Manipulação de Oócitos em Folículos Pré-Antrais, Faculdade de Veterinária – FAVET, Universidade Estadual de Ceará – UECE) está estudando um método com o mesmo princípio básico, utilizando macrotubos. Este tipo de dispositivo permite a vitrificação de um fragmento de tecido ovariano maior (3x3x1 mm³) do que o comumente utilizado por diferentes grupos de pesquisa (1 mm³). Dessa forma, pode-se preservar um maior número de folículos pré-antrais por fragmento, por outro lado, utiliza-se uma maior quantidade de solução de vitrificação (1,8 ml).

b) *Vitrificação em palhetas fechadas* ou *CPS* (do inglês *Closed Pulled Straw*) – Nessa técnica uma palheta é fabricada artesanalmente a partir de uma palheta francesa, aquecida e alongada, com a finalidade de reduzir o seu diâmetro para facilitar a perda de calor (Chen et al., 2001). As extremidades da palheta são fechadas após a colocação das amostras a serem vitrificadas, impedindo o contato direto das mesmas com o N₂ líquido.

c) *Vitrificação em palhetas abertas* ou *OPS* (do inglês *Open Pulled Straw*) – Na busca por uma taxa de resfriamento ainda mais rápida, a técnica de *palhetas abertas* ou *OPS* mostra-se bastante vantajosa (Fig.2). Essas palhetas são fabricadas semelhantemente às CPS, no entanto, não são fechadas, permitindo o contato direto da amostra a ser vitrificada com o N₂ líquido. O preenchimento de ambas as palhetas (CPS e OPS) é realizado por capilaridade e, então, mergulhadas em N₂ líquido, permitindo a rápida solidificação do material presente em seu interior. Uma preocupação em relação ao uso da OPS é o risco de contaminação da amostra através do íntimo contato com o N₂ líquido (El-Gayar e Holtz, 2001).



Figura 2. Desenho representativo da técnica de OPS, na qual o meio de criopreservação contendo os oócitos preenche a OPS por capilaridade.

d) *Pipetas de desnudamento flexipet (PDF)* – Outro método, semelhante à OPS, consiste no uso de *pipetas de desnudamento flexipet (PDF)*, utilizadas na manipulação de embriões (Liebermann et al., 2002; Morató et al., 2008). Essas palhetas possuem características semelhantes à OPS, com a vantagem de serem padronizadas no tocante ao tamanho e diâmetro, visto que são fabricadas industrialmente.

e) *Vitrificação em grades de microscopia eletrônica* – Essa técnica também permite o contato direto da amostra com o N₂ líquido. O tecido ou célula submetido ao processo de vitrificação é posto sobre grades de microscopia eletrônica e, em seguida, é imerso no N₂ líquido. Após vitrificação, as amostras são armazenadas no N₂ líquido dentro de criotubos (Kim et al., 2006).

f) *Vitrificação por cobertura direta* ou *DVC* (do inglês *Direct Cover Vitrification*) – Dentre outras técnicas que permitem o contato com o N₂ líquido, a DVC apresenta-se como uma das técnicas que obtêm uma redução de temperatura mais brusca, uma vez que o material dentro do criotubo é coberto pelo N₂ líquido. Essa aplicação direta de N₂ maximiza o taxa de resfriamento, facilitando a passagem para o estágio vítreo, permitindo uma menor concentração de ACP na solução de vitrificação. Além disso, a quantidade de solução de vitrificação utilizada é reduzida, auxiliando no processo de vitrificação (Chen et al., 2006). A técnica de DCV está ilustrada na Fig.3.



Figura 3. Foto representativa da técnica de DVC (*Direct Cover Vitrification*). A amostra submetida à vitrificação é coberta por N₂ líquido, proporcionando uma brusca redução na temperatura. Adaptado de Chen et al., 2006.

g) *Cryoloop* – Partindo da mesma premissa do contato direto da amostra com o N₂ líquido, o método de *cryoloop* tem mostrado resultados satisfatórios com a vitrificação de embriões e oócitos em camundongos (Huang et al., 2005), humanos (Balaban et al., 2008) e ovinos (Succu et al., 2007). Essa técnica consiste na utilização de um instrumento constituído por uma alça de metal presa com um laço de nylon (Fig.4). Esse laço é preenchido por solução de vitrificação bastante viscosa devido à quantidade de ACP utilizada. Desse modo, o líquido

presente no laço confere uma tensão superficial, que mantém o material a ser vitrificado fixo no mesmo.

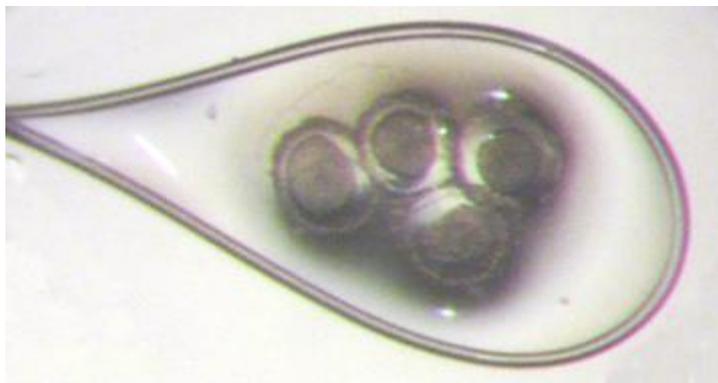


Figura 4. Foto representativa da técnica de *cryoloop*, na qual a amostra submetida à vitrificação permanece ligada ao laço de nylon pela tensão obtida através da viscosidade da solução crioprotetora. Adaptado de Luster, 1999.

h) *Vitrificação em espátula* – Esse método foi desenvolvido por Tsang e Chow (2009) e consiste em uma espátula preparada artesanalmente, de maneira que uma extremidade tenha uma forma plana, onde será colocada uma pequena gota com o material a ser vitrificado. Com o contato direto com o N₂ líquido, a gota solidifica-se e se torna aderida à superfície da espátula (Fig.5).

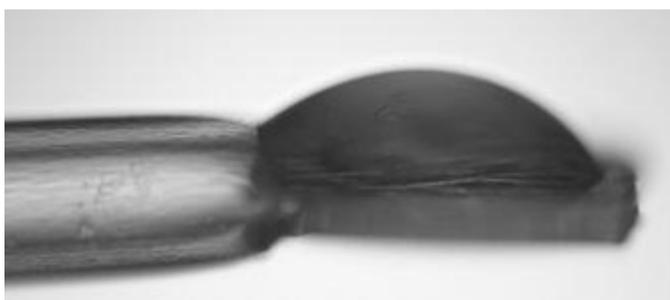


Figura 5. Foto representativa da vitrificação em espátula, evidenciando a extremidade plana e a gota com o material a ser vitrificado. Adaptado de Tsang e Chow, 2009.

i) *Vitrificação por imersão em agulhas* ou *NIV* (do inglês *Needle Immersed Vitrification*) – É uma técnica recentemente descrita que consiste na utilização de agulhas de acupuntura, na qual um fragmento de tecido é perfurado por estas agulhas e então exposto à solução de vitrificação e, em seguida, imerso no N₂ líquido. A grande vantagem deste método é a

possibilidade de utilizar vários fragmentos simultaneamente, presos na mesma agulha, submetendo-os às mesmas condições de vitrificação (Wang et al., 2008).

j) *Vitrificação por superfície sólida* – Esta técnica consiste na sobreposição da amostra em um cubo de metal, que pode, inclusive, ser confeccionado com o uso de papel alumínio (Santos et al., 2007). O cubo de metal, posicionado acima do N₂ líquido, por ser um bom condutor de calor, proporciona um rápido resfriamento da amostra, condição necessária para uma vitrificação eficiente (Fig.6). Posteriormente, a amostra é armazenada em criotubos e mantida em N₂ líquido (Al-Aghbari e Menino, 2002).

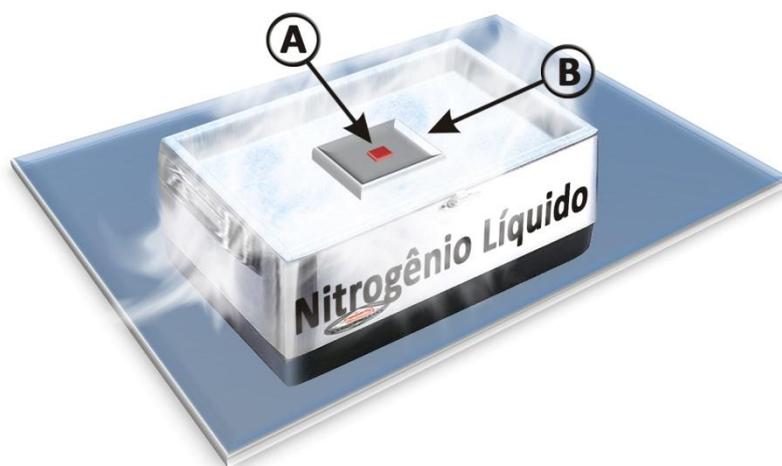


Figura 6. A figura representa a técnica de vitrificação por superfície sólida, no qual o fragmento (A) é sobreposto em um cubo metálico (B) parcialmente submerso em N₂ líquido.

l) *Cryotop* – Na tentativa de realizar a vitrificação com uma maior assepsia, a técnica de *cryotop* (Fig.7) tem sido bastante utilizada, sobretudo em clínicas de RA em humanos. Essa técnica consiste na utilização de uma palheta de polipropileno conjugada a uma haste plástica. Esta é utilizada para a manipulação, evitando o contato direto da mão do manipulador com a palheta. Além disso, o *cryotop* também é constituído por uma tampa plástica, que recobre a estrutura (palheta-haste), impedindo o contato com o N₂ líquido, favorecendo uma melhor assepsia do material vitrificado (Chian et al., 2004; Kuwayama, 2005; Moniruzzaman et al., 2009).

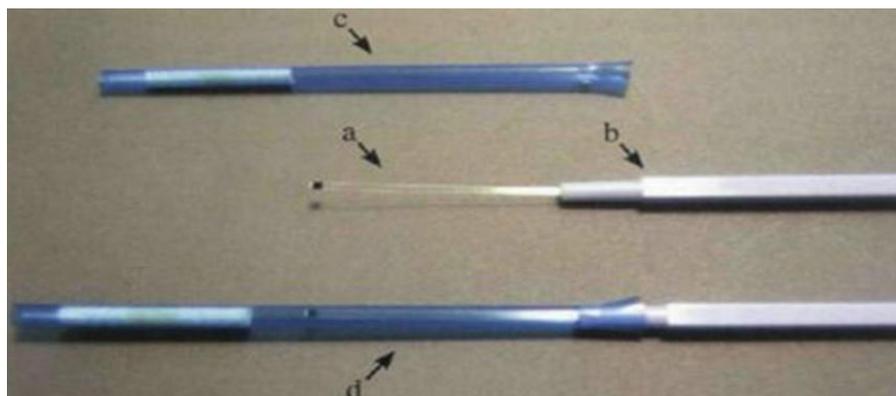


Figura 7. Foto representativa de um *cryotop*. Observa-se a palheta de polipropileno (a) acoplada a uma alça plástica (b). A tampa plástica (c) recobre a palheta, impedindo o contato direto com o N₂ líquido (d). Adaptado de Kuwayama, 2005.

Estado atual da vitrificação de embriões, oócitos oriundos de folículos antrais e pré-antrais

Vitrificação de embriões

A vitrificação em embriões foi relatada inicialmente na década de 80 (Rall e Fahy, 1985; Massip et al., 1987) e tem demonstrado sucesso em várias espécies, utilizando diferentes técnicas de vitrificação (humanos: Huang et al., 2005; camundongos: Kasai et al., 1990; bovinos: Park et al., 1999; suínos: Kobayashi et Dobrinski et al., 2000). Na tabela 1 encontram-se de forma resumida os principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões em diferentes espécies.

Estudos em humanos não relataram diferenças quanto à taxa de sobrevivência embrionária quando a vitrificação foi realizada pela técnica de hemi-palheta ou por *cryoloop*, porém houve uma maior taxa de clivagem quando utilizada a técnica convencional (Liebermann e Tucker, 2002). Apesar de menos satisfatória em relação à vitrificação convencional, em alguns estudos a técnica de *cryoloop* mostrou taxas de sobrevivência, implantação e desenvolvimento embrionário superiores quando comparada à congelação lenta (Mukaida et al., 2003; Huang et al., 2005; Balaban et al., 2008). Em humanos também tem sido demonstrado com sucesso, gestação a partir de embriões criopreservados por vitrificação convencional (Yokota et al., 2000), vitrificação em grades de microscopia eletrônica (Son et al., 2002) e por *cryotop* (Hiraoka et al., 2004).

No que se refere a camundongos, as técnicas de vitrificação convencional e *cryoloop* não mostraram diferenças significativas quanto à taxa de implantação entre vitrificados e frescos ou não vitrificados (Ali e Shelton, 1993; Sheehan et al., 2006; Tsang e Chow, 2009). De maneira semelhante, não houve diferença na taxa de desenvolvimento embrionário entre embriões vitrificados por superfície sólida e não vitrificados. Porém, após o procedimento de vitrificação, os embriões exibiram maior expressão do gene Hsp70, o qual está relacionado ao choque térmico (Boonkusol et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a vitrificação pode causar alterações mitocondriais que podem prejudicar de forma substancial o subsequente desenvolvimento embrionário (Zhao et al., 2009).

Quando aplicada em embriões bovinos, a vitrificação convencional assegurou uma taxa de sobrevivência superior a 57% (Kuwayama et al., 1992), embora essa taxa tenha sido inferior a taxa de sobrevivência de embriões frescos, geralmente próximo a 100% (Ali e Shelton, 1993; Boonkusol et al., 2006). Devido a esta redução na sobrevivência embrionária, tem-se buscado outras técnicas que se utilizem menor volume de solução, favorecendo, desta forma, a queda de temperatura e a formação do estado vítreo de forma mais eficiente. Neste sentido, técnicas como a vitrificação em grades de microscopia eletrônica e em OPS vêm sendo utilizadas com sucesso nessa espécie. A vitrificação em grades de microscopia eletrônica resultou em melhor qualidade embrionária quando comparada à vitrificação convencional (Park et al., 1999), enquanto a técnica de OPS, desenvolvida por Vajta e colaboradores (1998), não mostrou diferença significativa com relação a embriões não vitrificados.

A técnica de OPS, para vitrificação de embriões, tem proporcionado maiores taxas de nascimento quando comparada à congelação lenta, tanto em coelhas (Naik et al., 2005) quanto em cabras (El-Gayar e Holtz, 2001). Na espécie suína, os resultados ainda são contraditórios, com relatos de sobrevivência embrionária de 94,9% (Kobayashi et al., 1998), no entanto a vitrificação foi associada à redução na qualidade embrionária e no desenvolvimento *in vivo* após transferência de embriões previamente vitrificados (Dobrinsky et al., 2000).

Tabela 1. Principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões.

Técnicas de vitrificação	Espécies/ Animais	Resultados	Referências
Vitrificação convencional	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrevivência de embriões vitrificados até o estágio de 4 células similar à de embriões frescos; • Obtenção de crias saudáveis 	ALI e SHELTON, 1993
Vitrificação convencional	Suínos	<ul style="list-style-type: none"> • Nascimento de crias normais; • Animais obtidos a partir da vitrificação de embriões com capacidade para gerar descendentes normais 	DOBRINSKY et al., 2000
<i>Cryotop</i>	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> • Gestação avançada (33 semanas) 	HIRAOKA et al., 2004
<i>Cryoloop</i>	Camundongos e Humanos	<ul style="list-style-type: none"> • Alta taxa (77%) de sobrevivência embrionária após cultivo in vitro Nascimento de crias normais; 	HUANG et al., 2005
<i>Cryoloop</i>	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sobrevivência embrionária (94,8%) 	BALABAN et al., 2008
Vitrificação em espátula	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> • 67,8% de nascimentos 	TSANG e CHOW, 2009

Vitrificação de oócitos oriundos de folículos antrais

A vitrificação de oócitos tem sido alvo de várias pesquisas, principalmente no que se refere ao grande questionamento acerca do estágio de maturação mais adequado para a aplicação desse procedimento de criopreservação (Luna et al., 2001; Tharasanit et al., 2006; Gupta et al., 2007). Os principais resultados obtidos com a vitrificação de oócitos em diferentes espécies são mostrado na tabela 2.

Na espécie suína, devido à grande quantidade de gotas lipídicas intracitoplasmáticas, os resultados obtidos após criopreservação de oócitos mostram-se inferiores àqueles obtidos nas demais espécies. Além disso, os relatos sobre a viabilidade de oócitos suínos vitrificados, em estágio de maturação, ou seja, núcleo em estágio de metáfase II (MII), ou imaturo, são contraditórios. Há relatos de que o estágio de maturação não interfere na viabilidade, taxa de clivagem e formação de blastocistos (Gupta et al., 2007). Contudo, alguns estudos indicam que oócitos maduros são mais sensíveis à vitrificação, resultando em baixa taxa de viabilidade (30%), alterações nos microtúbulos e na organização das mitocôndrias, com comprometimento da fertilização e consequentes alterações cromossômicas nos embriões originados destes oócitos (Somfai et al., 2006; Shi et al., 2007).

Em camundongos, a vitrificação convencional de complexo cumulus-oócito (CCO) resultou em maior percentual de sobrevivência que a vitrificação por OPS e por grades de microscopia eletrônica. Contudo, a vitrificação convencional causou uma redução no percentual de fuso meiótico normal. Em virtude disso, a vitrificação por CPS mostra-se mais vantajosa para vitrificação de oócitos de camundongos, uma vez que manteve os percentuais de sobrevivência e fuso meiótico normais (Chen et al., 2001).

A criopreservação de oócitos maduros em humanos por vitrificação convencional demonstrou uma recuperação mais rápida do fuso meiótico do que a congelação lenta (Ciotti et al., 2009). Além disso, a vitrificação por *cryoloop* resultou em alta taxa de sobrevivência (80,6%) similar a encontrada em oócitos vitrificados por hemi-palhetas (85,4%) conforme Liebermann e Tucker, 2002. A técnica de *cryoloop* também resultou em maior percentual de sobrevivência quando comparada à vitrificação convencional, apesar de não terem sido relatadas diferenças significativas (Saki e Dezfuly, 2005).

Em bovinos, oócitos imaturos em estágio de vesícula germinativa vitrificados de forma convencional mostraram, após maturação *in vitro*, uma redução no percentual de oócitos em metáfase II quando comparados a oócitos imaturos não vitrificados (Cetin e Bastan, 2006). Também foram observadas redução no percentual de blastocistos, aumento em anormalidades no fuso (Morató et al., 2009) e na incidência de diploidia (Luna et al., 2001), lise nas células do cumulus e turgidez na crista mitocondrial e retículo endoplasmático (Diez et al., 2005) após vitrificação por OPS. Contudo, a técnica de *cryotop* mostra-se importante para criopreservação de oócitos, uma vez que uma alta taxa de sobrevivência (97,6%) foi obtida após vitrificação de oócitos maduros (Chian et al., 2004). Além disso, apesar das dificuldades citadas, Viera et al. (2002) relataram nascimento de bezerros normais após a vitrificação de oócitos imaturos por OPS.

Apesar de alguns resultados satisfatórios, a vitrificação de oócitos está associada à redução na qualidade oocitária (Luna et al., 2001; Shi et al., 2007; Morató et al., 2009). Além disso, redução na taxa de maturação, anormalidades no fuso (Tharasanit et al., 2006) e fraturas na zona pelúcida com extravasamento do conteúdo celular (Dhali et al., 2000) foram observadas após vitrificação de oócitos de éguas, por OPS (Dhali et al., 2000), e búfalas, por vitrificação convencional (Tharasanit et al., 2006). Em ovinos, por exemplo, danos no fuso meiótico, na cromatina e na membrana celular foram observados após vitrificação de oócitos por *cryoloop* (Bogliolo et al., 2007; Succu et al., 2007), refletindo diretamente na redução na taxa de clivagem e desenvolvimento de blastocistos (Succu et al., 2007). Por outro lado,

quando esta mesma técnica foi aplicada em oócitos de coelhas, pode-se observar uma taxa de sobrevivência acima de 80% (Cai et al., 2005).

Tabela 2. Resultados mais relevantes obtidos com a vitrificação de oócitos.

Técnicas de vitrificação	Espécies/ Animais	Resultados	Referências
Vitrificação convencional e CPS	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> • Altas taxas de sobrevivência (77 – 79%) 	CHEN et al., 2001
Grades de microscopia eletrônica	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> • 56,7% de fertilização 	KIM et al., 2006
Vitrificação em hemipalheta	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> • 71% de maturação oocitária 	ISACHENKO et al., 2006

Vitrificação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais

A vitrificação de folículos pré-antrais, inclusos (*in situ*) ou não (isolados) no tecido ovariano, tem sido realizada em várias espécies (humanos: Isachenko et al., 2003; caninos: Ishijima et al., 2006; camundongos: Choi et al., 2008; suínos: Moniruzzaman et al., 2009). Criopreservar folículo pré-antral tem como grande vantagem a preservação de milhares de oócitos presentes nessa categoria folicular, a qual corresponde à grande maioria dos folículos presentes no ovário. A tabela 3 apresenta de forma resumida os principais resultados obtidos com a vitrificação de folículos pré-antrais, inclusos ou não no tecido ovariano, em diferentes espécies.

Em camundongos, a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais após vitrificação convencional, seguida do desenvolvimento folicular *in vitro*, não mostrou diferenças significativas entre folículos pré-antrais vitrificados e não vitrificados, quanto às taxas de maturação e fertilização. Inclusive, foram obtidos nascimentos de crias saudáveis após a transferência desses embriões fertilizados *in vitro* (dela Peña et al., 2002). Em adição, outros trabalhos também têm demonstrado que a vitrificação de tecido ovariano de camundongas apresenta resultados satisfatórios. Chen et al. (2006), ao comparar diferentes técnicas de vitrificação de tecido ovariano (vitrificação convencional e DCV) com a congelação lenta, observaram que a DCV proporcionou maior percentual de folículos morfolologicamente normais que a vitrificação convencional e a congelação lenta. Além disso, a ultraestrutura, viabilidade folicular, taxa de prenhez e número de crias após transplante do tecido ovariano vitrificado por DCV, também se mostraram superiores. Ainda nesta espécie,

após vitrificação de tecido ovariano em grades de microscopia eletrônica, foi observada uma redução na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), antígeno diretamente relacionado com a multiplicação celular, nas primeiras horas de cultivo após a vitrificação. Porém, em 48 h de cultivo, essa expressão foi equivalente ao tecido não vitrificado. Esse resultado revelou que células vitrificadas apresentam um retardo na atividade celular nas primeiras horas após aquecimento. Ademais, foi observado que as células da granulosa são mais sensíveis ao processo de vitrificação, uma vez que um maior número de áreas necróticas foi evidenciado nessas células após o procedimento de vitrificação (Choi et al., 2008).

De forma contrária, a vitrificação convencional de tecido ovariano humano não causou aumento da área necrótica, bem como não divergiu do tecido fresco, quanto à morfologia folicular (Rahimi et al., 2004). Essa técnica mostrou-se satisfatória uma vez que os folículos primordiais apresentaram capacidade de desenvolvimento e os níveis de estradiol e progesterona foram crescentes após três semanas de cultivo *in vitro*, não havendo diferença entre os fragmentos de ovário vitrificado e não vitrificado (Isachenko et al., 2003). Quanto à vitrificação de tecido ovariano por técnicas de vitrificação por grades de microscopia eletrônica (Isachenko et al., 2003) e hemi-palheta (Keros et al., 2009), a análise da morfologia folicular e qualidade do estroma não diferiram entre aquelas observadas no tecido fresco e vitrificado. A análise ultra-estrutural do tecido vitrificado revelou, ainda, mitocôndrias estruturadas e organizadas, células da granulosa preservadas, membrana basal uniforme, núcleo intacto e eucromatina homogênea (Keros et al., 2009). Porém, foi evidenciado um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio no tecido ovariano humano vitrificado, o que pode levar a uma redução da qualidade do tecido, assim como aumento de apoptose (Rahimi et al., 2003). Segundo Isachenko et al. (2003), essa redução na qualidade do tecido foi observada quando o tecido ovariano de mulheres previamente vitrificado por grades de microscopia eletrônica foi submetido ao cultivo *in vitro*, no qual foi perceptível uma destruição do estroma.

Em ovelhas, a vitrificação convencional de fragmentos ovarianos mostrou resultados satisfatórios, inclusive com o nascimento de crias saudáveis após transplante (Bordes et al., 2005; Lornage et al., 2006). Entretanto, a análise histológica revelou um menor número de folículos primordiais normais e uma maior quantidade de anormalidades nucleares e citoplasmáticas quando comparada aos fragmentos frescos (Lornage et al., 2006). Também foi relatada uma redução (15-20%) na taxa de maturação *in vitro* de oócitos obtidos a partir de tecido ovariano vitrificado por superfície sólida (Al-Aghbari e Menino, 2002).

Nos caprinos, a vitrificação em superfície sólida resultou em um percentual de 82% de folículos morfologicamente normais e viabilidade, após o cultivo *in vitro*, semelhante ao percentual observado em folículos oriundos de fragmentos não vitrificados (Santos et al., 2007). Contraditoriamente, em cães a vitrificação foi relacionada a danos na estrutura folicular e redução no número de folículos primordiais e primários, quando a vitrificação convencional foi aplicada (Ishijima et al., 2006). De maneira similar, o uso de *cryotop* para vitrificação de tecido ovariano suíno, mostrou uma redução no número de folículos, assim como degeneração oocitária. Entretanto, após xenotransplante, o tecido ovariano transplantado mostrou revascularização satisfatória e os folículos desenvolveram-se até estágio antral, porém de maneira mais lenta e com percentual inferior ao tecido não vitrificado (Moniruzzaman et al., 2009).

Tabela 3. Principais resultados obtidos com a vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais.

Técnicas de vitrificação	Espécies/ Animais	Resultados	Referências
Superfície sólida	Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> • Taxa de maturação de 70% Obtenção de crias saudáveis 	AL-AGHBARI e MENINO, 2002
Vitrificação convencional	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> • Nascimento de crias saudáveis após transplante do tecido ovariano 	DELA PEÑA et al., 2002
Vitrificação convencional	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> • Áreas de necrose não diferiram entre o tecido ovariano vitrificado e não vitrificado 	RAHIMI et al., 2004
Criotubos	Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> • Obtenção de nascimentos após transplante do tecido ovariano 	BORDES et al., 2005
Vitrificação convencional e DCV	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> • Morfologia e ultraestrutura folicular melhor preservada pela técnica DCV 	CHEN et al., 2006
Vitrificação convencional	Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> • Percentual de folículos morfologicamente normais semelhante ao tecido ovariano não vitrificado 	SANTOS et al., 2007

Comentários finais

Conforme pode ser evidenciado nesta revisão, a técnica de vitrificação tem sido amplamente utilizada com o intuito de preservar o patrimônio genético de diferentes animais ou mesmo a manutenção da função reprodutiva de mulheres submetidas a tratamentos de câncer. Além de ser uma técnica de baixo custo por não exigir a utilização de equipamentos sofisticados e onerosos, é também prática, de rápida aplicação e tem alcançado resultados

satisfatórios. Diante dessas características, a técnica de vitrificação revela-se como uma alternativa promissora e com grande perspectiva de ter seu emprego em condições de campo. Contudo, os resultados, apesar de promissores, apresentam baixa repetibilidade, provavelmente devido a não padronização de protocolos adequados que garantam a viabilidade celular ou tecidual, requerendo intensos estudos nessa área da criobiologia.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Médico Veterinário e Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (PPGCV-UECE) Rafael Rossetto, pelo apoio técnico e auxílio nas figuras do artigo. Os autores também são gratos ao CNPq pelas bolsas concedidas aos pesquisadores Ana Paula Ribeiro Rodrigues e José Ricardo de Figueiredo.

Referências bibliográficas

- Al-Aghbari AM, Menino JR AR.** Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Anim Reprod Sci*, v.71, p.101-110, 2002.
- Ali J, Shelton JN.** Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil*, v.98, p.459-465, 1993.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, Gardner DK.** A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod*, v.23, p.1976-1982, 2008.
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S, Ledda S.** Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, v.68, p.1138-1149, 2007.
- Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorchony B, Kitiyanant Y, Dinnyes A.** Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.700-708, 2006.
- Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin JF, Salle B.** Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod*, v.20, p.2745-2748, 2005.

Cai XY, Chen GA, Lian Y, Zheng XY, Peng HM. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. *Hum Reprod*, v.20, p.1969-1974, 2005.

Cetin Y, Bastan A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim Reprod Sci*, v.92, p.29-36, 2006.

Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod*, v.21, p.2794-2800, 2006.

Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HS, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod*, v.16, p.2350-2356, 2001.

Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev*, v.50, p.685-696, 2004.

Choi JY, Lee BE, Lee EY, Yoon BK, Bae DS, Choi DS. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. *Cryobiology*, v.56, p.36-42, 2008.

Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril*, v.91, p.2399-2407, 2009.

Dela Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC, Nagano M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*, v.123, p.593-600, 2002.

Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1295-1303, 2000.

Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodríguez A, Fernández L, De La Varga S, Fernández A, Facal N, Carbajo M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, v.64, p.317-333, 2005.

Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod*, v.62, p.564-570, 2000.

El-Gayar M, Holtz W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J Anim Sci*, v.79, p.2436-2438, 2001.

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*, v.67, p.238-248, 2007.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Case report: successful pregnancy after vitrification of a human blastocyst that had completely escaped from the zona pellucida on day 6. *Hum Reprod*, v.19, p.988-990, 2004.

Huang CC, Lee TH, Chen SU, Chen HH, Cheng TC, Liu CH, Yang YS, Lee MS. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod*, v.20, p.122-128, 2005.

Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod*, v.108, p.186-193, 2003.

Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Dessole S, Nawroth F, Van Der Ven H. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril*, v.85, p.741-747, 2006.

Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, Lee JY, Suwa Y, Miyahara K, Suzuki H. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev*, v.52, p.293-299, 2006.

Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil*, v.89, p.91-97, 1990.

Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.24, p.1-14, 2009.

Kim SH, Ku SY, Sung KC, Kang MJ, Kim SA, Kim HS, Oh SK, Jee BC, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. *Yonsei Med J*, v.47, p.339-404, 2006.

Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology*, v.36, p.20-31, 1998.

Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril*, v.78, p.449-454, 2002.

Kuwayama M, Hamano S, Nagai T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil*, v.96, p.187-193, 1992.

- Kuwayama M.** Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, v.11, p.608-614, 2005.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ.** Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online*, v.34, p.146-150, 2002.
- Liebermann J, Tucker MJ.** Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, v.124, p.483-489, 2002.
- Lornage J, Courbière B, Mazoyer C, Odagescu V, Baudot A, Bordes A, Poirel MT, Franck M, Salle B.** Vitrification du tissu ovarien : cortex et ovaire entier chez la brebis. *Gynecol Obstet Fertil*, v.34, p.746-753, 2006.
- Luna HS, Ferrari I, Rumpf R.** Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.23-28, 2001.
- Luyet BJ, Gehenio PM** (Ed). *Life and Death at Low Temperatures*. Normandy: Biodynamica, 1940.
- Massip A, Van Der Zwalm P, Ectors F.** Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, v.27, p.69-79, 1987.
- Moniruzzaman M, Bao RM, Taketsuru H, Miyano T.** Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, v.72, p.280-288, 2009.
- Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T.** Embryo development and structural analysis of in vitro matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. *Theriogenology*, v.70, p.1536-1543, 2008.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K.** Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod*, v.18, p.384-391, 2003.
- Naik BR, Rao BS, Vagdevi R, Gnanprakash M, Amarnath D, Rao VH.** Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci*, v.86, p.329-338, 2005.
- on embryonic survival. *J Reprod Fertil*, v.103, p.33-39, 1995.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH.** Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Reprod*, v.14, p.2838-2843, 1999.

Pegg DE. Principles of Cryopreservation. *In: Day JG, Stacey GN. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 2.ed. Totowa: Humana Press, 2007. p.39-57.

Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Sauer H, Wartenberg M, Tawadros S, Hescheler J, Mallmann P, Nawroth F. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online*, v.9, p.187-193, 2004.

Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, Isachenko V, Wartenberg M, Hescheler J, Mallmann P, Nawroth F. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.343-349, 2003.

Rall WF, Fahy GM. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Cryobiology*, v.22, p.603, 1985.

Rubinsky B. Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Fail Rev*, v.8, p.277-284, 2003.

Saki G, Dezfuly FG. Vitrification of human oocyte using cryoloop. *IJRM*, v.3, p.19-24, 2005.

Santos RR, Tharasanit T, Van Haefen T, Figueiredo JR, Silva JRV, Van Den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*, v.327, p.167-176, 2007.

Sheehan CB, Lane M, Gardner DK. The cryoloop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod*, v.21, p.2978-2984, 2006.

Shi LY, Jin HF, Kim JG, Kumar BM, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. Ultrastructural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim Reprod Sci*, v.100, p.128-140, 2007.

Somfai T, Dinnyés A, Sage D, Marosán M, Carnwath JW, Ozawa M, Kikuchi K, Niemann H. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*, v.66, p.415-422, 2006.

Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, v.17, p.2963-2966, 2002.

Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology*, v.68, p.107-114, 2007.

Tharasanit T, Colleoni S, Lazzari G, Colenbrander B, Galli C, Stout TAE. Developmental competence of equine oocytes vitrified at different stages of maturation. *Anim Reprod Sci*, v.94, p.291-293, 2006.

Tsang WH, Chow KL. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, v.46, p.550-552, 2009.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (ops) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.53-58, 1998.

Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.377-383, 2007.

Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, v.45, p.91-94, 2002.

Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod*, v.23, p.2256-2265, 2008.

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod*, v.15, p.1802-1803, 2000.

Zhao XM, Fu XW, Hou YP, Yan CL, Suo L, Wang YP, Zhu HB, Dinnyés A, Zhu SE. Effect of vitrification on mitochondrial distribution and membrane potential in mouse two pronuclear (2-PN) embryos. *Mol Reprod Dev*, v.76, p.1-8, 2009.

3. CAPÍTULO II

Avaliação de folículos pré-antrais caprinos vitrificados usando diferentes técnicas e soluções de vitrificação

Evaluation of goat vitrified preantral follicles using different techniques and vitrification solutions

Adeline de Andrade Carvalho¹, Luciana Rocha Faustino², Cleidson Manoel Gomes da Silva², Cláudio Cabral Campello³, José Ricardo de Figueiredo³, Ana Paula Ribeiro Rodrigues³, Amilton Paulo Raposo Costa⁴

¹Mestranda do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí – adelineandrade@gmail.com

² Mestrando(a) do programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará

³ Professor(a) da Universidade Estadual do Ceará

⁴ Professor da Universidade Federal do Piauí

Resumo

O presente estudo foi realizado para fazer uma análise comparativa entre diferentes técnicas e soluções de vitrificação sobre a morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais vitrificados inclusos no tecido ovariano caprino. Para isso, pequenos fragmentos de ovário foram vitrificados em palhetas (1 mm³), macrotubos (9 mm³) ou em superfície sólida (9 mm³) utilizando seis diferentes soluções de vitrificação (SV) compostas por MEM e Etilenoglicol (EG), adicionados ou não de sacarose (Sac) 0,25 ou 0,50 M, com ou sem 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após uma semana, o tecido ovariano foi aquecido e processado para histologia clássica para análise morfológica dos folículos pré-antrais. Para avaliar a viabilidade folicular, fragmentos de ovário foram vitrificados nas três técnicas utilizando apenas uma solução de vitrificação. A análise histológica mostrou uma redução significativa (P<0,05) no percentual de folículos morfolologicamente normais após vitrificação quando comparado ao controle. Por outro lado, entre os fragmentos vitrificados, a adição de 0,25 M sacarose e 10 % SFB (SV4) parece aumentar o percentual de folículos morfolologicamente normais, evidenciado na vitrificação por palhetas. Na análise de viabilidade, realizada somente com SV4 nas três técnicas de vitrificação, não houve diferença entre os folículos frescos (não vitrificados) ou

vitricados com SS. Em conclusão, a vitrificação por SS utilizando solução contendo 0,25 M de SAC e 10% de SFB é a mais adequada para vitrificação de tecido ovariano caprino.

Abstract

The present study was carried out to perform a comparative analysis among different vitrification solutions and techniques on the morphology and viability of preantral follicles vitrified in caprine ovarian tissue. For this, small fragments of ovary were vitrified in straws (1 mm³), makrotubes (9 mm³) or solid surface (9 mm³) using six different vitrification solutions composed by MEM and ethylene glycol, added or not of sucrose 0.25 or 0.50 M, with or without 10% fetal bovine serum (FBS). After one week, ovarian tissue was warming and processed for histology for morphologic evaluation of preantral follicles. To assess the viability follicular, ovarian fragments were vitrified using the three techniques with only one vitrification solution. Histological analysis showed a significant decrease in the percentages of morphologically normal follicles after vitrification when compared to control. However, among the ovarian fragments vitrified the addition of 0.25 M sucrose and 10% FBS it seemed to increase the percentage of morphologically normal follicles, evidenced by vitrification in straws. The viability analysis, performed only with SV4 in the three techniques vitrification, there was no difference between control (not vitrified) or vitrified with SS. In conclusion, the vitrification SS using solution with 0.25 M sucrose and 10% FBS is the most suitable for vitrification goat ovarian tissue.

Introdução

A criopreservação de tecido ovariano (TO) tem sido bastante empregada na medicina humana visando restaurar a função endócrina e reprodutiva de pacientes com câncer submetidas a tratamentos quimio e/ou radioterápicos (Ott, et al., 2009), que são tóxicos para a população folicular presente no ovário mamífero. Na medicina veterinária, a criopreservação de TO pode ser utilizada como uma ferramenta para a preservação de milhares de oócitos contidos nos folículos pré-antrais objetivando salvaguardar o material genético de animais valiosos ou em via de extinção mesmo após sua morte. Usualmente, este procedimento tem sido realizado utilizando a congelação lenta, cujo método necessita de um equipamento sofisticado e de custo bastante elevado. No entanto, a vitrificação também pode ser utilizada com essa finalidade, oferecendo uma excelente alternativa ao uso da congelação lenta (Shaw e Jones, 2003).

A vitrificação foi primeiramente descrita na década de 30 por Luyet, como um método prático, barato e capaz de reduzir os riscos da formação de cristais de gelo (Luyet, 1937). Desde então, uma grande variedade de protocolos tem sido utilizada para a vitrificação do TO. Dentre esses protocolos, têm sido testados diferentes técnicas, bem como diferentes soluções de vitrificação, na tentativa de estabelecer uma técnica ideal. No que se refere às técnicas, destacam-se as palhetas de plástico, bem como uma superfície sólida de um cubo metálico (Dela Peña et al., 2002; Santos et al., 2007), que são usualmente utilizados por serem baratos ou de fácil aquisição.

Com relação à solução de vitrificação, alguns estudos (Courbiere et al., 2005; Santos et al., 2007) também têm sido conduzidos com a finalidade de definir a composição ideal de um meio que ofereça uma ótima capacidade para formar um estado vítreo e consequentemente, evitar ao máximo as injúrias ao TO ocorridas durante o processo de redução radical da temperatura. No entanto, a busca por novas técnicas, que associem praticidade e proteção celular ainda é um grande desafio para os pesquisadores na área da criobiologia

O objetivo deste estudo foi comparar a utilização de uma nova técnica (macrotubo) com palhetas e superfície sólida para a vitrificação do TO caprino. Foi avaliado também o efeito da sacarose e do soro fetal bovino adicionados à solução de vitrificação sobre a morfologia de folículos pré-antrais caprinos presentes no TO vitrificado.

Material e Métodos

Para a realização deste estudo, ovários de cabras adultas (n= 5 pares), saudáveis e sem raça definida foram obtidos em abatedouros locais. Após a colheita, os ovários foram lavados uma vez em álcool 70% e duas vezes em meio essencial mínimo (MEM) com HEPES (Chemical Sigma. CO. St. Louis, ME, USA). Posteriormente, os ovários foram transportados em MEM até o laboratório à temperatura de 20°C, dentro de uma hora e manipulados como descrito a seguir. No laboratório, cada par de ovários foi cortado em pequenos fragmentos, sendo um imediatamente destinado ao controle e os demais divididos em fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm (9 mm³) ou 1x1x1 mm (1 mm³), de acordo com o procedimento de vitrificação utilizado (Fig. 1).

O fragmento (9 mm³) fresco ou não vitrificado (controle) foi imediatamente destinado para a fixação em Carnoy por 12 horas para o processamento histológico. Outros 18 fragmentos foram expostos a diferentes soluções de vitrificação (SV), por cinco minutos, a

20°C e, em seguida, vitrificados por diferentes técnicas: vitrificação em superfície sólida (SS); palhetas de 0,5 mL (PT) ou macrotubos de 2 mL (MT) antes da fixação em Carnoy.

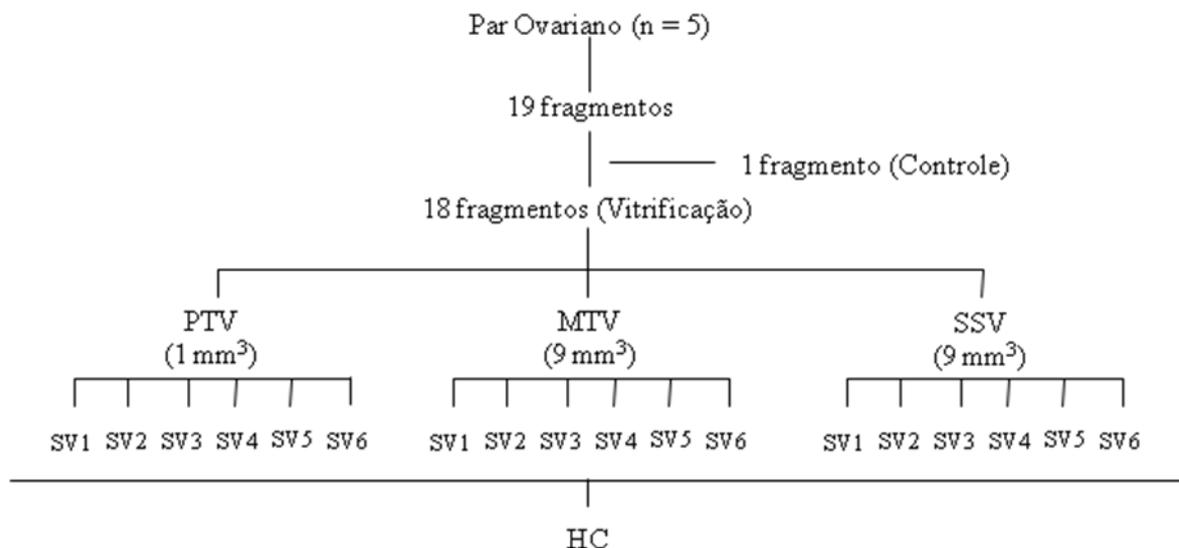


Figura 1. Desenho experimental dos procedimentos de vitrificação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de cabras.

Para verificar o efeito da SV sobre a morfologia folicular foram testadas seis diferentes soluções compostas por MEM e Etilenoglicol (EG 6M), constituindo o meio base (MB), adicionado ou não de 10% de soro fetal bovino (SFB) na presença ou ausência de sacarose (Sac) nas concentrações de 0,25 ou 0,50 M. De acordo com a composição, as soluções foram nomeadas como: **SV1** - MB; **SV2** - MB+SFB; **SV3** - MB+Sac 0,25 M; **SV4** - MB+Sac 0,25 M+SFB; **SV5** - MB+Sac 0,50 M e **SV6** - MB+Sac 0,50 M+SFB. Para a vitrificação em PT, seis fragmentos de 1 mm³ foram colocados em palhetas francesas de 0,5 mL, parcialmente preenchidas com uma coluna de SV (~2 cm) separadas por um espaço com ar (~1 cm) e completadas com a mesma SV. Após cinco minutos de exposição, as PT foram verticalmente imersas em N₂ líquido. Para a vitrificação em MT e SS foram utilizados 12 fragmentos de 9 mm³. No primeiro caso, os fragmentos foram expostos em MT preenchidos com 1,8 mL de SV e, após cinco minutos de exposição foram também verticalmente imersos em N₂ líquido. Para a vitrificação em SS os fragmentos foram primeiramente expostos por cinco minutos em 1,8 mL de SV e então individualmente colocados em um cubo metálico resfriado, parcialmente imerso em N₂ líquido. Os fragmentos vitrificados por SS foram transferidos para criotubos e armazenados em N₂ líquido.

Após a crioestocagem por uma semana, os recipientes (PT, MT e criotubos) contendo os fragmentos foram retirados do nitrogênio, aquecidos à temperatura ambiente por aproximadamente um minuto e imersos em banho-maria a 37°C até obter a SV completamente líquida. O EG foi então removido do TO utilizando três sucessivas lavagens (cinco minutos cada) em MEM suplementado com 10% de SFB (MEM⁺) com concentrações decrescentes de sacarose (0,50; 0,25 e 0 M) e fixado em Carnoy.

Para a análise histológica, o TO fixado foi desidratado, diafanizado, embebido em parafina e seccionado seriadamente a 7 µm. Cada 5ª secção foi montada em lâmina e corada com ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina. Todas as secções, tanto dos controles quanto dos vitrificados, foram examinadas usando microscópio de luz (Nikon, Tóquio, Japão) no aumento de 40x e um total de 30 folículos pré-antrais por réplica foi avaliado. Foram classificados como pré-antrais aqueles folículos que não possuíam antro, isto é, folículos constituídos por um oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso e/ou uma ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Somente folículos pré-antrais com núcleo do oócito visível na secção analisada foram contados. No tocante à qualidade folicular, os folículos pré-antrais foram classificados como morfológicamente normais (folículos contendo oócito e células da granulosa intactos) e degenerados (folículos caracterizados por núcleo de oócito picnótico, retração oocitária e/ou destacamento das células da granulosa da membrana basal).

Com base nos melhores tratamentos (solução de vitrificação que apresentou um percentual de folículos pré-antrais morfológicamente normais significativamente superior às demais associações) resultantes da análise histológica, a viabilidade foi verificada para folículos pré-antrais vitrificados somente na SV4 associada às três técnicas de vitrificação. Para isso, de cada um dos cinco pares de ovário utilizados, um fragmento fresco foi imediatamente submetido ao isolamento folicular (controle), enquanto outros 3 fragmentos foram vitrificados em 6,0 M de EG, 0,25 M de SAC e 10% de SFB (SV4), utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente para as três técnicas de vitrificação (PT, MT ou SS).

Os folículos pré-antrais foram mecanicamente isolados do tecido ovariano fresco ou após vitrificação utilizando o procedimento descrito por Lucci et al. (1999), com algumas modificações. Resumidamente, o córtex ovariano foi cortado em pequenos fragmentos com o auxílio de um Tissue-Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK). Os fragmentos ovarianos foram então mantidos em MEM suplementado com 3 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) à temperatura ambiente (25°C), subsequentemente pipetados 100 vezes usando pipetas Pasteur de 1.600 e 600 µm e, posteriormente, a suspensão

foi filtrada em malha de nylon de 200 μm . A viabilidade de folículos frescos (controle ou não-vitrificado) e vitrificados foi avaliada pela adição de 5 μL de 0,4% de Azul de Trypan (Sigma, St. Louis, MO) a cada 100 μL de solução e incubados por 1 minuto à temperatura ambiente. Posteriormente, os folículos foram examinados usando um microscópio invertido (Nikon, Tóquio, Japão) e classificados como viáveis ou não viáveis quando não corados ou corados com Azul de Trypan, respectivamente. Cento e cinquenta folículos foram analisados por tratamento, totalizando 600 folículos nas cinco repetições em todos os tratamentos testados.

Com relação à análise estatística, os percentuais de folículos morfologicamente normais foram primeiramente submetidos ao teste Kolmogorov–Smirnov e Bartlett para a confirmação da distribuição normal e homogeneidade da variância, respectivamente. A análise de variância foi então realizada utilizando procedimento GLM do SAS (1999) e o teste de Dunnett aplicado para comparar os diferentes tratamentos com o controle. O teste Student-Newman-Keuls (SNK) foi aplicado para comparar os diferentes procedimentos de vitrificação. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram expressos em média \pm DP.

Resultados

Um total de 2.850 folículos pré-antrais (150 folículos/tratamento) foram avaliados histologicamente. As características morfológicas de folículos pré-antrais normais e degenerados observados no TO fresco e vitrificado estão apresentadas na Fig. 2. Oitenta e oito por cento dos folículos pré-antrais apresentavam-se morfologicamente normais no controle (Tab.1). Após o procedimento de vitrificação, foi observado que em todos os tratamentos houve uma redução significativa no percentual de folículos morfologicamente normais quando comparado ao controle.

Tabela 1. Percentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais no tecido ovariano fresco ou não vitrificado (controle) e após vitrificação.

Controle	88,00 ± 5,83		
Grupos	Palhetas (PT)	Macrotubos (MT)	Superfície Sólida (SS)
SV1 (MB)	53.80 ± 7.98 ^{*Ab}	56.60 ± 11.50 ^{*Aa}	62.60 ± 7.92 ^{*Aa}
SV2 (MB+SFB)	47.20 ± 5.45 ^{*Bb}	52.00 ± 9.72 ^{*Ba}	68.80 ± 7.56 ^{*Aa}
SV3 (MB+Sac0,25M)	41.40 ± 10.43 ^{*Bb}	52.00 ± 6.28 ^{*ABa}	62.00 ± 8.00 ^{*Aa}
SV4 (MB+Sac0,25M+SFB)	67.40 ± 7.33 ^{*Aa}	67.40 ± 7.92 ^{*Aa}	72.00 ± 3.08 ^{*Aa}
SV5 (MB+Sac0,50M)	49.00 ± 9.20 ^{*Ab}	53.20 ± 7.19 ^{*Aa}	57.25 ± 12.61 ^{*Aa}
SV6 (MB+Sac0,50M+SFB)	38.25 ± 10.90 ^{*Bb}	52.60 ± 6.58 ^{*Aa}	56.60 ± 5.22 ^{*Aa}

* $P < 0.05$, difere significativamente do córtex ovariano não vitrificado (controle). ^{A,B} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre as técnicas de vitrificação ($P < 0.05$). ^{a,b} Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa entre as soluções de vitrificação ($P < 0.05$)

A comparação entre as diferentes técnicas mostrou que os resultados para PT e MT, foram significativamente inferiores ($P < 0,05$) aos obtidos para SS, utilizando a SV2. Na presença da SV3 ou SV6, a percentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais vitrificados em PT foi significativamente inferior ($P < 0,05$) à SS. Quando as comparações foram realizadas entre as diferentes soluções para uma mesma técnica, não houve diferença significativa para MT ou SS. Entretanto, para PT, a SV4, composta por Sac 0,25M e 10% de SFB, foi significativamente superior às demais soluções testadas (Tab.1). Este resultado mostra que a solução SV4 foi eficaz para viabilizar o processo de vitrificação em todas as técnicas, além de melhorar significativamente a vitrificação em PT em relação a todas as SV testadas.

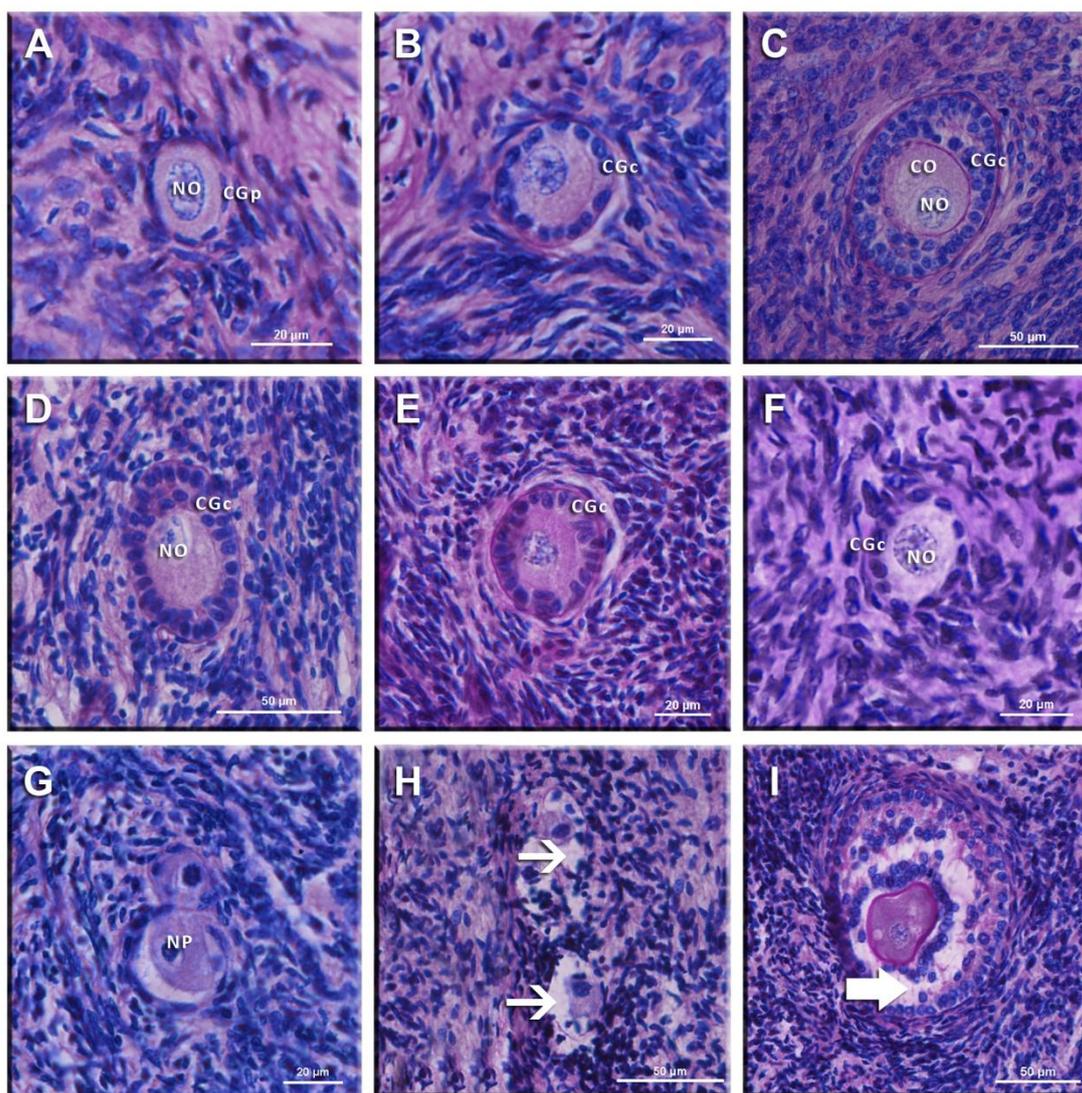


Figura 2. Características morfológicas de folículos pré-antrais antes (A, B e C) e após vitrificação (D a I). Em A, observa-se um folículo normal com uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso. Em B e C, respectivamente, folículos também normais com uma e duas camadas de células da granulosa de formato cúbico. Folículos normais após a vitrificação em PT/SV3 (D); MT/SV5 (E) e SS/SV5 (F). Em G (PT/SV5) verifica-se folículos degenerados apresentando picnose nuclear e uma leve retração citoplasmática. Intensa retração do citoplasma e desorganização das células da granulosa são observadas em H e I (SS/S5). CGp- células da pré-granulosa de formato pavimentoso; CGc- células da granulosa de formato cúbico; CO- citoplasma do oócito; NO- núcleo do oócito, NP- núcleo picnótico, seta fina- retração citoplasmática; seta larga- desorganização das células da granulosa.

Tendo em vista os bons resultados na morfologia folicular empregando-se a SV4 (percentual de folículos pré-antrais morfológicamente normais significativamente superior às

demais soluções), a análise de viabilidade folicular por Azul de Trypan foi realizada utilizando apenas essa solução associada às três técnicas de vitrificação. A Figura 3 ilustra folículos viáveis e não viáveis após procedimento de vitrificação.

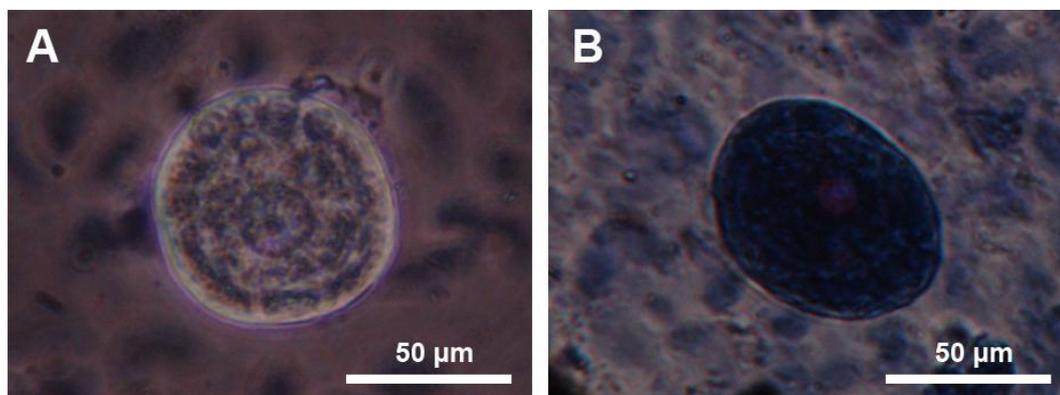


Figura 3. Fotomicrografias de folículos pré-antrais mecanicamente isolados e expostos ao corante vital azul de Tripan. (A) Folículo pré-antral viável (não corado). (B) Folículo pré-antral não viável (corado).

A figura 4 mostra a porcentagem de folículos pré-antrais viáveis analisados por Azul de Trypan no controle e após vitrificação em PT, MT ou SS. A viabilidade folicular foi mantida de forma similar ao controle apenas no tratamento em que a SS foi realizada ($P>0,05$). Nos demais tratamentos (PT e MT), houve uma redução significativa na porcentagem de folículos pré-antrais viáveis em relação ao controle e vitrificação por SS ($P<0,05$), no qual a vitrificação em palhetas apresentou, ainda, porcentagens significativamente menores de folículos pré-antrais viáveis quando comparada à vitrificação em macrotubos ($P<0,05$).

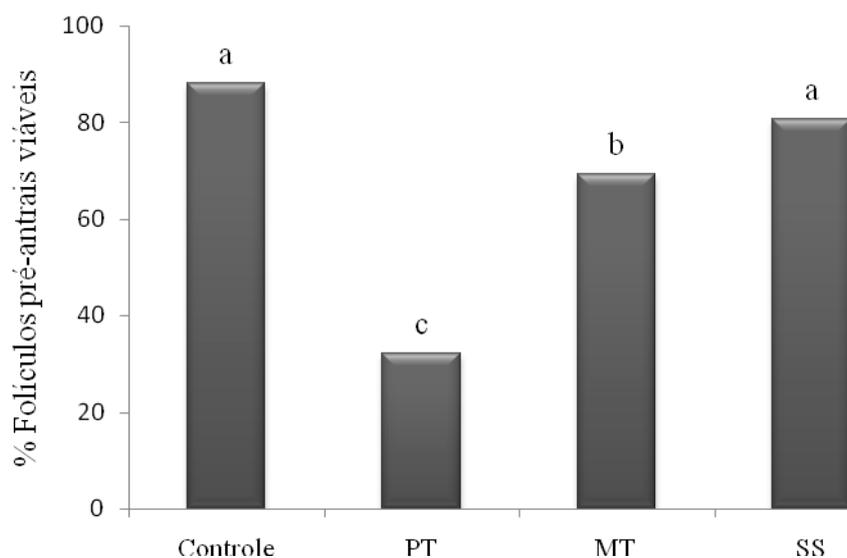


Figura 4. Análise de viabilidade folicular por azul de Tripán em folículos pré-antrais viáveis no controle ou vitrificados por PT, MT ou SS.

^{a, b} Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Discussão

As técnicas de criopreservação que utilizam taxas de resfriamento rápido, como é o caso da vitrificação, têm sido uma excelente alternativa para minimizar as crioinjúrias causadas pela técnica de resfriamento lento (Shaw e Jones, 2003). No entanto, apesar de grandes avanços já terem sido relatados, inclusive o nascimento de indivíduos saudáveis após vitrificação e cultivo *in vitro* ou transplante de TO (camundonga: Dela Peña et al., 2002; ovelha: Bordes et al., 2005), essa técnica ainda apresenta um caráter experimental por algumas razões. Primeiro, a dificuldade em preservar simultaneamente os diferentes tipos celulares (oócito, células da granulosa e da teca e células do estroma) que compõem o ovário (Hreinsson et al., 2003; Segino et al., 2005), os quais possuem diferentes requerimentos em função das divergências entre morfologia e função (Marsella et al., 2007). Segundo, a alta densidade celular (Moniruzzaman et al., 2009) e folicular do TO, a qual varia enormemente com a espécie, raça, estágio fisiológico (Baird, 1984) e outros fatores.

No presente estudo foram testadas três diferentes técnicas (PT, MT ou SS) e seis diferentes soluções de vitrificação (MEM e EG adicionado ou não de SAC nas concentrações de 0,25 ou 0,50 M na presença ou ausência de 10% de SFB). Os resultados mostraram uma redução significativa ($P < 0,05$) no percentual de folículos morfologicamente normais vitrificados em todos os tratamentos quando comparados ao TO fresco ou não vitrificado

(controle). Resultados similares também foram observados por outros autores para a vitrificação de TO humano (Gandolfi et al., 2006) e suíno (Moniruzzaman et al., 2009). Apesar de a vitrificação oferecer riscos menores com relação à formação de cristais de gelo, outros fatores como a alta concentração de agente crioprotetor utilizada, bem como os danos osmóticos ocorridos durante o procedimento podem ter levado aos danos observados no tecido ovariano vitrificado.

A comparação entre as diferentes técnicas testadas mostrou que a SS foi melhor que as demais quando foi utilizada a solução SV2, enquanto a vitrificação em PT resultou em menor percentual de folículos morfológicamente normais com as soluções SV3 e SV6, comparada à SS. Ainda com a PT, foi perceptível a maior proteção celular quando usada a solução SV4 em relação ao uso das demais soluções. Isso pode ser explicado pelo fato da combinação das concentrações de SFB e sacarose que compõem a SV4 ter sido a mais adequada para permitir o transporte (influxo e efluxo) de EG e água através da membrana celular nos fragmentos de 1 mm³. A maior relação entre a área do fragmento e o volume da solução verificada na PT pode ter tornado mais evidente as sutis diferenças entre as soluções estudadas quando realizada a vitrificação por esta técnica.

Os dados deste estudo mostraram que a SV4 possibilitou a vitrificação em quaisquer técnicas e melhorou o resultado da vitrificação em PT quando comparada às demais SV utilizadas. Esta solução foi constituída por MB acrescido por 0,25 M de Sac e 10% de SFB. A sacarose atua como um crioprotetor extracelular que auxilia na desidratação celular e (Huang et al., 2008) preserva a integridade tanto estrutural quanto funcional de membranas celulares (Huang et al., 2008; Zhang et al., 2009) por promover estabilização da membrana através de interação indireta dos grupos OH de sacarose com os grupos polares da bicamada lipídica (Danso e Ford-Lloyd, 2004). Os açúcares não apresentam toxicidade às células (Younis et al., 2009) e os danos ocasionados por suas altas concentrações são devidos à excessiva desidratação celular (Danso e Ford-Lloyd, 2004). Neste estudo, a concentração de 0,5 M de sacarose refletiu em um aumento no número de folículos com a presença de retração citoplasmática (Fig 2H). Uma excessiva desidratação celular também foi observada por Huang et al. (2008) que observaram redução na taxa de maturação de oócitos suínos quando utilizadas concentrações de sacarose superiores a 0,5 M.

Já o SFB altera a permeabilidade das membranas fisiológicas (Marco-Jiménez et al., 2006) e é uma fonte de albumina, que equilibra a pressão osmótica (Picton et al., 2008). Além disso, contém também vitaminas, lipídios, carboidratos e proteínas (Wang et al., 1997) que funcionam como um suplemento nutricional para a célula que está retomando sua atividade

metabólica, evitando um déficit nutricional no momento crítico de reestruturação celular e auxiliando no restabelecimento do contato célula-célula (Paynter et al., 1999). O SFB também é capaz de anular moléculas e íons que podem atuar como fontes de espécies reativas ao oxigênio (Picton et al., 2008).

Embora a análise histológica não tenha sido capaz de indicar a melhor associação (uma única técnica com uma única solução para a vitrificação do tecido ovariano caprino) a viabilidade folicular determinada pelo corante vital Azul de Trypan, mostrou uma maior precisão na escolha do protocolo mais apropriado, uma vez que permite detectar possíveis danos à membrana basal dos folículos pré-antrais criopreservados por penetrar somente em células que possuam ruptura de membrana e tem sido utilizado com sucesso na análise de folículos pré-antrais (camundongos: Carrol e Gosden., 1993; caprinos: Santos et al., 2007; humanos: Fauque et al., 2007; caninos: Lopes et al., 2009). Esse método mostrou que o percentual de folículos pré-antrais viáveis após vitrificação em SS usando a solução SV4 foi similar ao controle, sugerindo que a SS associada à SV4 conferiu maior proteção às membranas celulares durante o processo de vitrificação, comparado à PT e MT. Em conclusão, nas condições utilizadas neste estudo, foi possível determinar uma melhor solução (MEM + 6,0 M EG + 0,25 M SAC + 10% SFB) e técnica (SS) de vitrificação para o tecido ovariano caprino. No entanto, mais estudos são necessários para definir um protocolo de vitrificação que assegure a morfologia folicular similares às observadas antes da criopreservação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao LAMOFOPA, por possibilitar a execução deste trabalho, assim como ao CNPq e FUNCAP pelo financiamento recebido. Agradecimentos sinceros também ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado (Adeline de Andrade Carvalho), bem como dos pesquisadores Ana Paula Ribeiro Rodrigues e José Ricardo de Figueiredo. Os autores também são gratos ao Médico Veterinário e Doutorando do PPGCV-UECE, Rafael Rossetto, pelo auxílio nas imagens do artigo.

Referências Bibliográficas

BAIRD, D.T. The ovary. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. (Ed). *Reproduction in mammals*. Cambridge: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1984, p. 91-114.

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

CARROLL, J.; GOSDEN, R.G. Transplantation of frozen—thawed mouse primordial follicles. *Hum. Reprod.*, v.8, p.1163-1167, 1993.

CHEN, S.U.; CHIEN, C.L.; WU, M.Y.; CHEN, T.H.; LAI, S.M.; LIN, C.W.; YANG, Y.S. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum. Reprod.*, v.21, p.2794-2800, 2006.

COURBIERE,B.; MASSARDIER,J.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil. Steril.*, v.84, p.1065-1071, 2005.

DANSO, K.E.; FORD-LLOYD, B.V. Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. *Plant. Cell. Rep.*, v.22, p.623-631, 2004.

DELA PEÑA, E.C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; ATABAY, E.C.; NAGANO, M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*, v.123, p.593-600, 2002.

FAUQUE, P.; AMOR, A.B.; JOANNE, C.; AGNANI, G.; BRESSON, J.L.; ROUX, C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertil. Steril.*, v.87, p.1200-1207, 2007.

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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.143-152, 2007.

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

HREINSSON, J.; ZHANG, P.; SWAHN, M.L.; HULTENBY, K.; HOVATTA, O. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Hum. Reprod.*; v.18,p. 2420-2428, 2003.

HUANG, J.; LI, Q.; ZHAO, R.; LI, W.; HAN, Z.; CHEN, X.; XIAO, B.; WU, S.; JIANG, Z.; HU, J.; LIU, L. Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.106, p.25-35, 2008.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; RAHIMI, G.; NAWROTH, F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod.*, v.108, p.186-193, 2003.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online*, v.18, p.568-577, 2009.

LOPES, C.A.P.; SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; MELO, M.A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BAÓ, S.N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Anim. Reprod. Sci.*, v.115, p. 201-214, 2009.

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

LUYET, B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica*, v.1, p.1-14, 1937.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; GARZÓN, D.L.; PEÑARANDA, D.S.; PÉREZ, L.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; JOVER, M.; ASTURIANO, J.F. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology*, v.53, p.51-57, 2006.

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

MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R.M.; TAKETSURU, H.; MIYANO, T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, v.72, p.280-288, 2009.

OTT, J.; NOURI, K.; STÖGBAUER, L.; FISCHER, E.M.; LIPOVAC, M.; PROMBERGER, R.; HUBER, J.C.; MAYERHOFER, K. Ovarian tissue cryopreservation for non-malignant indications. *Arch. Gynecol. Obstet.*, v.279, p.1224-1228, 2009.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v.136, p.703-715, 2008.

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

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

SHAW, J.M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update*, v.9, p.583-605, 2003.

VARGHESE, A.C.; DU PLESSIS, S.S.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.6, p.1-10, 2008.

WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G.R.; BUNCH, T.D. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M 199 media. *Anim. Reprod. Sci.*, v.48, p.37-45, 1997.

YOUNIS, A.; CARNOVALE, D.; BUTLER, W., EROGLU, A. Application of intra- and extracellular sugars and dimethylsulfoxide to human oocyte cryopreservation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.26, p.341–345, 2009.

ZHANG, J.M.; LI, L.X.; LIU, X.L.; YANG, Y.X.; WAN, X.P. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.26, p.137–142, 2009.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vitrificação é uma técnica rápida, de baixo custo, que minimiza os danos por formação de cristais de gelo intracelulares e tem sido empregada com sucesso para criopreservar embriões, e oócitos oriundos tanto de folículos antrais como de folículos pré-antrais.

A técnica de vitrificação por superfície sólida associada à solução de vitrificação composta por MEM, 6M de EG, 0,25 M de sacarose e 10% de SFB (SV4), apesar de reduzir o percentual de folículos pré-antrais morfolologicamente normais, foi capaz de manter a viabilidade folicular após vitrificação.

5. REFERÊNCIAS

Acker JP, McGann LE. Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology*, v.46, p.197–202, 2003.

Al-Aghbari AM, Menino, JrAR. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*, v.71, p.101-110, 2002.

Arav A, Shehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, v.99, p.353-358, 1993.

Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin JF, Salle B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified–warmed hemi-ovaries into ewes. *Human Reproduction*, v.20, p.2745–2748, 2005.

Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Martins FS, Matos MHT, Melo MAP, Báo SN, Rodrigues APR, Silva JRV, Figueiredo JR. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*, v.108, p.309–318, 2008.

Cetin Y, Bastan A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Animal Reproduction Science*, v.92, p.29-36, 2006.

Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Human Reproduction*, v.15, p.2598-2603, 2000.

Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled (OPS) and grids. *Human Reproduction*, v.16, p.2350-2356, 2001.

Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Human Reproduction*, v.21, p.2794–2800, 2006.

Choi JY, Lee BO, Lee EY, Yoon BK, Bae DS, Choi DS. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. *Cryobiology*, v.56, p.36–42, 2008.

Dela Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC, Nagano M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*, v.123, p.593–600, 2002.

Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonckt A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v.364, p.1405-1410, 2004.

Du Y, Pribenszky CS, Molnár M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, Pedersen AM, Villemoes K, Bolund L, Vajta G. High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, v.135, p.13–17, 2008.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews*, v.30, p.624–712, 2009.

Eimani H, Mamzaji SS, Soleimani MM, Abnosi MH, Valojerdi MR, Yazdi PE, Shahverdi A, Guorabi H. Survival rate of preantral follicles derived from vitrified neonate mouse ovarian tissue by cryotop and conventional methods. *BioFactors*, v.31, p.117–126, 2007.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, v.73, p.1907–1916, 2005.

Grout BWW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology*, v.71, p.1079–1082, 2009.

Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Kreienberg R, Woriedh M, Bader M, Weiss JM. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction*, v.138, p.319–327, 2009.

Hemadi M, Abolhassani F, Akbari M, Sobhani A, Pasbakhsh P, Ährlund-Richter L, Modaresi MH, Salehnia M. Melatonin promotes the cumulus–oocyte complexes quality of vitrified–thawed murine ovaries; with increased mean number of follicles survival and ovary size following heterotopic transplantation. *European Journal of Pharmacology*, v.618, p.84–90, 2009.

Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, Vajta G, Silber S, Manabe N, Kato O. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice. *Reproductive BioMedicine Online*, v.14, p.693–699, 2007.

Kagawa N, Silber S, Kuwayama M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, v.18, p.568–577, 2009.

Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*, v.59, p.349–363, 1997.

Kartha KK. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA KK (Ed.). *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. p.115–134.

Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.89, p.91–97, 1990.

Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v.24, p.1–14, 2009.

Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology*, v.138, p.482–491, 1998.

Kim SH, Ku SY, Sung KC, Kang MJ, Kim SA, Kim HS, Oh SK, Jee BC, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. *Yonsei medical journal*, v.47, p.339-404, 2006.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online*, v.11, p.608–614, 2005.

Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, v.124, p.483–489, 2002.

Lin TC, Yen JM, Kuo TC, Gong KB, Hsu KH, Hsu TT. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnology*, v.8, p.1-13, 2008.

Magoffin D, Kumar A, Yildiz B, Azziz R. Endocrinology of the Ovary. In: MELMED S, CONN PM. *Endocrinology: Basic and Clinical Principle*, 2.ed. Totowa: Humana Press, 2005. p.391-403.

Maltaris T, Beckmann MW, Dittrich R. Fertility Preservation for Young Female Cancer Patients. *In Vivo*, v.23, p.123-130, 2009.

MCGee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*, v.21, p.200–214, 2008.

Moniruzzaman M, Bao RM, Taketsuru H, Miyano T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, v.72, p.280-288, 2009.

Paris MCJ, Andersen CY, Shaw JM. Ovarian cryopreservation and grafting: its potential for human reproductive biology and animal conservation. *Animal Reproduction*, v.6, p.96-113, 2009.

Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Sauer H, Wartenberg M, Tawadros S, Hescheler J, Mallmann P, Nawroth F. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reproductive BioMedicine Online*, v.9, p.187-193, 2004.

Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In: NEILL JD. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3.ed. Birmingham: Elsevier Academic Press, 2006. p.383-423.

Rubinsky B. Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Failure Reviews*, v.8, p.277-284, 2003.

Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JRV, Van den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*, v.327, p.167–176, 2007.

Santos RR, Celestino JJH, Lopes CAP, Melo MAP, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, p.9-15, 2008.

Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.

Simões ZLP, Bitondi MMG, Hartfelder K. Caderno de práticas de embriologia e morfogênese. Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: <http://rge.fmrp.usp.br/cursos/zm/>. Acessado em 24 nov 2009.

Stouffer RL. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. In: NEILL JD. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3.ed. Birmingham: Elsevier Academic Press, 2006. p.475-526.

Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology*, v.68, p.107-114, 2007.

Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, v.3, p.5-12, 2002.

Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*, v.1, p.162–172, 1996.

Tsang WH, Chow KL. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, v.46, p.550-552, 2009.

Varghese AC, Du Plessis SS, Falcone T, Agarwal A. Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. *Reproductive biology and endocrinology*, v.6, p.1-10, 2008.

Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li SW. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction*, v.23, p.2256-2265, 2008.

Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 2009; doi:10.1016/j.cryobiol.2009.05.007. Artigo *In Press*.

Yamaki SB, Pedrosa AG, Atvars TDZ. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físicoquímica). *Química Nova* v.25, p.330-334, 2002.

Zhang JM, Li LX, Liu XL, Yang YX, Wan XP. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v.26, p.137-142, 2009.

Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia YX, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*, 2009; doi:10.1016/j.cryobiol.2009.02.006. Artigo *In Press*.

Zillgitt P. Zoology 234 / Human Anatomy. University of Wisconsin. Disponível em: <<http://www.waukesha.uwc.edu/lib/reserves/zoo234diagrams.html>>. Acessado em: 26 nov 2009.