

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS  
DOMÉSTICAS: O TAMANHO DO FRAGMENTO INFLUENCIA  
A VIABILIDADE PÓS DESCONGELAÇÃO?**

**Camila Mario Gorricho  
Médica Veterinária**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS  
DOMÉSTICAS: O TAMANHO DO FRAGMENTO INFLUENCIA  
A VIABILIDADE PÓS DESCONGELAÇÃO?**

**Camila Mario Gorricho**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo**

**Coorientadora: Profa. Dra. Maricy Apparicio Ferreira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

**2018**

G637v Gorricho, Camila Mario  
Vitrificação de tecido ovariano de gatas domésticas: O tamanho do fragmento influencia a viabilidade pós descongelação? / Camila Mario Gorricho. -- Jaboticabal, 2018  
x, 47 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018  
Orientador: Gilson Hélio Toniollo  
Coorientadora: Maricy Apparicio Ferreira  
Banca examinadora: Elzylene Léga, Georgia Modé Magalhães  
Bibliografia

1. Criopreservação. 2. Felinos. 3. Histologia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:591.465.3:636.8


**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

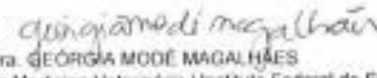
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS: O TAMANHO DO FRAGMENTO INFLUENCIA A VIABILIDADE PÓS DESCONGELAÇÃO?

**AUTORA:** CAMILA MÁRIO GORRICHIO  
**ORIENTADOR:** GILSON HELIO TONIOLLO  
**COORIENTADORA:** MARICY APPARÍCIO FERREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dra. ELZYLENE LÉGA  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FAFRAM / Ituverava/SP

  
Profa. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES  
Curso de Medicina Veterinária / Instituto Federal do Sul de Minas / Muzambinho/MG

Jaboticabal, 27 de abril de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Camila Mario Gorricho, nasceu em Ituverava-SP, em três de abril de 1992. Coursou a graduação em Medicina Veterinária na Faculdade Doutor Francisco Maeda, de fevereiro de 2010 a novembro de 2014. Realizou aprimoramento em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais no Hospital Veterinário da Faculdade Doutor Francisco Maeda, de fevereiro de 2015 a fevereiro de 2016. Desde então, atua com o atendimento exclusivo de pequenos animais. Em março de 2016 iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV – UNESP, Jaboticabal-SP. Atualmente é assessora da Secretaria Municipal do Meio Ambiente e Recursos Hídricos, responsável pela Coordenadoria do Bem Estar Animal da Prefeitura Municipal de Ituverava.

## EPÍGRAFE

### Um aprendiz

Sendo eu, um aprendiz  
A vida já me ensinou que besta  
É quem vive triste  
Lembrando o que faltou

Magoando a cicatriz  
E esquece de ser feliz  
Por tudo que conquistou

Afinal, nem toda lágrima é dor  
Nem toda graça é sorriso  
Nem toda curva da vida  
Tem uma placa de aviso  
E nem sempre o que você perde  
É de fato um prejuízo

O meu ou o seu caminho  
Não são muito diferentes  
Tem espinho, pedra, buraco  
Pra mode atrasar a gente

Mas não desanime por nada  
Pois até uma topada  
Empurra você para frente

Tantas vezes parece que é o fim  
Mas no fundo, é só um recomeço  
Afinal, pra poder se levantar  
É preciso sofrer algum tropeço  
É a vida insistindo em nos cobrar  
Uma conta difícil de pagar  
Quase sempre, por ter um alto preço

Acredite no poder da palavra desistir  
Tire o D, coloque o R  
Que você tem Resistir

Uma pequena mudança  
Às vezes traz esperança  
E faz a gente seguir

Continue sendo forte  
Tenha fé no Criador  
Fé também em você mesmo  
Não tenha medo da dor

Siga em frente a caminhada  
Saiba que a cruz mais pesada  
O filho de DEUS carregou.

*Bráulio Bessa*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me deu sabedoria, discernimento e paciência para chegar até aqui.

Aos meus pais, Maria Cecília e Sylvio, meus irmãos, Johnatan e Silviane, e aos demais familiares que com todo amor me apoiaram e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos.

Ao meu namorado, Jeovane, pelo amor, companheirismo e paciência, durante todos os anos de convívio e, principalmente, nesse período de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV – UNESP, Jaboticabal/SP.

Ao meu orientador, Gilson, e a minha coorientadora, Maricy, que me auxiliaram imensamente em todas as etapas e me conduziram com calma, sabedoria e, sobretudo, carinho nos momentos mais difíceis.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, que contribuíram a esse processo.

A toda equipe de funcionários e médicos veterinários dos setores de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e, também, do Centro de Esterilização de Caninos e Felinos da Unesp, Jaboticabal-SP.

Ao técnico José Luiz de Souza da Universidade de Franca (UNIFRAN), pela confecção das lâminas e a professora Aline Gomes, pela amizade e prontidão em me auxiliar a realizar a análise histológica.

Ao setor de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu/SP. Especialmente ao Carlos Eduardo, que me recebeu de braços abertos e contribuiu substancialmente para a realização da análise imunohistoquímica.

Ao Cleber Mansano, que sem quaisquer ônus se prontificou a colaborar na realização da análise estatística.

As minhas amigas, Beatrice Macente e Mariana Tavares, que com amor e companheirismo me auxiliaram durante o experimento.

Ao diretor da Faculdade Dr. Francisco Maeda, Márcio Pereira, e a coordenadora do curso de Medicina Veterinária e supervisora do estágio de docência, Elzylene Léga, pela oportunidade e aprendizado que me permitiram adquirir.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais</b> .....	01
<b>1.1 Introdução</b> .....	01
1.1.1 Objetivos .....	02
<b>1.2 Revisão da literatura</b> .....	03
1.2.1 Crioprotetores .....	06
1.2.2 Técnicas de criopreservação .....	07
1.2.3 Preservação de tecido ovariano .....	08
1.2.4 Avaliação do tecido ovariano .....	10
1.2.4.1 Apoptose .....	11
<b>1.3 REFERÊNCIAS</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 2 - Vitrification of cat ovarian tissue: does fragment size matters?</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 3 – Considerações finais</b> .....	47



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Vitrificação de tecido ovariano de gatas domésticas", protocolo nº 1673/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniello, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de março de 2017.

Vigência do Projeto	02/03/2017 a 01/03/2018
Espécie / Linhagem	Gato / SRD
Nº de animais	20
Peso / Idade	2,8 – 5,4 Kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do HV <sup>0</sup> GLN <sup>0</sup> – FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal e clínicas particulares.

Jaboticabal, 02 de março de 2017.

  
Prof. Dr. Lizandra Amoroso  
Coordenadora – CEUA

## VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS: O TAMANHO DO FRAGMENTO INFLUENCIA A VIABILIDADE PÓS DESCONGELAÇÃO?

**RESUMO** – A criopreservação de ovário ou tecido ovariano permite a preservação do material genético de qualquer espécie animal que seja submetido à gonadectomia por indicação preventiva, terapêutica ou, até mesmo, por morte inesperada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o tamanho do fragmento ovariano influencia ou não a resistência aos crioprotetores. Para tanto, os ovários foram colhidos de 34 gatas domésticas (várias raças, 1-5 anos de idade) por ovariectomia de rotina, transportados ao laboratório e depois seccionados em fragmentos de diferentes tamanhos (3 x 3 x 3mm, 5 x 3 x 3mm e 7 x 3 x 3mm) e destinados aleatoriamente aos grupos de controle (GC3, GC5 e GC7, respectivamente) ou vitrificados (GV3, GV5 e GV7, respectivamente). Os fragmentos vitrificados-aquecidos foram avaliados por histomorfologia e imunohistoquímica (para taxas de apoptose utilizando a caspase-3 clivada). A avaliação histológica demonstrou que 72,97% dos folículos presentes em GV3 e 72,58% nos fragmentos do grupo GV5 eram normais, enquanto que nos fragmentos do GV7 essa taxa foi de apenas 42,86%. A principal alteração morfológica foi o desprendimento das células epiteliais da membrana basal presentes em todos os grupos. Da mesma forma, a avaliação imunohistoquímica, utilizando a caspase 3, revelou uma pequena proporção de células apoptóticas nos fragmentos do grupo GV3 (53%), enquanto que no grupo GV7, 43,58% das células expressaram a caspase 3 clivada. Esses achados indicam que fragmentos seccionados em 3 x 3 x 3mm (27mm<sup>3</sup>) são mais adequados para a perfusão do crioprotetor, sem causar danos celular após o descongelamento.

**Palavras-chave:** criopreservação, felinos, histologia, imunohistoquímica, ovário.

## VITRIFICATION OF DOMESTIC CAT OVARIAN TISSUE: DOES FRAGMENT SIZE INFLUENCE THE POST THAW VIABILITY?

**ABSTRACT** – Cryopreservation of ovary or ovarian tissue allows preservation of genetic material of any animal species that is submitted to gonadectomy for preventive, therapeutic or even by unexpected death. The aim of the present study was to investigate whether or not the size of the ovarian fragment influence its resistance to cryostorage. For that purpose, ovaries were collected from 34 queens (various breeds, age 1-5 y) by routine ovariectomy, transported to the laboratory and then sectioned in different sizes (3 x 3 x 3 mm, 5 x 3 x 3 mm and 7 x 3 x 3 mm) and randomly assigned to a control (GC3, GC5 and GC7, respectively) or vitrified (GV3, GV5 and GV7, respectively) groups. Vitrified-warmed fragments were evaluated by histomorphology and immunohistochemistry (for apoptotic rates by using cleaved caspase-3). Histological examination reveal that 72.97% of the follicles in GV3 and 72.58% in GV5 were normal while only 42.86% of the follicles in GV7. The main morphological alteration presented in all groups was a detachment of the epithelial cells by basement membrane. Similarly, immunohistochemistry evaluation using caspase 3 revealed a small proportion of apoptotic cells in GV3 (53%) while in GV7 43.58% of the cells expressed cleaved caspase-3. These findings indicate that fragments sectioned in 3 x 3 x 3 mm (27mm<sup>3</sup>) seems more adequate for perfusion of the cryoprotectant, causing less damage to the cell after vitrification-warming.

**Keywords:** cryopreservation, felids, histology, immunohistochemistry, ovary.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>DAP 123</b>	Solução de 1M de acetamida, 2M de dimetilsulfóxido e 3M de propileno glicol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EG</b>	Etilenoglicol
<b>FOPA</b>	Folículos ovarianos pré-antrais
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GC3</b>	Grupo controle de fragmentos de 27mm <sup>3</sup> (3 x 3 x 3 mm)
<b>GC5</b>	Grupo controle de fragmentos de 45mm <sup>3</sup> (5 x 3 x 3 mm)
<b>GC7</b>	Grupo controle de fragmentos de 63mm <sup>3</sup> (7 x 3 x 3 mm)
<b>GLI</b>	Glicerol
<b>GV3</b>	Grupo vitrificado de fragmentos de 27mm <sup>3</sup> (3 x 3 x 3 mm)
<b>GV5</b>	Grupo vitrificado de fragmentos de 45mm <sup>3</sup> (5 x 3 x 3 mm)
<b>GV7</b>	Grupo vitrificado de fragmentos de 63mm <sup>3</sup> (7 x 3 x 3 mm)
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>mDPBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco modificada
<b>PB1</b>	Solução de soro fetal bovino, glicose, piruvato de sódio, penicilina e estreptomicina
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada
<b>TCM 199</b>	Meio de cultura de tecidos

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **1.1 Introdução**

Muitas espécies de animais selvagens estão ameaçadas de extinção. De acordo com o “Convention of International Trade of Endangered Species” (CITES, 1973), todas as 37 espécies de felinos selvagens encontram-se nesta lista e, conforme a Portaria nº 444 do Ministério do Meio Ambiente (2014), oito dessas espécies são brasileiras. Essa alarmante realidade é reflexo do avanço das fronteiras naturais e consequente destruição de seus habitats, pela mortalidade decorrente da caça ilegal e também pela redução na variabilidade genética, resultando em queda da fertilidade (WILDT et al., 2010).

As técnicas de reprodução assistida, como a criopreservação de gametas e tecidos gonadais, são alternativas plausíveis para superar problemas de ordem física e/ou comportamentais que impeçam a reprodução natural, bem como a necessidade de transporte dos animais; e também favorece a estocagem, por longos períodos, do germoplasma de animais reprodutivamente incompetentes ou que vieram a óbito inesperadamente (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004; WILDT et al., 2010; ZENG et al., 2006).

Entretanto, a manipulação e obtenção de exemplares de felinos selvagens são grandes obstáculos para o desenvolvimento de pesquisas. Por esta razão, a utilização de gatos domésticos como modelos experimentais é uma excelente opção, pois além de ser mais fácil a obtenção de material biológico (proveniente de campanhas de castração, por exemplo), há crescente interesse de criadores nos avanços da reprodução assistida, decorrente do aumento do mercado pet mundial e, ainda, de maneira ampla, por servir como modelo de estudo para humanos com doenças autoimunes e/ou que tenham passado por radioterapia ou quimioterapia (LUVONI, 2006; PUKAZHENTI et al., 2006).

Neste quesito, a criopreservação de gametas e tecido gonadal trazem amplos benefícios, pois possibilita o armazenamento por tempo indeterminado e o transporte de material genético por longas distâncias. Gametas de diferentes espécies já foram criopreservados com sucesso e quando descongelados, foram utilizados em várias técnicas de reprodução assistida. Comparativamente, gametas felinos são mais vulneráveis aos efeitos das baixas temperaturas (APPARÍCIO et al., 2012), fator que limita sua viabilidade pós-descongelamento

e, conseqüentemente, reflete na inexistência de um protocolo ideal para a espécie.

Apesar do número ainda reduzido, comparado às pesquisas envolvendo congelamento de gametas, os estudos sobre criopreservação de tecidos gonadais ganham destaque no cenário da medicina humana, principalmente na preservação da fertilidade de pacientes com câncer (CAMBIAGHI; CASTELLOTTI, 2008). A medicina veterinária acompanha este desenvolvimento, com o propósito extra de aplicação destas técnicas em programas de melhoramento genético e conservação de espécies ameaçadas de extinção (LUZ et al., 2011).

A criopreservação de tecido ovariano é mais complexa do que de gametas, devido a uma variedade de tipos celulares, os quais apresentam diferentes sensibilidades a danos induzidos pelo frio. Vários estudos, tais como os realizados em felinos, camundongos e humanos, demonstraram que os folículos no tecido ovariano, além de conseguirem sobreviver durante o congelamento e descongelamento, também são capazes de se desenvolver desde um estágio inicial até um estágio mais avançado (BOSCH et al., 2004; GOSDEN et al., 1994; OKTAY et al., 1998).

Neste sentido, esta pesquisa se justifica por ampliar o conhecimento acerca da criopreservação de gametas e tecido gonadal, principalmente na espécie felina, o que poderá contribuir para a preservação dos felinos selvagens da nossa fauna, tais como a onça pintada (*Panthera onca*), considerada o maior felino das Américas e com papel fundamental no ecossistema brasileiro.

### **1.1.1 Objetivos**

#### **Objetivo geral**

Avaliar se o tamanho do fragmento ovariano influencia na viabilidade do tecido pós descongelamento.

#### **Objetivos específicos**

- Avaliar as alterações histomorfológicas dos fragmentos ovarianos vitrificados-aquecidos e compará-los ao tecido fresco nos diferentes grupos experimentais (27, 45 e 63mm<sup>3</sup>).
- Identificar e quantificar as células em apoptose no tecido ovariano vitrificado-aquecido, comparando-a com o tecido fresco por meio da imunohistoquímica (caspase-3 clivada).

## 1.2. Revisão da Literatura

Estudos relacionados à criopreservação de gametas e tecido gonadal de felídeos tem ganhado relevância, tanto devido à necessidade de manutenção genética dentro de populações selvagens ameaçadas, quanto à importância econômica dos animais de companhia na sociedade moderna (HEWITT; ENGLAND, 2002; SONGSASEN; WILDT, 2007). Além disso, essa técnica também é utilizada na medicina humana, principalmente, em casos de mulheres que foram submetidas ao tratamento de quimioterapia ou radioterapia, e também em pacientes que possuem afecções autoimunes (DONNEZ; BASSIL, 1998; OKTAY, 2001).

A criopreservação compõe a terceira geração da biotecnologia. É uma técnica de armazenamento e preservação de materiais biológicos (células isoladas ou mesmo tecidos) a baixas temperaturas, a qual permite que células vivas submetidas à redução significativa de seu metabolismo mantenham-se viáveis e continuem seu desenvolvimento normal, após o descongelamento (DEMIRCI et al., 2002; MAZUR, 1980).

A manutenção da viabilidade celular ou tecidual, após a suspensão de seu metabolismo, depende de algumas variáveis, cruciais no processo de criopreservação, como: tipo e concentração de crioprotetores utilizados; método de criopreservação escolhido; curva de diminuição da temperatura; estocagem; e técnica de remoção dos crioprotetores, durante o descongelamento (FAUSTINO et al., 2011).

Uma abordagem que tem sido feita com o tecido ovariano congelado/descongelado refere-se ao transplante deste órgão de volta para a fêmea doadora (autotransplante) (BOSCH et al., 2004). A criopreservação do

tecido ovariano seguido do transplante em roedores tem sido estudada há mais de 50 anos (PARROT, 1960), no entanto demorou cerca de 30 anos para que os protocolos de congelamento se tornassem mais eficientes e para que o transplante fosse realizado em animais maiores, principalmente nas espécies consideradas aplicáveis aos seres humanos. O primeiro nascimento após o transplante de tecido ovariano foi relatado em primatas não-humanos por Lee et al., 2004.

Alguns trabalhos comprovaram que a fêmea doadora volta a apresentar fertilidade pelo autotransplante, uma vez que os folículos e oócitos podem sobreviver aos procedimentos de congelamento e descongelamento (GOSDEN et al., 1994). Há pouco tempo, a eficácia da técnica foi comprovada em gatas; a implantação ovariana em tecido subcutâneo na região dorsal do pescoço, possibilitou que fragmentos ovarianos retomassem atividade folicular (LEONEL et al., 2014).

Quanto ao isotransplante, a doadora e a receptora são geneticamente iguais e, no alotransplante, ocorre entre indivíduos da mesma espécie. Dessa forma, possuem aplicação, sobretudo, em animais de laboratório, sendo escassos os trabalhos em animais domésticos. Entretanto, em humanos a primeira técnica foi aplicável em um estudo com irmãs gêmeas, em que uma delas apresentava falência ovariana prematura. A maioria mostrou retomada de função endócrina, além de gestações e nascimentos bem sucedidos (SILBER et al., 2008). Enquanto que o alotransplante foi abordado também em irmãs, em que uma delas passou por tratamento quimioterápico e, após 17 anos, recebeu o órgão, decorrendo em nascimento de uma criança (DONNEZ et al., 2011).

Outra possibilidade de transplante é o xenotransplante, o qual ocorre entre espécies diferentes, favorecendo a obtenção de gametas viáveis para a procriação do tecido ovariano congelado, apresentando uma abordagem alternativa para estudos de mecanismos de desenvolvimento folicular (OKTAY et al., 1998). Vários estudos demonstraram que os folículos no tecido ovariano, além de conseguirem sobreviver durante o congelamento e descongelamento, também são capazes de se desenvolver desde um estágio inicial até um estágio mais avançado (BOSCH et al., 2004; GOSDEN et al., 1994; OKTAY et al., 1998). Bosch et al. (2004) encontraram resultados satisfatórios após o congelamento



do córtex ovariano de gatas, seguida de xenotransplante sob cápsula renal de camundongos imunodeficientes utilizando 1,5 M de EG por 25 minutos a 4°C e taxa de resfriamento de -0,3°C/minuto até -40°C, sendo observado também o desenvolvimento de folículos em estádios avançados. Recentemente, Pimentel (2015) avaliou a atividade ovariana bovina transplantada em cápsula renal de camundongos com estimulação hormonal, a qual apresentou resultados positivos, sem prejuízo da função renal dos mesmos.

A combinação de criopreservação e xenotransplante contribuem para a preservação do germoplasma com a propagação do aumento de número de espécies em risco de extinção (BOSCH et al., 2004). O desenvolvimento folicular no tecido ovariano xenotransplantado já foi documentado em fragmentos ovarianos de mulher (OKTAY et al., 1998), vaca (AERTS et al., 2010; BEZERRA, 2010; HERNANDEZ-FONSECA et al., 2001; SEMPLE et al., 2000), ovelha (GOSDEN et al., 1994; HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005), elefanta (GUNASENA et al., 1998), marsupiais (MATTISKE et al., 2002; WOLVEKAMP et al., 2001), gata (BOSCH et al., 2004; GOSDEN et al., 1994), porca (KANEKO et al., 2003, 2006, 2013), sagui (CANDY et al., 1995) e leões (*Panthera leo*) (WIEDEMANN et al., 2012).

A escassez de pesquisas nesta área reflete a complexidade e a eficácia ainda limitada desta técnica. Alternativamente, tem-se estudado o cultivo *in vitro* de folículos pré antrais, o qual representa uma estratégia atraente para avaliar o desenvolvimento folicular e gerar oócitos maduros. Entretanto, esta biotécnica ainda esbarra nos atuais sistemas de cultivo, os quais são ineficazes para reproduzir um crescimento coordenado e a diferenciação dos compartimentos somáticos e germinativos (CECCONI, 2002). Ademais, os resultados são distintos, principalmente no que concerne roedores e outros mamíferos. Portanto, nota-se que a diversidade biológica dos tecidos ovarianos entre as espécies é um dos maiores obstáculos e, para superá-lo, necessita-se do desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie, considerando sua criotolerância e os danos causados ao tecido.

Além da avaliação de retorno da função tecidual e celular através das técnicas de transplantes, a maturação oocitária *in vitro* é de grande valia para a validação de protocolos. Normalmente, o cultivo é feito a partir de

suplementações com hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), estradiol e BSA (WOLFE; WILDT, 1996; WOOD et al., 1995). Com essa aplicação, pode-se observar que a porcentagem de oócitos de gatas domésticas que atingiram a metáfase II subiu de 37% (sem suplementação) para 54% (JOHNSTON et al., 1989). Entretanto, estudos ainda estão sendo feitos para aprimorar as taxas de recuperação oocitária *in vitro*, fator que justifica a importância da técnica de vitrificação de tecido ovariano.

### 1.2.1. Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias atóxicas indispensáveis para que as células possam resistir às injúrias causadas pela drástica queda de temperatura. Os crioprotetores intracelulares, como o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG) e glicerol (GLI), dado o baixo peso molecular que possuem, conseguem adentrar a célula e substituir parcialmente a água presente em seu interior, impedindo a formação de cristais intracelulares que poderiam danificar sua estrutura. Há também a necessidade de crioprotetores extracelulares, como a gema de ovo e o leite em pó, substâncias estas que recobrem a superfície das células e estabilizam suas membranas celulares, protegendo-a dos danos causados pelo congelamento (GONÇALVES et al., 2008). Os metabólitos resultantes da degradação dos crioprotetores pelas células podem ser tóxicos para as mesmas, sendo este outro fator importante a ser considerado no processo de criopreservação (CASTRO et al., 2011).

No período de 1950 iniciou-se o uso dos crioprotetores em tecido ovariano. Os estudos ocorreram em camundongos, utilizando glicerol e obtiveram a sobrevivência de 5% dos folículos (DEANESLY, 1954; PARKES, 1953). Já em 2006, Lima et al. (2006) compararam o uso do mesmo crioprotetor com EG na criopreservação de folículos pré-antrais, a partir de fragmentos de tecido ovariano de gatas domésticas e, constataram a sobrevivência de 26, 39 e 58% para os grupos controle, GLI e EG, respectivamente, constatando melhor ação do EG para folículos provenientes de felinos.

Leonel et al. (2013) realizaram um estudo comparando a eficiência do EG, DMSO e a associação de ambos na preservação de folículos, por meio da criopreservação de tecido ovariano de gatas. Reportaram que o grupo

criopreservado com EG apresentou características indesejáveis, tais como: descolamento do oócito das células da granulosa; citoplasma com granulação, cisternas de retículo endoplasmático dilatadas e vesículas claras; áreas vazias na região perinuclear e alguns folículos com grandes gotas lipídicas. O grupo criopreservado com a associação dos crioprotetores apresentou degeneração com descolamento entre o oócito e as células da granulosa; vesículas e grumos no citoplasma do oócito; ruptura da membrana plasmática; e separação das camadas interna e externa da membrana nuclear. Entretanto, o grupo submetido somente ao DMSO mostrou-se similar ao controle, evidenciando melhor ação crioprotetora nestas estruturas ovarianas.

### **1.2.2. Técnicas de criopreservação**

Basicamente são dois métodos de criopreservação desenvolvidos e classificados de acordo com a taxa de redução da temperatura. No congelamento lento, a queda da temperatura é gradual e as concentrações de crioprotetores utilizadas são baixas, ou seja, antes de serem congeladas, as células passam por um resfriamento prévio (DEL VALLE, 2008). Já na vitrificação, método ultrarrápido de congelamento e de custo relativamente baixo (quando comparado ao convencional), as soluções de crioprotetores são viscosas e mais concentradas e, devido à queda abrupta de temperatura, há a passagem direta do meio de um estado líquido para um estado amorfo, sem a formação de cristais de gelo (GONÇALVES et al., 2008; SANTOS et al., 2007). Contudo, concentrações elevadas de crioprotetores podem ser tóxicos, o que resulta em estresse osmótico e danos celulares subsequentes, razão pela qual a exposição a estes deve ser por curtos períodos (LUCIANO et al., 2009; PARKS, 1997).

Ovários e folículos de diversas espécies já foram submetidos ao processo de criopreservação, dentre elas estão: coelhos, com sobrevivência apenas de folículos primordiais e presença de alterações histológicas reversíveis e irreversíveis (THOMAZ et al., 2005); notoriedade da técnica de transplante de tecido ovariano em mulheres com falência ovariana prematura (LIMA, 2011); cães, nos quais a vitrificação preservou melhor a ultraestrutura dos folículos primordiais e primários, em comparação ao congelamento lento (RÔLO, 2012);

zebrafish, evidenciando que os fragmentos ovarianos apresentaram resultado superior aos da vitrificação utilizando ovários inteiros (MARQUES, 2014); catetos e preás, elucidando os mecanismos relacionados à sobrevivência e desenvolvimento dos folículos pré-antrais *in vitro* (LIMA, 2015); ovelhas, nas quais os folículos secundários se mantiveram viáveis após a vitrificação, com manutenção da integridade da membrana após cultivo *in vitro* (SILVA, 2015).

Independentemente do método aplicado, a criopreservação segue as seguintes etapas: prévia exposição ao(s) agente(s) crioprotetor(es); resfriamento da amostra até que atinja a temperatura criogênica (temperatura muito baixa na qual os gases estão liquefeitos à pressão atmosférica – RUBINSKY, 2003), permitindo a suspensão de todas as reações e processos biológicos; armazenamento e estocagem em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ; descongelamento, reidratação e retomada do metabolismo celular; e remoção do(s) crioprotetor(es) utilizado(s). Por fim, após estes procedimentos, far-se-á necessário verificar se o protocolo utilizado foi adequado, sendo a avaliação morfológica uma das possíveis abordagens (CASTRO et al., 2011).

### **1.2.3. Preservação de tecido ovariano**

Na criopreservação de tecidos gonadais, os gametas são congelados ainda no interior dos tecidos que os originaram. Esta técnica, além de facilitar o manuseio da amostra, permite que o ovário ou apenas os folículos transplantados pós-congelamento retomem facilmente suas atividades (DONNEZ et al., 2006), porém esbarra em impasses como a dificuldade dos crioprotetores em penetrarem no tecido, risco de isquemia ou problemas na revascularização tecidual (NEWTON et al., 1998) e a presença de diferentes tipos celulares, cada qual com sua temperatura ótima de congelamento.

A criopreservação de tecido ovariano ainda é pouco estudada e atualmente tem sido utilizada para a preservação de oócitos em folículos pré antrais com o objetivo de constituição de bancos de germoplasma animal, o qual permite a preservação de espécies (CARRIJO et al., 2009). Em gatas, a maioria dos estudos são focados na criopreservação de oócitos maduros e imaturos (LUVONI; PELLIZARI, 2000; MERLO, 2008), e apenas nos últimos anos a atenção foi voltada para a preservação de tecido ovariano (LEONEL, 2013).

Luvoni et al. (2012) demonstraram pela primeira vez que oócitos congelados *in situ* (dentro do tecido ovariano) com o DAP 123 (PB1 final - soro fetal bovino, glicose, piruvato de sódio, penicilina e estreptomicina -, DMSO, acetamina e propilenoglicol) eram capazes de retomar a meiose *in vitro* após serem descongelados e cultivados. Neste mesmo ano, Alves et al. (2012) reportaram que oócitos congelados *in situ* e *ex situ* possuem criotolerâncias semelhantes, quando congelados com o DAP 123 ou com o método *cryotop*. Recentemente, Rao et al. (2015) demonstraram que oócitos recuperados de ovários de grandes felinos indianos obtidos *post-mortem* e congelados são capazes de maturar até o estágio de metáfase II.

Outros pesquisadores objetivaram analisar a eficiência dos meios TCM 199 (meio de cultura de tecidos) e PBS (solução salina tamponada) na conservação de folículos pré-antrais (FOPA) felinos *in situ*, a 4°C por 24 h. Para isso, utilizaram 10 pares de ovários de *Felis catus*, dos quais a camada cortical foi fracionada e, em seguida, exposta a três tratamentos distintos: controle, fragmentos conservados em TCM 199 e fragmentos conservados em PBS. A partir da avaliação histológica e com base nos resultados obtidos, eles concluíram que é possível a manutenção da integridade morfológica de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) em ovários de gatas utilizando TCM 199, mantidos na temperatura e tempo avaliados. Além disso, folículos primordiais demonstraram possuir maior viabilidade comparado aos em desenvolvimento (MISSIO et al., 2014).

Neste sentido, é descrito na literatura que a criopreservação de folículos ovarianos pode ser realizada de três modos: ovário inteiro, tecido ovariano cortical ou folículos isolados, com a utilização de congelamento lento ou métodos de vitrificação e diferentes resultados em relação a viabilidade folicular (SANTOS et al., 2010). O ovário inteiro retoma a vascularização em maior velocidade, quando parte do pedículo ovariano é transplantado conjuntamente, reduzindo o tempo de isquemia e eliminando a necessidade de neoangiogênese (MARTINEZ-MADRID et al., 2004). Entretanto, a criopreservação do ovário inteiro pode ser prejudicada, devido ao tamanho do órgão e à dificuldade da penetração do agente crioprotetor no interior do tecido, causando danos as células e componentes teciduais (KIM, 2010; MARTINEZ-MADRID et al., 2007).

Já o córtex ovariano possui vários tipos celulares e, com isso, diversa vulnerabilidade aos prejuízos causados pela baixa temperatura. Porém, podem ser observados folículos primordiais em grande quantidade, os quais possuem os oócitos envoltos por uma única camada de células da granulosa, relativa quiescência e não possuem zona pelúcida, fatores ligados diretamente ao baixo impacto causado pelo frio (ALVES et al. 2012). Por último, a criopreservação de folículos isolados exige tempo, treino de técnica e habilidade para separá-los do tecido. Contudo, favorece a observação, qualificação direta e percepção da quantidade dos mesmos (ABIR et al., 1999).

Após a criopreservação, o material colhido pode ser cultivado, para posterior produção de oócitos fertilizáveis, ou transplantados (DEMIRCI et al., 2002; SANTOS et al., 2010).

#### **1.2.4. Avaliação do tecido ovariano**

Na fase de descongelamento, o reaquecimento do material congelado pode ocasionar injúrias celulares por meio do processo de recristalização, ou ainda pelo crescimento dos microcristais de gelo que se formaram durante a congelação, tornando-se macrocristais, os quais levam à ruptura celular (SANTOS, 2000), perdas de folículos e células em apoptose (CANDY, 1995). Portanto, recomenda-se que o processo de descongelamento seja suficientemente rápido para permitir que o gelo extracelular derreta e atravesse a membrana extracelular em estado líquido para a reidratação da célula (FRIEDLER et al., 1988). Ademais, a avaliação tecidual pós descongelamento é imprescindível para validar um protocolo e seus criodanos.

A avaliação histológica concede a apreciação da integridade dos tecidos, vascularização, qualidade folicular e classificação dos folículos e sua morfometria. Entretanto, para observar todos os componentes celulares é preciso submeter o ovário, ou fragmento do mesmo, a coloração de hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Na criopreservação, as principais alterações celulares que devem ser investigadas para determinar a preservação são: lise estromal; distribuição irregular e condensação da cromatina; lise celular; picnose; cariólise; cariorex; degeneração hialina; vacuolização citoplasmática e atrofia tecidual (VASCONCELOS, 2000).

### 1.2.4.1. Apoptose

A apoptose, morte celular programada e livre de resposta inflamatória, decorre de mecanismos gênicos rigidamente controlados e de grande eficiência, impedindo que a célula transfira os danos genéticos às demais (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). O processo necessita de determinadas proteases, conhecidas por caspases, as quais promovem a clivagem de proteínas específicas na célula, tendo como consequência alterações bioquímicas e morfológicas, tais como: dano à membrana nuclear, hipercondensação da cromatina, degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas, formando corpos apoptóticos e resultando em morte celular imediata (ALBERTS et al., 1999; HENGARTNER, 2000; MILLER, 1997).

Ainda, essas proteases são divididas em iniciadoras (8 e 9) e efetoras (3, 6 e 7) que, quando ativadas, eliminam enzimas e proteínas necessárias as células. Isso ocorre devido a formação de um complexo de proteínas que recrutam a pró-caspase-9, a qual recruta e promove a clivagem da caspase-3. Por sua vez, essa cliva os substratos alvo para realizar alterações ligadas a apoptose (HUSSEIN; HAEMEL; WOOD, 2003). Em especial, ativa endonucleases endógenas, que são responsáveis pela fragmentação do DNA (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998).

Além de ser estudada em pacientes com câncer para respostas quimioterápicas (O'DONOVAN et al., 2003) e outras enfermidades, as caspases são as principais moléculas responsáveis pela apoptose, nas vias intrínseca e extrínseca (HUSSEIN, 2005; MONGET et al., 2002). Em especial, a caspase-3 é vista em células da granulosa de folículos saudáveis, enquanto em folículos em atresia há incremento de sua concentração de modo ativo (JOHNSON; BRIDGHAM, 2002), como já foi comprovado em suínos (BERARDINELLI et al., 2002). Também, foi identificada em corpo lúteo, presente em ovário de ratos (SLOT et al., 2006). Desse modo, a imunohistoquímica, utilizando a caspase 3 para avaliação da apoptose, permite avaliar alterações teciduais em etapas anteriores as vistas na histologia convencional. Pois, a imunohistoquímica é caracterizada pela utilização de anticorpos, com capacidade de identificação e ligação, livre de danos, a componentes teciduais, os quais se comportam como antígenos. Essa técnica permite identificar células e tecidos, ou ainda

substâncias presentes nestas por meio de uma coloração específica que faz a ligação do complexo antígeno-anticorpo (POLAK; VAN NOORDEN, 2003). Sua principal aplicação sucede a partir do reconhecimento de componentes (antígeno-anticorpo) e as ações dos mesmos, associados às alterações morfofuncionais (TAYLOR, 2013).



### 1.3. REFERÊNCIAS

ABIR, R.; ROIZMAN, P.; FISCH, B.; NITKE, S.; OKON, E.; ORVIETO, R.; BEN RAFAEL, Z. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 1299-1301, 1999.

AERTS, J.M.; MARTINEZ-MADRID, B.; LEROY, J.L.; VAN AELST, S.; BOLS, P.E. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 2, p. 708-714, 2010.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; Controle do ciclo celular e morte celular. In: \_\_\_\_\_ **Fundamentos da Biologia Celular: Uma Introdução à Biologia Molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 1999, p. 585 – 607.

ALVES, A.E.; KOZEL, A.C.; LUVONI, G.C. Vitrification with DAP 213 and Cryotop of *Ex Situ* and *In Situ* Feline Cumulus–Oocyte Complexes. **Reproduction in domestic Animals**, v. 47, p. 1003-1008, 2012.

APPARÍCIO, M.; FERREIRA, C.R.; TATA, A.; SANTOS, V.G.; ALVES, A.E.; MOSTACHIO, G.Q.; PIRES-BUTLER, E.A.; MOTHEO, T.F.; PADILHA, L.C.; PILAU, E.J.; GOZZO, F.C.; EBERLIN, M.N.; LO TURCO, E.G.; LUVONI, G.C.; VICENTE, W.R.R. Chemical Composition of Lipids Present in Cat and Dog Oocyte by Matrix-Assisted Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS). **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.113 - 117, 2012.

BERARDINELLI, P.; MARTELLI, A.; RUSSO, V.; NARDINOCCHI, D.; TURRIANI, M.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M.; SCAPOLO, P.A.; CLAVENZANI, P.; Correlation between VEGF production and blood vessels density in steroidogenic activated pig antral follicles. **Italian Journal of Anatomy and Embryol**, v.107, n.3, p.115–126, 2002.

BEZERRA, M.B. **Folículos ovarianos préantrais bovinos: cultivo *in vitro* e xenotransplante**. 2010. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

BOSCH, P.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; MILLER, D.M.; WININGER, J.D.; MASSEY, J.B.; LAMB, S.V.; BRACKETT, B.G. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v.61, p.581-594, 2004.

CAMBIAGHI, A.S.; CASTELLOTTI, D.S. Preservação da Fertilidade em Pacientes com Câncer. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.30, n.5, p.406-410, 2008.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Ovary and ovulation: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v.10, n.9, p.2334-2338, 1995.

CARRIJO, O.A. **Estimativa da população, caracterização morfométrica e ultraestrutural e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas doméstica**. Tese (Doutorado em Biologia Animal), Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, p.78, 2009.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, pub.957, p.1-17, 2011.

CECCONI, S. Growth and differentiation of small ovarian follicles. **Journal Reproduction Development**, v.48, p.431-445, 2002.

**CITES**. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, part of the Endangered Species Act (PL 93-205, 93rd Congress) and in 50 appendices. Code Fed. Reg., part.23, 1973.

DEANESLY, R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. **J Endocrinol**, v.1, p.197-200, 1954.

DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **J Assist Reprod Genet**, v.25, p.287-296, 2008.

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; POIRELA, M.P.; GUERINB, J.F.; FRANCKA, M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, v.60, p.999-1010, 2002.

DONNEZ, J.; BASSIL, S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. **Hum. Reprod.**, v.4, p.248-259, 1998.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; *et al.* Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone-marrow transplantation for sickle anaemia: case report. **Hum Reprod**, v.21, n.1, p.183-188, 2006.

DONNEZ, J.; SQUIFFLET, J.; PIRARD, C.; DEMYLLE, D.; DELBAERE, D.; ARMENIO, L.; ENGLERT, Y.; CHERON, A.; JADOUL, P.; DOLMANS, M.M. Live birth after allografting of ovarian cortex between genetically non-identical sisters. **Human Reproduction**, v.26, n.6, p.1384-1388, 2011.

FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Bras Reprod Anim**, v.35, n.1, p.3-15, 2011.

FRIEDLER, S.; GINDICE, L.C.; LAMB, E.J. Criopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v.49, n.5, p.743-764, 1988.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2 ed., São Paulo: Roca, 2008.

GOSDEN, R.G.; BOULTON, M.I.; GRANT, K.; WEBB, R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **J Reprod Fertil**, v.101, p.619–623, 1994.

GUNASENA, K.T.; LAKEY, J.R.; VILLINES, P.M.; BUSH, M.; RAATH, C.; CRITSER, E.S. *et al.* Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Anim Reprod Sci**, v. 53, p. 265–275, 1998.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, n.407, p.770-776, 2000.

HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BOSCH, P.; WININGER, J.D.; MASSEY, J.B.; CHO, H.; BRACKETT, B.G. Recovery of oocytes from bovine ovarian tissue transplanted to NOD SCID mice. **Fertil Steril**, v.76, n.1, p.56, 2001.

HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BOSCH, P.; MILLER, D.M.; WININGER, J.D.; MASSEY, J.B.; BRACKETT, B.G. Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 4, p. 1180-1187, 2005.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W.; Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. **J Reprod Fertil Suppl**, v.57, p.111–25, 2002.

HUSSEIN, M.R.; HAEMEL, A.K.; WOOD, G.S. P53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **Eur J Cancer Prev**, v.12, p.93–100, 2003.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction and Embryology**, v.11, p.162-178, 2005.

JOHNSON, A.L.; BRIDGHAM, J.T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. **J. Society for Reproduction and Fertility**, v.124, p.19-27, 2002.

JOHNSTON, L.A.; O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. "In vitro" maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 343-356, 1989.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: **Histologia básica**. Guanabara Koogan, 2004.

KANEKO, H.; KIKUCHI, K.; NOGUCHI, J.; HOSOE, M.; AKITA, T. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. **Biology of Reproduction**, v.69, n.5, p.1488-1493, 2003.

KANEKO, H.; KIKUCHI, K.; NOGUCHI, J.; OZAWA, M.; OHNUMA, K.; MAEDOMARI, N.; KASHIWAZAKI, N. Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 279-288, 2006.

KANEKO, H.; NAKAI, M.; TANIHARA, F.; NOGUCHI, J.; KIKUCHI, K. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 887-892, 2013.

KERR, J.R.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239- 257, 1972.

KIM, S.S. Time to rethink ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. **Reprod Biomed Online**, v.20., p.171-174, 2010.

LEE, D.M.; STOUFFER, R.L.; ZELINSKI-WOOTEN, M.B. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**, v.428, p.137–138, 2004.

LEONEL, E.C.R. **Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas**. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília.

LEONEL, E.C.R.; VILELA, J.M.V.; PAIVA, R.E.G.; AMARAL, R.S.; LUCCI, I.C.M. Método não invasivo de dosagem hormonal na determinação da eficácia de autotransplante ovariano em gatas domésticas. **Rev.de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.12, n.2, p.40-41, 2014.

LIMA, A.K.F.; SILVA, A.R.; SANTOS, R.R.; SALES, D.M.; EVANGELISTA, A.F.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**, v.66, ed.6-7, p.1664-1666, 2006.

LIMA, S.M.R.R. Considerações sobre preservação de tecido ovariano e reposição hormonal no climatério. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v.56, n.3, p.150-154, 2011.

LIMA, G.L. **Conservação de material genético de espécies silvestres do bioma caatinga utilizando a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré antrais (MOIFOPA)**. 2015. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Mossoró, 2015.

LUCIANO, A.M.; CHIGIONI, S.; LODDE V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G.C.; MODINA, S.C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**, v.59, p.90–95, 2009.

LUVONI, G.C.; PELLIZZARI, P. Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. **Theriogenology**, v.53, p.1529-1540, 2000.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.101-11, 2006.

LUVONI, G.C. Cryosurvival of *Ex Situ* and *In Situ* Feline Oocytes. **Reprod. Dom. Anim.**, v.47, n.6, p.266-268, 2012.

LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEIREDO, J.R. & RODRIGUES, A.P.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, pub.956, p.1-13, 2011.

MARQUES, L.S. **Vitrificação de tecido ovariano de zebrafish utilizando uma cápsula de metal**. Tese (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2014.

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; LANGENDONCKT, A.; DEFREERE, S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertil Steril**, v.82, p.1390–1394, 2004.

MARTINEZ-MADRID, B.; CAMBONI, A.; DOLMANS, M.M.; NOTTOLA, S.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNEZ, J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole humano varies with their vascular pedicle. **Fertil. Steril**, v.87, p.1153-1165, 2007.

MAZUR, P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. **Origin Life**, v.10, p.137-159, 1980.

MERLO, B.; IACONO, E.; REGAZZINI, M.; ZAMBELLI, D. Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. **Theriogenology**, v.70, p.126-130, 2008.

MILLER, D.M. O futuro da oncologia. In: BENNETT, J.C.; PLUM, F.; **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1-2, p.1183-1190, 1997.

MISSIO, D.; ROSA, F.Q.; GUIMARÃES, A.C.G.; LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S. Conservação de folículos pré-antrais de felinos domésticos (*Felis catus*) refrigerados por 24h em TCM 199 e PBS. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.38, n.3, p.176-181, 2014.

NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J. R. P.; PEGG, D. E.; FADDY, M. J.; GOSDEN R. G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 373-380, 1998.

O'DONOVAN, N.; CROWN, J.; STUNELL, H.; HILL, A.D.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M.J. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v.9, n.2, p.738-742, 2003.

OKTAY, K.; NEWNTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R.G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Hum Reprod**, v.13, p.1133–1138, 1998.

OKTAY, K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. **Hum Reprod.**, v.7, p.526–534, 2001.

PARKES, A.S. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperature. **Proc R Soc London**, v.4, p.455-470, 1953.

PARKS, J.E. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow AM, Critser JK, editors. Reproductive tissue banking. **Scientific principles**. San Diego, CA: Academic Press; p.229–261, 1997.

PARROT, D. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. **J Reprod Fertil**, v.1, p.230–241, 1960.

PIMENTEL, M.M.L. **Xenografting of bovine ovaries under renal capsule of BALB-c/Nude and C57BL6 SCID mice stimulated with eCG or association of FSH and LH**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S. **Introduction to Immunocytochemistry**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2003.

PUKAZHENTHI, B.; WILDT, D. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.33-46, 2004.

PUKAZHENTI, B.S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.112-21, 2006.

RAO, B.S.; MAHESH, Y.U.; SUMAN, K.; CHARAN, K.V.; NATH, R.; RAO, K.R. Meiotic maturation of oocytes recovered from the ovaries of Indian big cats at *post mortem*. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal**, v.51, p.19-25, 2015.

RÔLO, J.L.J.P. **Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas**. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Brasília, 2012.

RUBINSKY, B. Principles of Low Temperature Cell Preservation. **Heart Fail Rev**, v.8, n.3, p.277-284, 2003.

SANTOS, I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70-84, 2000.

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.

SANTOS, R.R.; AMORIM, C.; CECCONI, S.; FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.; PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reprod Sci**, v.122, p.151–163, 2010.

SEMPLE, E.; WEISSMAN, A.; GOTLEIB, L.; CASPER, R.F.; LEIBO, S.P. Transplantation of fresh or cryopreserved bovine ovarian cortex to NOD-SCID mice. **Theriogenology**, v.53, p.264, 2000.



SILBER, S.J.; DEROSA, M.; PINEDA, J.; LENAHAN, K.; GREINIA, D.; GORMAN, K.; GOSDEN, R.G. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. **Human Reproduction**, v.23, n.7, p.1531–1537, 2008.

SILVA, A.M.S. **Expressão das conexinas 37 e 43 em folículos ovarianos ovinos, frescos, vitrificados ou cultivados *in vitro***. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

SLOT, K.A.; VOORENDT, M.; BOER-BROUWER, M.; VUGT, H.H.V.; TEERDS, K.J. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. **J. Endocrinol**, v.188, p.179-192, 2006.

SONGSASEN, N., WILDT, D.E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.2–22, 2007.

TAYLOR, C.R. Introduction to Immunohistochemistry. In: TAYLOR, C.R.; RUDBECK, L. **Immunohistochemical Staining Methods**. Dako, ed.6, p.10-17, 2013.

THOMAZ, B.A.C.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; ALMODIN, C.G.; MINGUETTI-CAMARA, V.C.; CESCHIN, A.P.; IOSHII, S.O. Aspectos histológicos do ovário de coelhas após criopreservação. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, n.11, p.642-649, 2005.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v.281, n.5381, p.1312–1316, 1998.

VASCONCELOS, A.C. **Patologia geral em hipertexto**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

WIEDEMANN, C.; HRIBAL, R.; RINGLEB, J.; BERTELSEN, M.F.; RASMUSEN, K.; ANDERSEN, C.Y. et al. Preservation of primordial follicles from lions by slow-freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. **Reprod. Domest. Anim.**, v.47, p.300-304, 2012.

WILDT, D.E.; COMIZZOLI, P.; PUKAZHENTHI, B.; SONGSASEN, N. Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. **Molecular Reproduction Development**, v.77, p.397-409, 2010.

WOOD, T.C.; BYERS, A.P.; JENNETTE, B.E.; WILDT, D.E. Influence of protein and hormone supplementation on “in vitro” maturation and fertilization of domestic cat eggs. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 315-323, 1995.

WOLFE, B. A.; WILDT, D. E. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. **Journal Reproduction and Fertility**, v.106, p.135-41, 1996.

ZENG, W.; AVELAR, G.F.; RATHI, R.; FRANCA, L.R.; DOBRINSKI, I. The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. **Journal Andrology**, v.27, p.527-533, 2006.

**Artigo aceito para publicação no periódico *Reproduction in Domestic Animals*.**

**CAPÍTULO 2 – Vitrification of cat ovarian tissue: does fragment size matters?**

**Vitrification of cat ovarian tissue: does fragment size matters?**

**Running title: vitrification of cat ovarian tissue**

Camila M Gorricho<sup>A</sup>, Mariana R Tavares<sup>A</sup>, Maricy Apparício<sup>A,B\*</sup>, Carlos E F Alves<sup>C</sup>,  
Beatrice I Macente<sup>A</sup>, Cleber F M Mansano<sup>D</sup>, Gilson H Toniollo<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Departamento de Medicina Preventiva e Reprodução Animal, Univ Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>B</sup>Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade de Franca, UNIFRAN, Franca, SP, Brazil.

<sup>C</sup>Departamento de Clínica Veterinária, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>D</sup>CAUNESP- Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Univ Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil.

\*Corresponding author: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal-SP, Brazil. Tel: +55-16 32097330.

maricyap@hotmail.com

## Summary

The aim of the present study was to investigate whether or not the size of the ovarian fragment influence its resistance to cryostorage. For that purpose, ovaries were collected from 34 queens (various breeds, age 1-5 y) by routine ovariectomy, transported to the laboratory and then sectioned in different sizes (3 x 3 x 3 mm, 5 x 3 x 3 mm and 7 x 3 x 3 mm) and randomly assigned to a control (GC3, GC5 and GC7, respectively) or vitrified (GV3, GV5 and GV7, respectively) groups. Vitrified-warmed fragments were evaluated by histomorphology and immunohistochemistry (for apoptotic rates by using cleaved caspase-3). Histological examination reveal that 72.97% of the follicles in GV3 and 72.58% in GV5 were normal while only 42.86% of the follicles in GV7. The main morphological alteration presented in all groups was a detachment of the epithelial cells. Similarly, immunohistochemistry evaluation using caspase 3 revealed a small proportion of apoptotic cells in GV3 (53%) while in GV7 43.58% of the cells expressed cleaved caspase-3. These findings indicate that fragments sectioned in 3 x 3 x 3 mm (27mm<sup>3</sup>) seems more adequate for perfusion of the cryoprotectant, causing less damage to the cell after vitrification-warming.

**Keywords:** Apoptosis, cryopreservation, felids, histology, immunohistochemistry, ovary.

## **Introduction**

It has been reported that 38 felid species are threatened by extinction (IUCN, 2017), which is a reflection of the destruction of their habitats, mortality due to illegal hunting and also by the reduction in genetic variability, resulting in decreased fertility (Wildt et al., 2010).

Assisted reproductive techniques, such as cryopreservation of gametes and gonadal tissues are plausible alternatives for long-term storage of germplasm of animals that are reproductively incompetent or that died unexpectedly (Pukazhenti & Wildt, 2004; Wildt et al., 2010; Zeng et al., 2006). As the use of wild feline species is impracticable in a large-scale research, the domestic cat is an excellent experimental model for their wild counterparts and for humans with autoimmune diseases or who have been submitted to radio/chemotherapy (Luvoni, 2006; Pukazhenti et al., 2006).

Cryopreservation of the ovarian tissue is a more complex procedure compared to gametes, due to a variety of cell types, which have different sensitivity to the cold induced damage. Studies on felines, mice and humans, have demonstrated that the follicles presented in the ovarian tissue are able to survive during freezing and thawing, and are capable to develop from early to more advanced stages (Bosch et al., 2004; Gosden et al., 1994; Oktay et al., 1998). In cats, it has been demonstrated that vitrification was superior for preserving follicular original structure and viability compared to slow freezing (Comizzoli et al., 2009) and that oocytes recovered from vitrified-warmed ovarian tissue were capable of resuming meiosis when cryopreserved in cryotubes (Luvoni et al., 2012) or in cryotop (Alves et al., 2012).

Although improvements have been made over the years, ovarian tissue cryopreservation is still associated with tissue damage, which is characterized by stromal and cell lysis, pyknosis, karyolysis, cytoplasmic vacuolization and tissue atrophy (Reed,

2000; Taatjes et al., 2008). Despite these remarkable alterations, there are cells that may have started the process of cell death, with no morphological evidence of apoptosis. When the process of apoptosis begins, the death cascade leads to activation of proteases known as caspases (Ojala et al., 2002) and specific changes in cell surface and nuclear morphologic features are caused mostly by caspase-3 (Reed, 2000). Therefore, evaluation of caspase-3 expression might help to identify early structural modifications not detectable using conventional histology, as reported previously by our group (Tavares et al., 2017).

In order to contribute to the knowledge on the cryopreservation of feline gonadal tissue, we evaluated whether the fragment size influenced the viability of the ovarian tissue after vitrification/warming. For that purpose, we evaluated the histomorphological changes that occurred in vitrified-warmed tissues compared to the fresh ones and identified the number of apoptotic cells by immunohistochemistry using cleaved caspase-3.

## **Materials and Methods**

### *Experimental design*

For each of the 6 replicates, ovaries obtained from domestic queens were sectioned in three different sizes ( $3 \times 3 \times 3 \text{ mm} = 27\text{mm}^3$ ,  $5 \times 3 \times 3 \text{ mm} = 45\text{mm}^3$  and  $7 \times 3 \times 3 \text{ mm} = 63 \text{ mm}^3$ ) and allocated according to their size in control (GC3, GC5 and GC7, respectively) and vitrified (GV3, GV5 and GV7, respectively) groups. Fresh and vitrified-warmed ovarian cortex fragments were fixed in 10% formalin solution and prepared as routine: serial sections of  $5\mu\text{m}$  were collected for histology and stained with haematoxylin and eosin and for immunohistochemistry (percentage of apoptotic cells detected with cleaved caspase-3).

### *Animals and experimental groups*

A total of thirty four domestic queens aged 1-5 years old, of different breeds and with unknown stage of the oestrous cycle were enrolled in this study. Animals were subjected to a routine ovariectomy at the Veterinary Hospital “Governador Laudo Natel” of the Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal *campus* after being considered clinically healthy.

Ovaries were transported to the laboratory at a room temperature in Dulbecco’s PBS-PVA solution supplemented with 100µg/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin, within 1-4h. Ovaries were further transferred to Petri dishes where they were sectioned into two halves in order to separate cortex and medulla using a scapel blade. The ovarian cortex was sectioned in 3mm x 3mm x 3mm (GV3 = 27 mm<sup>3</sup>), 5mm x 3mm x 3mm (GV5 = 45 mm<sup>3</sup>) and 7mm x 3mm x 3mm (GV7 = 63 mm<sup>3</sup>) sized pieces of length, thick and width, respectively. Then, according to the fragment size they were randomly assigned to a vitrification group or to a control group.

### *Vitrification and warming*

Vitrification was performed according to Ishijima et al. (2006) with modifications. Briefly, the cortex fragments were immersed in drops of 200µL of modified Dulbecco’s phosphate-buffered saline (mDPBS) with 1M of DMSO at room temperature for 60 s, transferred and maintained into cryotubes containing 5-10 µL of mPBS-DMSO for 5 min on ice. Then, DAP 123 solution (1M acetamide, 2M DMSO and 3M propylene glycol) maintained at 0°C was added in each cryotube, and the cryotubes were kept at 0°C for additional 5 minutes, before being directly plunged into liquid nitrogen for storage.

At warming, cryotubes were kept in room temperature for 60 seconds, and then diluted with 900 $\mu$ L of mDPBS containing 0.25 M sucrose at 37°C. Thereupon, warmed fragments were repeatedly washed in mDPBS and in HTF-BSA medium for three minutes.

#### *Histological evaluation*

Fragments of ovarian tissue (vitrified and control) were fixed in 10% formaline solution for 24h, dehydrated in graded series of ethanol (50%, 60%, 70%, 80%), cleared with xylene, embedded in paraffin and sectioned at 5 $\mu$ m. Sections were mounted on a glass slide, stained with hematoxylin-eosin (HE) dye and evaluated under a light microscope (40 and 100x).

Follicular classification was based on the criteria described by Klocke et al. (2014): (1) primordial follicles: oocytes surrounded by a layer of flattened granulosa cells; (2) primary follicles: oocytes surrounded by a layer of cuboidal granulosa cells; secondary follicles: oocytes surrounded by two or more completed layers of cuboidal granulosa cells; (3) tertiary follicles: presence of an antrum with multilaminar follicle.

Based on the morphological alterations, sectioned tissues were classified as follows: intact follicles were scored as 0; follicles presenting detachment of cells from the basement membrane (discrete degeneration) were scored as 1; follicles showing detachment of cells from the basement membrane and degeneration of up to 30% of oocytes (moderate degeneration) were scored as 2; and follicles presenting accentuated degeneration with more than 30% degenerated oocytes were classified as score 3.

#### *Immunohistochemistry for cleaved caspase-3*

Fresh and vitrified fragments were evaluated for apoptosis through the activity of caspase-3, which is the main mediator of this process. Tissue sections were mounted on



positive charged slides (StarFrost, Knittel, Germany), dewaxed in xylene and rehydrated in ethanol. The antigen retrieval was performed using citrate buffer (pH 6.0) in a pressure cooker (Pascal®, Dako, Carpinteria, CA, EUA). The samples were treated with freshly prepared 8% hydrogen peroxide (code: 2081, Dinamica, Diadema, Brazil) in methanol (code: 956, Dinamica, Diadema, Brazil) for 10 minutes and further washed in Tris-buffered saline. Slides were incubated with a rabbit cleaved anti-caspase 3 (Cell signalling, Massachusetts, EUA) primary antibody at 1: 300 dilution, overnight.

A polymer, peroxidase-based system (code: K4061, Envision, Dako, Carpinteria, CA, EUA) was subsequently applied as a secondary antibody and 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (code: K3468, DAB, Dako, Carpinteria, CA, EUA) was used as chromogen for 5 minutes, followed by the Harris haematoxylin (code: 2072, Dinamica, Diadema, Brazil) counterstaining. Negative controls were performed using rabbit immunoglobulin fraction (Dako, Carpinteria, CA, EUA) according to the manufacture's instruction. . A normal feline lymph node was used as positive control following the Protein Atlas recommendation (<https://www.proteinatlas.org>). The percentage of positive cells for caspase was established counting five high power fields at 400x magnification.

### *Western blotting*

The western blotting technique was performed to demonstrate antibody specificity to feline tissue. We used two fresh lymph nodes (positive control) from different cats during necropsy. The protein extraction, quantification and electrophoresis were performed following the previous description (Fonseca-Alves et al., 2018). Then, we performed the protein transfection to a nitrocellulose membrane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Then, the blots were blocked using 10% of bovine serum albumin (BSA) in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (TBS-T) for one hour and was

incubated in the rabbit cleaved anti-caspase 3 antibody (Cell signalling, Massachusetts, EUA) at 1:500 dilution, overnight. A goat anti- $\beta$ -actin antibody (1:1000; sc-1615, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as a positive control. After the period of 18 hours, the membranes were incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and the proteins were detected by chemiluminescence (Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

### *Statistical Analysis*

Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis Systems software package (Version 9.2; SAS Institute Inc., 2014, NC, USA). Chi-square was used for classification of follicles, follicular morphology and immunohistochemistry, between fresh (control) and vitrified fragments. The statistical difference for percentage was evaluated by one-way ANOVA, and the Student–Newmann–Keuls post hoc test was used to evaluate the interaction of fresh (control) and vitrified ovaries fragments sizes, *p*-Value was considered statistically significant when  $<.05$ .

### **Results**

A total of 68 feline ovaries were used in this experiment. Histological evaluation of follicular morphology was carried out in 192 ovarian fragments: 162 vitrified (GV3 = 74 fragments, GV5 = 60 fragments and GV7 = 28 fragments) and 30 fresh- control (GC3=10 fragments, GC5 = 10 fragments and GC7 = 10 fragments).

### *Histological evaluation*

A total of 268 follicles were morphologically evaluated in control groups (from which 193 were primary, 63 secondary and 12 tertiary) and 1064 in vitrified groups (752 primary, 206 secondary and 106 tertiary; Table 1).

After warming, the 27 mm<sup>3</sup> (GV3) and 45 mm<sup>3</sup> (GV5) ovarian pieces had the highest percentage of intact follicles (classified as score 0) compared to 63 mm<sup>3</sup> (GV7) pieces (Table 2). Furthermore, the percentage of ovarian pieces presenting discrete and moderate degeneration (score 1 and 2) was significantly lower in 27 mm<sup>3</sup> (GV3) vitrified fragments. As expected, fresh tissue (control) presented 100% of morphologically normal follicles (Figure 1).

### *Immunohistochemical evaluation*

A total of 214 ovarian cortical pieces were evaluated for caspase 3 expression. In all control groups (GC3, GC5 and GC7), the percentage of apoptosis in follicles and stroma ranged from 0 to 5%. On the other hand, in the groups submitted to vitrification, there were some differences:GV3 presented the lowest percentage of expression of caspase 3 in follicles and stroma while GV7 the highest rates (Table 3). In addition, there were differences in apoptosis rates in stroma and follicles with the latter one being more prone (Figure 2).

### *Western blotting*

We identified two specific bands for cleaved caspase 3 with 19 KDa and 17 KDa, respectively (Figure 3). This antibody is expected to identify both bands as an activated caspase 3.

## Discussion

The present study was designed to evaluate the influence of the size of the ovarian tissue fragment submitted to vitrification/warming on the follicular morphology and apoptosis rate. Our results showed that follicular morphology is affected by the size of the fragment; 3 x 3 x 3 mm fragments (GV3) and 5 x 3 x 3 mm fragments (GV5) presented a greater proportion of intact follicles (72.97% and 72.58%, respectively) compared to 7 x 3 x 3 mm fragments (GV7; 42.86%). Previous studies in other species have reported conflicted results. In swine, it has been suggested that preserving larger pieces of tissue is preferable in terms of follicular population (Jeremias et al., 2003) while in bovines, Ferreira et al. (2010) reported that ovarian fragments with dimensions of 10 mm (length) x 3 (thick) x 2mm (width) presented 56% of morphologically intact follicles, while the fragments of 10 mm x 3 mm x 4 mm presented 34% of intact follicles. Previous investigations on the cryopreservation of feline ovarian tissue used only fragment sizes that were cut up to 27mm<sup>3</sup> (Luvoni et al., 2012; Alves et al., 2012; Tanpradit et al., 2015), probably based on cryobiology principles (Neto et al., 2007). An ovarian tissue fragment of approximately 1 to 2 mm thickness favour the larger contact area and, consequently, higher solute penetration (Newton et al., 1996). On the other hand, larger pieces of ovarian tissues generally show a significant increase in abnormal follicular morphology after cryopreservation/thawing (Ferreira et al., 2010).

It has been demonstrated that the quality of feline ovarian tissues is affected by the vitrification protocol (both the technique and the type of cryoprotectants used) and by the fact that there are several cell types with different cryosensitivity (Bosch et al., 2004; Lima et al., 2006). As the ovarian pieces are usually taken from queens being at different phases of the oestrus cycle, it is expected a great variety in the number of follicles presented in each fragment size. In fact, the histological evaluation in our study revealed

a great frequency of primary follicles in all groups, corroborating the investigation of Carrijo et al. (2010) in cats, Jewgenow & Stolte (1996) in non-domestic felines and Salehnia et al. (2012) in humans. The higher percentage of primary follicles might be explained by the fact that only young cats were enrolled in the experiments and, according to Carvalho et al. (2016), they have a higher amount of primary follicles compared to cats over six years of age. Secondary and tertiary follicles accounted for less than 35% of the follicular population, especially in the GC3 and GV3. In accordance, Figueiredo et al. (2007) reported that tertiary follicles represented only 5 to 10% of the follicular population. According to Newton et al. (1996) primordial follicles may be more tolerant of cryopreservation than secondary oocytes because they are small, lack zona pellucida and are relatively metabolically quiescent and undifferentiated, which might have contributed to the high rate of intact follicles found in GV3 and GV5.

The limitation of histological analysis is its inability to identify subtle alterations that might compromise the maintenance of ovarian function after cryopreservation. In this regard, the identification of apoptosis in the tissue by immunohistochemistry is of the pivotal importance, once it enables to identify the cell death before morphological alterations occur. For that reason, we have performed the Western blotting for the cleaved caspase 3 antibody to show the cross reactivity with the feline tissue and then, we used the immunohistochemistry to identify the apoptotic cells in the tissue samples. As described in the antibody datasheet, we identified two specific bands with 17KDa and 19KDa indicating the specific identification of the activated caspase 3.

Our data shows that the control group presented only 0-10% of cleaved caspase-3 expression (apoptosis) in follicles and stroma while in the vitrified groups the caspase expression ranged from 0 to 100% in follicles and 0 to 50% in stromal cells, pointing out the latter as the most resistant tissue. Moreover, GV3 presented the highest frequency of

cells with 0 to 5% apoptosis (53.01%) in follicles and stroma and GV7 the highest percentage of follicles presenting 51 to 75% apoptosis. Although immunohistochemistry results indicates GV3 as the group with the lowest cold induced damage and, in this aspect, corroborating with histological evaluation, it is important to point out that follicles considered morphologically normal were positive for cleaved caspase-3. This finding prompts the importance of considering other methods (other than histology) to evaluate the efficacy of a cryopreservation protocol, such as *in vitro* cell culture and ovarian transplantation, the former allows to observe undetected damages to the cells (Rodrigues et al., 2005) and the latter verifies the reintegration of the ovarian function (Arav et al., 2005; Salle et al., 2003). Presently, our results demonstrated that the size of the ovarian fragment influences the viability of the post-warming tissue and that 27 mm<sup>3</sup> sized pieces showed a reduced number of abnormal follicles after vitrification as well as the lowest rate of apoptosis.

### **Conflict of interest**

None of the authors have any conflict of interest to declare.

### **References**

- Alves, A. E., Kozel, A. C., & Luvoni, G. C. (2012). Vitrification with DAP 213 and Cryotop of *Ex Situ* and *In Situ* Feline Cumulus–Oocyte Complexes. *Reproduction in domestic Animals*, 47, 1003-1008. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02006
- Arav, A., Revel, A., Nathan, Y., Bor, A., Gacitua, H., Yavin, S., Gavish, Z., & Uri, M. (2005). Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Human Reproduction*, 20, 3554-3559. doi:10.1093/humrep/dei278

Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H. J., Miller, D. M., Winingar, J. D., Massey, J. B., Lamb, S. V., & Brackett, B. G. (2004). Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, 61, 581-594. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00244-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00244-9)

Carvalho, I. R., Denadai, D. S., Trevisan, J. T., Mendes, H. M. F., Perri, S. H. V., Monteiro, C. M. R., Ferreira, J. Z., Feliciano, M.A.R., Pierucci, J. C., Vicente, W. R. R., & Koivisto, M. B. (2016). Follicular histomorphometry and evaluation of ovarian apoptosis in queens of different age groups. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44, 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.80955>

Carrijo Júnior, O. A., Marinho, A. P. S., Campos. A. A., Amorim, C.A., Bao, S. N., & Lucci, C. M. (2010). Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, 191, 152-160. doi: [10.1159/000225935](http://dx.doi.org/10.1159/000225935)

Comizzoli, P., Martinez-Madrid, C. B., Pukazhenthil, B. S., & Wildt, D. E. (2009). Vitriification of ovarian cortex from prepubertal and adult cats induces less damage to the primordial follicles than slow freezing. *Biology of Reproduction*, 81, 187. doi: <https://doi.org/10.1093/biolreprod/81.s1.187>

Ferreira, M., Bos-Mikich, A., Frantz, N., Rodrigues, J. L., Brunetto, A. L., & Schwartzmann, G. (2010). The Effects of Sample Size on the Outcome of Ovarian Tissue Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 99-102. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01261.x

Figueiredo, J. R., Celestino, J. J. H., Rodrigues, A. P. R., & Silva, J. R. V. (2007). Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 143-152.

Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Laufer-Amorim R. (2018). Evaluation of NKX3.1 and C-MYC expression in canine prostatic cancer. *Research in Veterinary Science*, 118, 365-370. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.04.001.

Gosden, R. G., Boulton, M. I., Grant, K., & Webb, R. (1994). Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, 101, 619–623. doi: 10.1530/jrf.0.1010619

IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 16 April 2018.

Ishijima, T., Kobayashi, Y., Lee, D.S., Ueta, Y.Y., Matsui, M., Lee, J.Y., Suwa, Y., Miyahara, K., Suzuki, H. (2006). Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev*, 52, 293–299. doi: <https://doi.org/10.1262/jrd.17080>



Jin, S., Lei, L., Shea, L. D., Zelinski, M. B., Stouffer, R. L., Woodruff, T. K. (2010). Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 93, 2627-2632. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.029>

Jeremias, E., Bedaiwy, M., Nelson, D., Biscotti, C., Falcone, T. (2003). Assessment of tissue injury in cryopreserved ovarian tissue. *Fertil Steril* 79, 651–656. doi: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04810-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04810-0).

Jewgenow, K., & Stolte, M. (1996). Isolation of pré-antral follicles from nondomestic cats - Viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science*, 44, 183-193. doi: [10.1016/0378-4320\(96\)01549-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01549-7)

Keros, V., Xella, S., Hultenby, K., Pettersson, K., Sheikhi, M., Volpe, A., Hreinsson, J., Hovatta, O. (2009). Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 24, p.1670-1683. doi: [10.1093/humrep/dep079](https://doi.org/10.1093/humrep/dep079)

Klocke, S., Tappehorn, C., Griesinger, G. (2014). Effect of supra zero storage on human ovarian cortex prior to vitrification-warming. *Reproductive Biomedicine online*, 29, 251-258. doi: [10.1016/j.rbmo.2014.03.025](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.03.025)

Lima, A. K. F., Silva, A. R., Santos, R. R., Sales, D. M., Evangelista, A. F., Figueiredo, J. R., & Silva, L. D. M. (2006). Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*, 66, 1664-1666. doi: [10.1016/j.theriogenology.2006.02.014](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.014)

Luvoni, G. C. (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66, 101-111. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.012

Luvoni, G. C., Tessaro, I., Apparicio, M., Ruggeri, E., Luciano, A.M., Modina, S. C. (2012) Effect of Vitrification of Feline Ovarian Cortex on Follicular and Oocyte Quality and Competence. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 385 – 391. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01885.x.

Neto, V., Buff, S., Lornage, J., Bottollier, B., Guerin, P., Joly, T. (2007). Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertil Steril*, 89, 1348–1356. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.046.

Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V., & Gosden, R. (1996). Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 11(7), 1487-1491. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019423>

Oktay, K., Newton, H., Mullan, J., & Gosden, R. G. (1998). Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*, v.13, p.1133–1138, 1998. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1133>

Otala, M., Erkkilä, K., Tuuri, T., Sjöberg, J., Suomalainen, L., Suikkari, A.M., Pentikäinen, V., Dunkel, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular human reproduction*, 8 (3), 228-236. doi: [doi.org/10.1093/molehr/8.3.228](https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.228)

Pukazhenthil, B., & Wildt, D. (2004). Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reproduction, Fertility and Development*, 16, 33-46. doi:10.10371/RD03076

Pukazhenthil, B. S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., & Wildt, D. E. (2006). The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, 66, 112-121. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.020

Reed, J.C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157, 1415–1430. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64779-7.

Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., Costa, S. H. F., Santos, R. R., Lucci, C. M., Nunes, J. F., & Figueiredo, J. R. (2005). Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Ruminant Research*, 56, 103-111. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.03.007>

Salehnia, M., Sheikhi, M., Pourbeiranvand, S., & Lundqvist, M. Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling. (2012). *Reproductive BioMedicine Online*, 25(5), 492-499. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.07.021

Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Berthollet, C., & Lornage, J. (2003). Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*, 80, 172-177. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00554-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00554-5)

Taajes, D. J., Sobel, B. E., Budd, R.C. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*, 129, 33–43. doi: 10.1007/s00418-007-0356-9.

Tanpradit, N., Comizzoli, P., Srisuwatanasagul, S., Chatdarong, K. (2015). Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity, *Theriogenology*, 83, 1553–1561. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.035.

Tavares, M. R., Apparício, M., Alves, C. E. F., Macente, B. I., Gorricho, C., Toniollo, G. H. (2017). An alternative method to slow freeze cat ovarian tissue In: XXth International Congress on the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. Abstract Book XXth EVSSAR Congress. Vienna: EVSSAR, 9-9.

Wildt, D.E., Comizzoli, P., Pukazhenth, B., & Songsasen, N. (2010). Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular Reproduction Development*, 77, 397-409. doi: 10.1002/mrd.21137

Zeng, W., Avelar, G. F., Rathi, R., Franca, L. R., & Dobrinski, I. (2006). The length of the spermatogenic cycle is conserved in porcine and ovine testis xenografts. *Journal Andrology*, 27, 527-533. doi: 10.2164/jandrol.05143

**Table 1:** Percentage of primary, secondary and tertiary follicles in control (GC3, GC5 and GC7) and vitrified groups (GV3, GV5 and GV7).

		Follicles classification Number of follicle (percentage)		
Fragment Size		Primary	Secondary	Tertiary
27 mm <sup>3</sup>	Control (GC3;n=80)	64 (80.00) <sup>a</sup>	14 (17.50) <sup>f</sup>	2 (2.50) <sup>f</sup>
	Vitrified (GV3;n=372)	276 (74.19) <sup>b</sup>	66 (17.74) <sup>e</sup>	30 (8.06) <sup>c</sup>
<b><i>p - Value</i></b>		*.2069		
45 mm <sup>3</sup>	Control (GC5;n=83)	59 (71.08) <sup>c</sup>	18 (21.69) <sup>c</sup>	6 (7.23) <sup>d</sup>
	Vitrified (GV5;n=472)	335 (70.97) <sup>d</sup>	92 (19.49) <sup>d</sup>	45 (9.53) <sup>b</sup>
<b><i>p - Value</i></b>		*.8049		
63 mm <sup>3</sup>	Control (GC7;n=105)	70 (66.77) <sup>e</sup>	31 (29.52) <sup>a</sup>	4 (3.81) <sup>e</sup>
	Vitrified (GV7;n=220)	141 (64.09) <sup>f</sup>	48 (21.82) <sup>b</sup>	31 (14.09) <sup>a</sup>
<b><i>p - Value</i></b>		*.0285		

\*Chi-square test, control and vitrified fragments.

<sup>a-f</sup> values in columns differ significantly, Student–Newman–Keuls test ( $p < .05$ ).

**Table 2:** Frequency of scores (percentage) in histological evaluation of domestic cat ovarian tissue sectioned in three sizes before (control) and after vitrification (scores represent: 0 = intact follicles; 1 = discrete degeneration; 2 = moderate degeneration; 3 = accentuated degeneration).

Fragment Size		Follicular morphology (Score/percentage)			
		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
27 mm <sup>3</sup>	Control (GC3)	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
	Vitrified (GV3)	72.97 <sup>b</sup>	9.46 <sup>c</sup>	8.11 <sup>c</sup>	9.46 <sup>a</sup>
<b><i>p</i> - Value</b>		*.0549			
45 mm <sup>3</sup>	Control (GC5)	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
	Vitrified (GV5)	72.58 <sup>b</sup>	12.90 <sup>b</sup>	11.29 <sup>b</sup>	3.23 <sup>c</sup>
<b><i>p</i> - Value</b>		*.0518			
63 mm <sup>3</sup>	Control (GC7)	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
	Vitrified (GV7)	42.86 <sup>c</sup>	32.14 <sup>a</sup>	17.86 <sup>a</sup>	7.14 <sup>b</sup>
<b><i>p</i> - Value</b>		*.0197	**0.0014		

\*Chi-square test, control and vitrified fragments.

<sup>a-f</sup> values in columns differ significantly, Student–Newman–Keuls test ( $p < .05$ ).

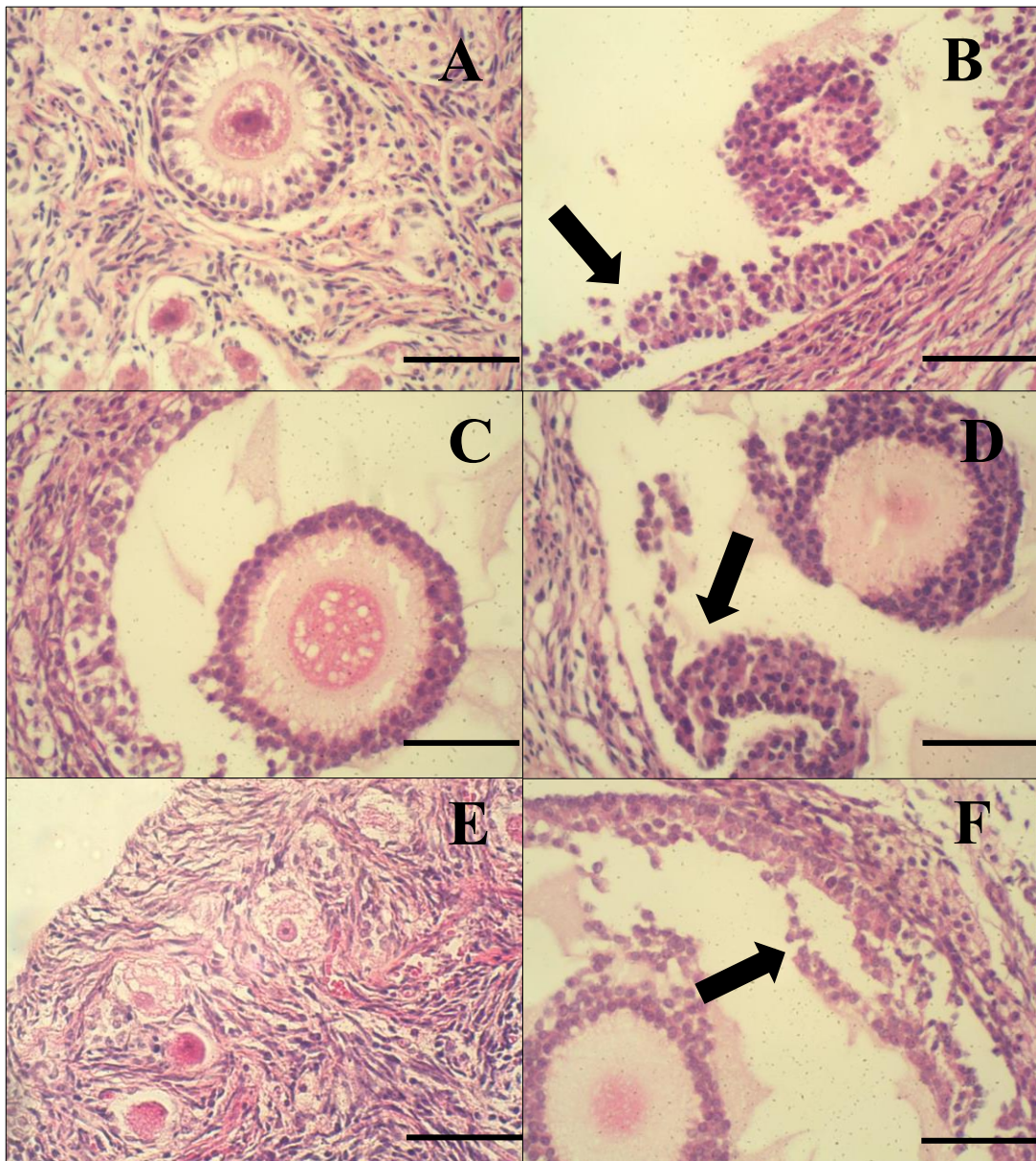
**Table 3:** Percentage of apoptotic cells in follicles and stroma in vitrified and control groups evaluated by immunohistochemistry (cleaved caspase-3).

Fragment Size		Evaluated structures / Percentage of cells in apoptosis						
		Follicles and stroma 0-5%	Follicles 6-25% and stroma 0-5%	Follicles 26-50% and stroma 0-5%	Follicles 51-75% and stroma 0-5%	Follicles 0-5% and stroma 6-25%	Follicles and stroma 6-25%	Follicles 76-100% and stroma 6-25%
27 mm <sup>3</sup>	Control (GC3)	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
	Vitrified (GV3)	53.01 <sup>b</sup>	31.33 <sup>b</sup>	8.43 <sup>c</sup>	1.20 <sup>c</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	6.02 <sup>a</sup>
<i>p – Value</i>		*.0001						
45 mm <sup>3</sup>	Control (GC5)	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
	Vitrified (GV5)	42.86 <sup>c</sup>	32.47 <sup>a</sup>	20.78 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.30 <sup>a</sup>	1.30 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>
<i>p – Value</i>		*.0001						
63 mm <sup>3</sup>	Control (GC7)	100.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
	Vitrified (GV7)	43.58 <sup>d</sup>	21.74 <sup>c</sup>	30.43 <sup>a</sup>	4.35 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>
<i>p – Value</i>		*.0001						

\*Chi-square test, control and vitrified fragments.

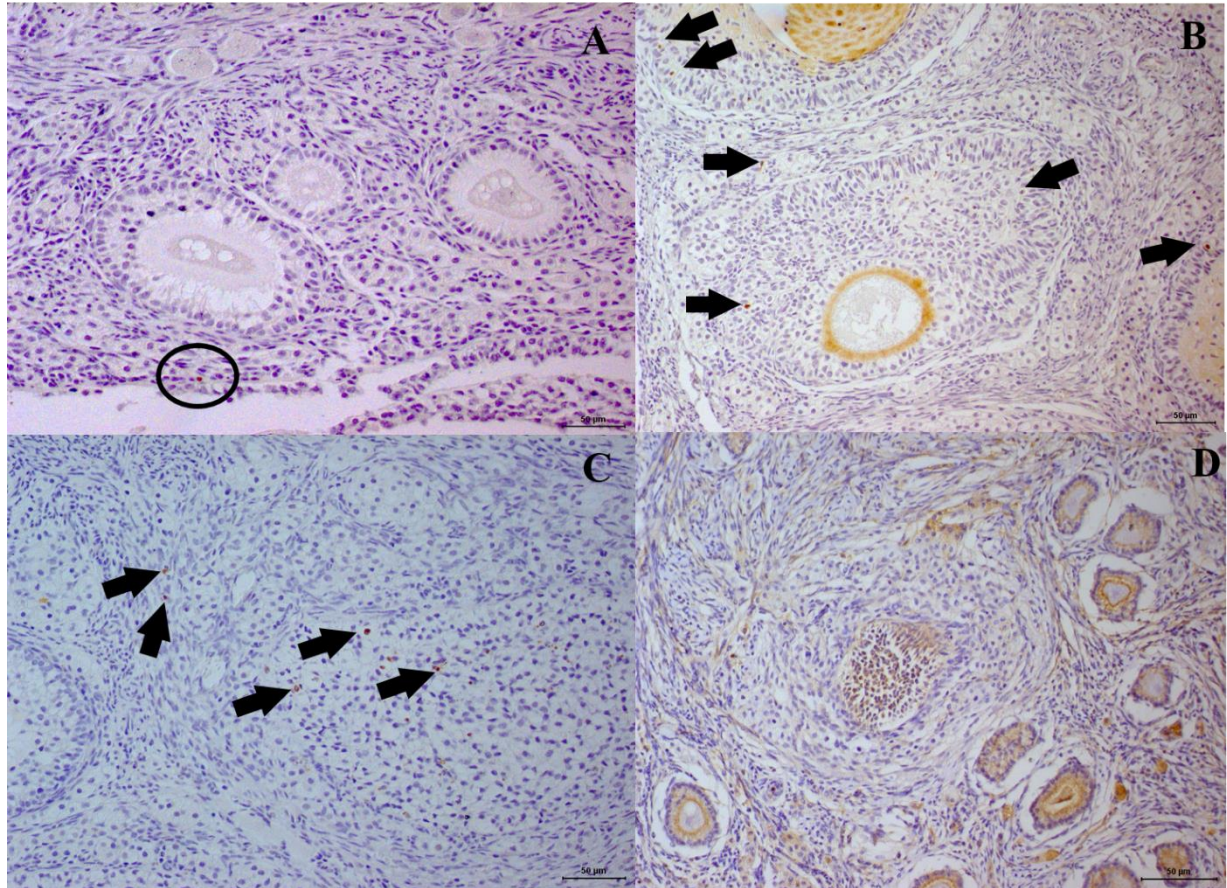
<sup>a-f</sup> values in columns differ significantly, Student–Newman–Keuls test ( $p < .05$ ).

**Fig. 1:** Photomicrographs of histological sections of the ovarian cortex of domestic cats submitted to vitrification. A and B correspond to GV3 (27mm<sup>3</sup> fragments), C and D correspond to GV5 (45mm<sup>3</sup> fragments) and E and F correspond to GV7 (63mm<sup>3</sup>), before and after vitrification, respectively. The arrows indicate the detachment of basement membrane cells. Scale bars represent: 100µm

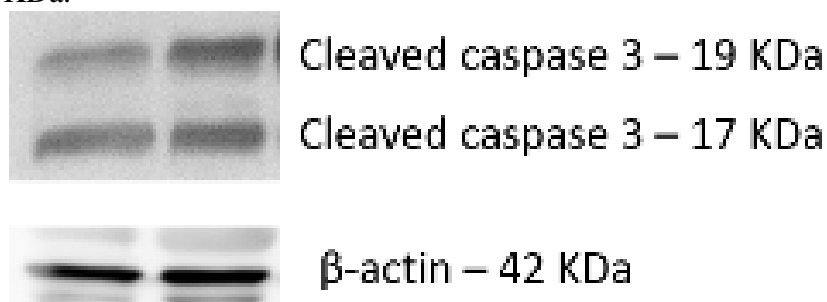




**Fig. 2.** Photomicrography of immunohistochemical staining of cleaved caspase-3 in cat ovarian cortex. A) Absence of nuclear/cytoplasmic staining in the follicles. Note a single positive cell within the stroma (circle). B) GV3: Cytoplasmic staining of cells from the follicular epithelia in apoptosis and in stroma cells (arrows). C) GV5: Nuclear staining of stromal cells (arrows). D) GV7: cytoplasmic and nuclear staining of stromal and follicular cells.



**Fig. 3.** Western blotting analysis revealing two specific band recognized by the cleaved caspase-3 antibody in feline lymph node samples. The bands had respectively, 17 and 19 KDa.



### **CAPÍTULO 3 – Considerações finais**

Os estímulos para a realização do presente estudo baseou-se na vasta aplicabilidade do mesmo em felinos domésticos e demais espécies, no favorecimento de técnicas de reprodução assistida e na inovação ao avaliar a presença da apoptose nos fragmentos de tecido ovariano vitrificados.

Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que o tamanho do mesmo influencia na viabilidade do tecido pós-descongelamento, sendo que o menor fragmento foi o mais favorável ao processo. Além disso, as principais alterações observadas na histologia resumiram-se em degeneração de oócito e desprendimento de membrana basal. Quanto a análise imunohistoquímica, foi possível identificar as alterações celulares, antes mesmo de que houvesse alterações morfológicas, através da mensuração da taxa de apoptose (caspase-3). Esse fato torna-se de grande valia para a realização de novos estudos e, conseqüentemente, aprimoramento do protocolo utilizado.

Portanto, acredita-se que esta linha de pesquisa continuará insigne, devido a necessidade da manutenção dos bancos de germoplasma, perante a destruição de *habitats* e risco de extinção de espécies. E, também, devido ao favorecimento da reprodução de indivíduos momentânea ou permanentemente incapacitados.