

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE DE VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE
GATAS DOMÉSTICAS (*Felis silvestris catus*) APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

JORGE LUIS ARAUJO MARTINS

Botucatu – SP
Junho 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ANÁLISE DE VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE
GATAS DOMÉSTICAS (*Felis catus silvestris*) APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

JORGE LUIS ARAUJO MARTINS

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Denise
Lopes.

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Martins, Jorge Luis Araujo.

Análise de viabilidade de folículos ovarianos
pré-antrais de gatas domésticas (*Felis silvestres catus*)
após criopreservação / Jorge Luis Araujo Martins. -
Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Denise Lopes
Capes: 50504002

1. Ovários. 2. Criopreservação. 3. Gato - Reprodução.
4. Genética animal. 5. Tecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: Banco genético; Criopreservação; Felinos;
Folículos preantrais; Ovário.

Nome do Autor: Jorge Luis Araujo Martins

Título: **ANÁLISE DE VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-
ANTRAIS DE GATAS DOMÉSTICAS (*Felis catus silvestris*) APÓS
CRIOPRESERVAÇÃO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a/Dr^a Maria Denise Lopes

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a/Dr^a Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a/Dr^a Fabiana Souza Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Ronaldo Gonçalves Morato

Membro

CENAP – ICMBio - Ministério do Meio Ambiente

Atibáia – São Paulo

Prof./Dr. Nei Moreira

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

UFP – Palotina – Parana

Data da Defesa: 26 de julho de 2007.

“A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega”
Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico a meus filhos e a todas as futuras gerações

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a meus pais, César Franco Nobre Martins e Vânia Bastos de Araújo pelo apoio incondicional ao meu desenvolvimento, por seu exemplo contínuo de honestidade e dignidade e por serem fonte inesgotável de inspiração para o meu aprendizado e desenvolvimento.

Agradeço a minha companheira Monica Maffei por seu amor e parceria imprescindível, sem a qual teria sido muito mais difícil trilhar os caminhos desta Vida.

Agradeço a meus filhos Nathanael e Jonas por colorirem minha vida com tanta beleza e amor. Vocês são a maior missão e prazer desta Vida.

Agradeço a minha orientadora no Brasil, Dra. Maria Denise Lopes, por ter acreditado no meu potencial e ter assumido responsabilidades e compromissos para que fosse possível meu desenvolvimento na Pós-graduação.

Agradeço a minha orientadora na Alemanha Dra. Katarina Jewgenow, pela coragem em me aceitar sem me conhecer, e por ter confiado tanto no meu trabalho. Agradeço pelo aprendizado técnico e humano adquirido durante minha estadia no IZW Leibniz Institut em Berlin e por ter aprendido, *in loco*, como atua uma das maiores pesquisadoras do mundo.

Ao Programa Ciências sem Fronteiras, pela cessão de bolsa de estudos para realizar meu doutorado sanduíche junto ao Leibniz Institut IZW de Berlin e à CAPES pela cessão de minha Bolsa durante o Doutorado no Brasil.

Agradeço a toda a equipe do Grupo de Trabalho 4 (Biologia da Reprodução) do IZW de Berlin, em especial a Sigrid Holz, Romy Hribal, Lorena Fernandez pela ajuda importante na coleta e processamento de minhas amostras e pela parceria nos laboratórios.

Obrigado também à Profa. Fabiana Souza Ferreira pela atenção e generosidade científica durante minhas atividades do Doutorado.

Agradeço a toda equipe do REPAS em especial à Ana Augusta Pagnano por sua presença generosa e atenciosa nas dependências do REPAS, sendo um ponto de equilíbrio para todo o grupo e aos colegas Carlos Renato Guaitolini e Lucas

Agostinho pela presença e solidariedade em nosso laboratório durante o Doutorado.

Agradeço a todo o corpo docente e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP de Botucatu, os quais fazem parte de uma equipe competente e dedicada que impulsiona um dos maiores polos de pesquisa em Reprodução Animal no Brasil.

Agradeço ao aluno da graduação Gabriel Bento Ferreira pela ajuda no processamento e leitura das amostras de histologia coletadas no primeiro ano do Doutorado e pela qualidade dos dados e textos gerados.

Agradeço ao Dr. Ronaldo Gonçalves Morato pelas reuniões profícuas no início do meu doutorado que ajudaram a delinear os objetivos desta pesquisa visando resolver problemas concretos, relacionados às demandas do manejo reprodutivo de felídeos ameaçados de extinção.

À Dona Raquel pelo seu sorriso, seu carisma e atenção diários.

Ao Edilson e toda a equipe da Pós-Graduação, que me apoiaram na esfera administrativa durante o Doutorado.

Aos guerreiros da conservação, que já lutaram e lutam para a proteção de nossas áreas naturais e nossas espécies ameaçadas de extinção em todo o mundo.

Aos pesquisadores Jacques Cousteau e James Lovelock pelas pesquisas espetaculares que realizaram, por suas fantásticas descobertas e por inspirarem muitas gerações a mudarem sua visão de mundo, e se fascinarem pela natureza.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Pág.

Tabela 1. Porcentagem de FOPAs isolados de ovários de gatas domésticas, viáveis, corados com pelas técnicas *trypan blue* (TBI) e vermelho neutro (VNI), mantidos sob refrigeração prolongada (controle, 24h e 72h). Média e desvio padrão ($\pm$ DP) (n=36, p<0,05) 34

Tabela 2. Número total de FOPAs viáveis inclusos em peças de 2 mm de córtex de ovários de gatas domésticas, corados com vermelho neutro mantidos sob refrigeração prolongada (controle, 24h e 72h). Médiana, (Percentil 25%(P25) - Percentil 75%(P75)). 36

Capítulo 3

Tabela 1. Número de FOPAs inclusos viáveis corados com vermelho neutro nos grupos controle, 24 e 72 horas, pré e pós-vitrificação, em amostras de mesmo tamanho (2 mm) de córtex ovariano de gata doméstica. (Média $\pm$ Desvio Padrão). 63

Tabela 2. Número de FOPAs inclusos viáveis marcados com vermelho neutro agrupados em pré e pós-vitrificação em amostras de mesmo tamanho (2mm) de córtex ovariano de gata doméstica (média $\pm$ desvio padrão) 66

Tabela 3. Total de FOPAs intactos (CFN) contados em amostras histológicas coradas com hematoxilina eosina em amostras de tecido cortical do mesmo tamanho (2mm) de córtex ovariano de gata doméstica. (Média $\pm$ Desvio Padrão). 67

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Pág.

Fig. 1. Fotomicrografia de folículos pré-antrais (FOPAs) isolados de ovários de gatas domésticas corados com vermelho neutro. A. FOPA do grupo controle (seta), aumento 400X. B. Detalhe de um FOPA (seta) isolado após refrigeração de 24h, aumento 400X. C. Detalhe de um FOPA (seta) isolado após 72h de refrigeração, aumento 400X. 34

Fig. 2. Fotomicrografia do tecido cortical contendo folículos pré-antrais (FOPAs) do ovário de gatas domésticas corados com o vermelho neutro. A. FOPAs (seta) do grupo controle em peça de 2 mm, aumento 100X. B. Detalhe do tecido cortical contendo FOPA (seta) após 24h de refrigeração, aumento 600X. C. Detalhe de tecido cortical contendo FOPA (seta) após 72h de refrigeração, aumento 400X 39

Fig. 3. Correlação polinomial do tipo 2 entre os resultados de viabilidade de FOPAs isolados e corados pelos corantes *tripan blue* e vermelho neutro. 35

Capítulo 3

Fig. 1. Desenho experimental ilustrando as etapas de análise inicial, vitrificação, reaquecimento e análise final de tecido cortical de 12 ovários de gatas domésticas 55

Fig. 2. Ilustração do posicionamento do tecido cortical ovariano vitrificado de gatas domésticas na palheta francesa e criotubo 57

Fig. 3. Fotomicrografia de amostras de tecido cortical ovariano de gatas domésticas corados com hematoxilina e eosina. A. Folículo primordial íntegro com núcleo (nc) após a vitrificação do grupo controle pré, aumento 800x. B. FOPAs com morfologia normal corados (seta vermelha) ou não (seta azul) com vermelho neutro do grupo 24h pós aumento 400X. C. FOPAs (setas pretas) agrupados do grupo 24h pós, aumento 400X. D. FOPA transicional grupo 72h pós com membrana nuclear intacta (seta preta pequena) e células da granulosa (seta preta grande) aumento 600X. 60

Fig. 4. *Box plot* representando a viabilidade de folículos pré-antrais inclusos no tecido cortical ovariano de gatas domésticas, em amostras de 2mm, antes e após a vitrificação, corados com vermelho neutro (mediana, percentis e *out layers*), n=12, $P<0,05$ 64

Fig. 5. Fotomicrografia de amostras de tecido cortical ovariano de gatas domésticas após a vitrificação (reaquecidos) contendo FOPAs corados com vermelho neutro. A. Visão total da peças de 2mm do grupo controle, aumento 200X. B. Visão parcial da peça de 2mm do grupo 24h, aumento 400X. C. Visão parcial da peça de 2mm do grupo 72h, aumento 400X 65

Fig. 6. *Box plot* do total de folículos pré-antrais íntegros (CFN) de gatas domésticas em peças de 2mm antes e após a vitrificação corados com hematoxilina e eosina (mediana, percentis e *out layers*). n=6, $P>0,05$ 68

Fig. 7. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais ovarianos de gatas domésticas. A. Cromatina condensada (seta verde), mitocôndrias íntegras com boa morfologia (seta azul) do grupo controle. A1. Retículo endoplasmático rugoso rodeado por mitocôndrias (seta vermelha),

das amostras do grupo controle. B. Retículo endoplasmático liso (REL) dilatado, mitocôndrias vacuolizadas (MitVac, setas verdes), das amostras do grupo 72h. C. Zona pelúcida (ZP) entre oócito (OO) e células da granulosa (CG), das amostras do grupo 24h. D. Membrana carioteca expandida (MCE), das amostras do grupo 24h

71

Fig. 8. Fotomicrografia eletrônica de transmissão de folículos primordiais de gatas domésticas. A. Grupo controle pré-vitrificação. B) Grupo controle pós-vitrificação. C. Grupo 24h pré-vitrificação. D. Grupo 24h pós-vitrificação. E. Grupo 72h pré-vitrificação. F. Grupo 72h pós-vitrificação

72

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - MANIPULAÇÃO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS (FOPAs) EM CARNIVOROS DOMÉSTICOS

	Pag.
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	
OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.	4
CARACTERIZAÇÃO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS	7
RECUPERAÇÃO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS	8
CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS.	11
ATIVAÇÃO E MATURAÇÃO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS	15
TECNICAS DE MONITORAMENTO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS.	16
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR/OOCITÁRIO <i>IN-VITRO</i>	17
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR/OOCITÁRIO <i>IN-VIVO</i>	20
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
OBJETIVO GERAL	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS	24

CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO EFEITO DA REFRIGERAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS DE GATAS USANDO VERMELHO NEUTRO

RESUMO	25
ABSTRAT	26

INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES.	42
AGRADECIMENTOS	42
REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO 3 - VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS NO CÓRTEX OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

RESUMO	48
ABSTRAT	49
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	53
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	72
AGRADECIMENTOS	77
REFERÊNCIAS	78

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS:	87

CAPÍTULO 1

MANIPULAÇÃO DE FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS (FOPAs) EM CARNIVOROS DOMÉSTICOS: REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO

A expressão Antropoceno, popularizada pelo químico holandês e ganhador do Prêmio Nobel de Química de 1995, Paul Crutzen, denota a chegada de uma nova era geológica ao planeta Terra. Esta nova era começou oficialmente em 2010 com cientistas reunidos em um encontro na Sociedade Geológica de Londres, mas o mundo já estava diante de um cenário de mudanças climáticas, exaustão dos recursos naturais e superpopulação humana produzindo um evento de extinção em massa causado pela “Idade do Homem”. Embora as estimativas prevejam diferentes extensões do impacto sobre o ambiente natural, todas são extremamente preocupantes. Algumas projeções indicam o risco de extinção de cerca de 58% de todas as formas de vida nos próximos 80 anos (DIRZO et al., 2014).

Em termos de sensibilidade das espécies às mudanças ambientais, uns dos grupos mais vulneráveis são os dos predadores. Felídeos e canídeos selvagens ocorrem em baixa densidade populacional, pois necessitam de grandes áreas para sobreviver e, adicionalmente, estão mais expostos a conflitos com humanos, como atropelamentos, caçadores e fazendeiros (BALLOU, 1992; WILDT et al., 1992).

Todas as 36 espécies de felídeos, a exceção do gato doméstico, e 9 espécies de canídeos, são citadas na lista vermelha da IUCN (2009) em diferentes graus de ameaça e vulnerabilidade. Com o aumento da população humana, novas áreas são degradadas para a ocupação e produção de alimentos, o que tem agravado continuamente a situação. O nível de urgência evidente está tornando as Técnicas de Reprodução Assistida (ART), uma importante ferramenta para proteger a variabilidade genética de espécies e populações. Neste contexto, a recuperação e a preservação de gametas e gônadas são importantes, por permitir o uso futuro de material genético proveniente de animais doentes ou mortos, tornando possível a reprodução independente do tempo e da distância.

Muitas espécies de carnívoros estão reduzidas a poucos indivíduos em cativeiro ou vida livre. Esta situação promove a erosão genética e conduz as espécies para a extinção (BALLOU, 1984; WILDT et al., 1995). Atualmente, independente do *habitat*, cativeiro ou vida livre, cada indivíduo vivo representa parte do *pool* genético remanescente da espécie. No caso das fêmeas, os ovários contêm uma importante reserva genética, os folículos primários e primordiais, os quais contêm oócitos imaturos, mas passíveis de serem utilizados para ARTs. Os oócitos de mamíferos desenvolvem-se a partir de poucas células germinativas primordiais. Estas células multiplicam-se em vários milhões de células durante a vida fetal, as quais, posteriormente, migram para as gônadas primitivas e mantêm-se em estado quiescente até o recrutamento folicular, ovulação e fertilização, para se tornarem um novo indivíduo (THIBAUT, 1977; DOWNS, 1993).

A maioria dos oócitos ovarianos permanece quiescente durante toda a vida reprodutiva da fêmea. Uma fêmea adulta de gato doméstico produz em média, um a quatro descendentes por gestação, e se reproduz duas vezes no ano, com número elevado de descendentes durante toda a vida. Nestas fêmeas, o início da reprodução pode coincidir com o primeiro cio, que pode ser tão precoce quanto 4 meses, embora normalmente ocorra entre 8 e 10 meses, ou quando o animal atinge 2,5 kg (JEMMETS e EVANS, 1977; POVEY, 1978). Já os grandes felídeos selvagens o número de descendentes por fêmea é reduzido, sendo que a reprodução ocorre a cada dois anos (HAYSEEN et al., 1993), na maioria da espécies. Exemplo disto é a *Panthera onca*, na qual o número de descendentes por gestação é em média dois (EIZIRIK et al., 2002; PILGRIM et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2009; CARRILLO et al., 2014) e a idade quando as fêmeas começam a se reproduzir é quatro anos, com a probabilidade de um filhote a cada ano (DESBIEZ et al., 2010). A sobrevida máxima desta espécie em vida livre é de 15 anos estimados por Ronaldo Morato (informação pessoal), assim a fêmea pode produzir, na melhor das hipóteses, durante toda sua vida, em média 10 filhotes.

Por outro lado, o *pool* de oócitos de uma fêmea jovem de felídeo selvagem, é composto por, aproximadamente, 12.500 folículos pré-antrais (JEWGENOW e STOLTE, 1996) e este número decresce à medida que a idade avança. Telfer e

Gosden (1987) estimaram uma quantidade próxima de 200.000 folículos primordiais no ovário de cadelas jovens entre um e dois anos, e cerca de 6.000 de folículos primordiais em cadelas idosas. Folículos pré-antrais (FOPAs) de gatas e cadelas representam por volta de 90 a 95% da população folicular (TELFER e GOSDEN, 1987; JEWGENOW e GORITZ, 1995; JEWGENOW et al., 1997; MACHADO et al., 2002). Os folículos primordiais podem ser colhidos e isolados dos ovários de felídeos e canídeos em grandes quantidades, sendo uma valiosa fonte de recursos para aplicação das ARTs. O desafio científico atual é o desenvolvimento de protocolos de ativação, desenvolvimento *in vitro* e maturação de folículos primordiais e primários (JEWGENOW, 1998). Outro aspecto importante que necessita ser aperfeiçoado é o transporte refrigerado seguro e a preservação a longo prazo através da congelação lenta (JEWGENOW et al., 1998a; JEWGENOW et al., 2011) e da vitrificação de FOPAs isolados ou inclusos em tecido cortical ovariano (LUVONI et al., 2012).

A implementação de crio-bancos de tecido cortical ovariano e a maturação *in vivo* de FOPAs foi desenvolvida com sucesso para aplicação em mulheres com câncer, em idade fértil, que prescindiam de tratamento com radioterapia ou quimioterapia. A criopreservação do tecido cortical, seguida de transplante tecidual ortotópico ou heterotópico pós tratamento oncológico, já permitiu o nascimento de algumas crianças na última década (ANDERSEN et al., 2008; KEROS et al., 2009).

Estudos em cães e gatos domésticos também têm permitido a utilização dessas técnicas, usando modelos experimentais intermediários, que são espécies pertencentes a mesma ordem (Carnívora) e famílias (*Canidae* e *Felidae*) de muitos animais ameaçados de extinção (WILDT, 1992; POPE et al., 1993; SWANSON e WILDT, 1997; BROWN, 2006; PUKAZHENTHI et al., 2006).

Em vista da escassez e da fragmentação de dados sobre folículos pré antrais de carnívoros, o objetivo desta revisão foi discutir o desenvolvimento folicular, técnicas utilizadas na colheita, criopreservação e maturação de folículos pré-antrais em carnívoros domésticos. Foram ressaltados exemplos em espécies selvagens de carnívoros mamíferos a fim de ilustrar que é possível a aplicação

destas técnicas no manejo genético de espécies e populações ameaçadas de extinção.

REVISÃO DE LITERATURA

Oogênese e Foliculogênese

A oogênese é o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais femininas, o qual culmina na formação do oócito haplóide (RUSSEL, 1983), que pode ser fertilizado após maturação. O desenvolvimento e diferenciação do oócito também dependem das células somáticas que circundam o oócito (Luvoni et al., 2006).

Em mamíferos a oogênese inicia-se quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada primitiva. Após a colonização da gônada, as células germinativas multiplicam-se rapidamente por mitose e se diferenciam em oogônias (ABIR et al., 2006). A formação do oócito primário tem início durante um período bem definido na gata doméstica, ocorrendo aproximadamente entre 40-50 dias de desenvolvimento fetal e, possivelmente, completa-se ao redor do 8^o dia após o nascimento. A morfologia ovariana típica, em região cortical e medular primitiva é totalmente estabelecida em torno de 40 dias de desenvolvimento fetal (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Após o nascimento muitos folículos entram em apoptose. Nos folículos restantes, os oócitos primários são circundados por uma única camada de células escamosas planas (pré-granulosa) as quais são originárias do mesonefro, ou epitélio ovariano (MCNATTY et al., 2000; JUENGEL et al., 2002). Estes folículos são denominados primordiais (KEZELE et al., 2002; SENGGER, 2003), são considerados reservatórios quiescentes dos oócitos e representam a maioria (95%) da população folicular ovariana de mamíferos adultos (MCLAUGHLIN e MCLVER, 2009). A transição entre folículo primordial e primário pode ser prolongada, e neste período os folículos são denominados transicionais (SILVA et al., 2004). Esta fase é caracterizada pelo crescimento do oócito, proliferação e alteração da morfologia das células da granulosa, de escamosas para forma

cuboide (SKINNER, 2005). Neste período é comum encontrar folículos com células da granulosa com ambos os formatos, o que é característico de folículo transicional (SKINNER, 2005). O próximo estágio de desenvolvimento é o folículo primário, que corresponde ao oócito circundado por uma monocamada de células da granulosa em formato cuboide (VAN DEN HURK et al., 1997; KEZELE e SKINNER, 2003). Este desenvolvimento é irreversível e não depende da secreção de gonadotrofinas (KEZELE e SKINNER, 2003).

Após a puberdade, os folículos primários começam a se diferenciar em secundários, os quais possuem duas ou mais camadas de células da granulosa. Neste estado, o oócito é circundado por uma fina camada translúcida denominada zona pelúcida e, externamente, a membrana basal folicular e as camadas da teca são distinguíveis (SENGER, 2003; VAN der HURK e ZHAO, 2005).

Seguindo o desenvolvimento folicular, forma-se uma cavidade interna, o antro, preenchido por líquido folicular. Nesta fase o folículo passa a ser denominado antral ou folículo terciário. A denominação de folículo de Graaf, ou pré-ovulatório, é usada para folículos terciários, que se tornam dominantes (SENGER, 2003). No grande folículo antral é possível identificar células da granulosa diferenciadas em células do *cumulus* e células murais, muitas camadas de células da teca, um grande espaço contendo fluido folicular e o oócito envolto na zona pelúcida (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). A formação dos folículos pré-ovulatórios é um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como a manutenção da fertilidade e gestação (DRUMMOND, 2006).

Durante a vida fértil do animal, haverá um constante crescimento de folículos dos estágios primordiais, passando pelos estágios primários, secundários e terciários, até o folículo pré-ovulatório ou de Graaf. Este processo contínuo de ativação do crescimento e maturação é definido como foliculogênese. De acordo com o estágio de desenvolvimento, os folículos podem ser classificados em pré-antral (sem cavidade antral) compreendendo primordial, transicional, primário e secundário; e folículos antrais (com cavidade antral) compreendendo os secundários tardios, terciários ou folículos pré-ovulatórios (SILVA et al., 2004). Nos cães domésticos, 5 a 14% dos folículos podem ser multi-oocitários, contendo

até 17 oócitos (TELFER e GOSDEN, 1987; MCDOUGALL et al., 1997; REYNAUD et al., 2009).

Já nas gatas, aproximadamente, 10% dos folículos contêm dois oócitos (JEWGENOW e GORITZ, 1995). A atresia folicular ocorre na maioria dos folículos (99,9% dos folículos em humanos), sendo caracterizada pela morte do folículo primário durante a meiose, por um processo de apoptose ou necrose degenerativa (VAN CRUCHTEN e VAN DEN BROECK, 2002).

Em gatos, durante a primeira divisão meiótica, o oócito permanece no estágio de diplóteno (SUH et al., 2002). Os FOPAs são constantemente recrutados para crescimento folicular, independente da fase do ciclo estral, idade ou gestação (PETERS et al., 1975). Os fatores responsáveis pela ativação e crescimento folicular são incertos (MCLAUGHLIN e MCIVER, 2009). Estudos morfométricos sugerem que estes folículos iniciam o crescimento baseado na ordem de sua formação (HIRSHFIELD, 1991) e os mecanismos de nutrição, como a proximidade com terminações nervosas, vasos, grandes folículos ou corpos lúteos são importantes neste recrutamento (GREENWALD e TERRANOVA, 1988).

O período de crescimento do estágio primordial até o antral pode durar três semanas em camundongos, mas requer mais de dois meses em outros mamíferos. Diariamente, um grupo de folículos primordiais é recrutado. As células da granulosa influenciam a maturação do oócito durante o desenvolvimento folicular. O contato físico e a comunicação entre as células germinativas e as células somáticas são imprescindíveis para sobrevivência e desenvolvimento do oócito. Junções do tipo GAP entre oócitos e células da granulosa transferem nutrientes e precursores metabólicos que contribuem para o desenvolvimento do gameta (GOUGEON, 1998).

O desenvolvimento folicular inicial é estimulado por interações entre fatores intra e extra ovarianos, mas não gonadotrofinas (EPPIG et al., 1996). O crescimento folicular começa a ser dependente da condição hormonal a partir do estágio de folículo pré-antral secundário tardio. Interações específicas entre gonadotrofinas, estrógenos e fatores de crescimento no compartimento celular de folículos em crescimento induzem a rápida proliferação das células da granulosa e

da teca, bem como a formação do antro, conduzindo à ovulação (FRITZ e SPEROFF, 1982; BARBIERI et al., 1983; KIM e GREENWALD, 1984; ROY e GREENWALD, 1990). Em canídeos, os oócitos são ovulados no estágio primário e terminam sua maturação após a ovulação, no ambiente específico de oviduto (REYNAUD et al., 2012). Determinar todos os fatores que contribuem para este prolongado período de crescimento e maturação permanece um desafio, mas é necessário para o estabelecimento de um sistema de desenvolvimento e maturação *in vitro* para FOPAs de carnívoros.

Caracterização de Folículos Pré-antrais

Em gatas domésticas foi possível recuperar entre 300 a 24.650 folículos primordiais e primários de cada ovário. Estes resultados não foram influenciados pela estação do ano, fase do ciclo estral ou gestação, apesar de ser considerada espécie de ciclo reprodutivo sazonal no hemisfério norte (JEWGENOW e GORITZ, 1995). Os folículos primordiais e primários (40 a 50 μm de diâmetro) representaram 80 a 90% do *pool* e 10 a 20% foram considerados folículos secundários (60 a 100 μm de diâmetro) (JEWGENOW e GORITZ, 1995). Através da microscopia eletrônica, Carrijo et al. (2010) encontraram proporções semelhantes de tipos foliculares nesta mesma espécie. A população folicular ovariana da gata foi de 37.853 ± 6.118 por ovário, dos quais 87% foram primordiais, 10,4% primários e 2,3% folículos secundários.

A morfologia dos oócitos de felídeos é similar à maioria das espécies de mamíferos (WASSERMANN, 1988). Em relação a folículos pré-antrais, quando se compara gatas domésticas e fêmeas de tigre e puma em nível ultraestrutural as semelhanças aumentam (JEWGENOW e STOLTE, 1996). Esta constatação confirmou o gato como um valioso modelo experimental para o desenvolvimento de ARTs voltadas para estudos de folículos pre-antrais de espécies selvagens de felídeos.

Assim como nas gatas domésticas, um número e proporções semelhantes de FOPAs recuperados foram descritos para fêmeas de felídeos não domésticos (puma, jaguar, tigre, cheetah e leão). Foi possível colher, em média, 12.500

FOPAs por ovário. Nestas espécies, a população folicular também era composta de 80 a 90% de folículos primordiais e primários (40 a 50 μm) e 10 a 20% (60 a 100 μm) de folículos secundários. Apesar dessas semelhanças há uma influência da idade e da espécie sobre o número de FOPAs, sendo observado um menor número de folículos/ovário em indivíduos de espécies grandes em idade mais avançada (JEWGENOW e STOLTE, 1996).

A morfologia folicular nas cadelas é variável de acordo com o estágio de desenvolvimento. Folículos primordiais apresentam diâmetro inferior ($25,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$), seguidos pelos primários ($59,0 \pm 3,8 \mu\text{m}$), secundários ($131,2 \pm 6,0 \mu\text{m}$), antrais iniciais ($229,8 \pm 11,1 \mu\text{m}$) e antrais ($492,0 \pm 42,0 \mu\text{m}$) (SONGSASEN et al., 2009). Os folículos pré-antrais representam 90 a 95% da população total de folículos nesta espécie (MACHADO et al., 2002). Em cadelas jovens (dois anos de idade) estima-se que existam 200.000 folículos primordiais e este número é reduzido para 6.000 em cadelas idosas, (TELFER e GOSDEN, 1987), embora cadelas pré-púberes também possam apresentar número reduzido de folículos viáveis (DURRANT et al., 1998; MACHADO et al., 2002).

Recuperação de Folículos Pré-antrais

O primeiro artigo a reportar a recuperação de FOPAs foi publicado nos anos 60 por Grob (1964) em camundongos. Somente 30 anos depois os folículos pré-antrais foram isolados e caracterizados nos ovários de animais domésticos, como bovino (JEWGENOW e PITRA, 1991, FIGUEIREDO et al., 1993), suínos (GREENWALD e MOOR, 1989) e carnívoros (JEWGENOW e PITRA, 1993, DURRANT et al., 1998).

O isolamento de FOPAs intactos do córtex ovariano é dificultado pelo denso tecido intersticial que envolve o folículo. Em ratos, o isolamento é realizado de forma mecânica com ou sem adição de enzimas proteolíticas, porém em animais de maior porte é necessário utilizar diferentes estratégias. A colheita por aspiração também pode ser uma alternativa (DURRANT et al., 1998). Dependendo do tamanho do ovário, densidade do tecido e relação entre células germinativas e

células somáticas, métodos mecânicos e enzimáticos podem ser necessários (TELFER et al., 2008).

A digestão enzimática é realizada utilizando enzimas como collagenase, tripsina, DNase e pronase. Embora esta técnica viabilize um adequado isolamento dos FOPAs, a membrana basal folicular pode ser danificada e, desta maneira, o desenvolvimento *in vitro* de folículos isolados pode ser comprometido (ROSSETO et al. 2011). Em canídeos, o isolamento e a caracterização de folículos obtidos pela digestão enzimática (DNase e collagenase) é capaz de recuperar maior número de FOPAs e antrais iniciais, quando comparada à colheita por aspiração, e quando associada ao isolamento mecânico pode proporcionar resultados ainda melhores (DURRANT et al., 1998). Bolamba et al. (1998) verificaram um reinício da divisão meiótica *in vitro* de oócitos colhidos por digestão enzimática. Já Demeestere et al. (2000) observaram a ruptura de todos os folículos isolados após a colheita por digestão enzimática. Para contornar os danos causados pela atividade enzimática na membrana basal nos FOPAs alguns estudos têm indicado o cultivo dos folículos isolados em gel de ágar ou colágeno para tentar preservar a estrutura tridimensional das células. (TORRANCE et al., 1989; HIRAO et al., 1994). Utilizando digestão com collagenase, Durrant et al. (1998) recuperaram em torno de $348,7 \pm 376,8$ folículos pré-antrais e folículos antrais iniciais em cadelas, sendo 25% viáveis e 20% com vesícula germinativa intacta.

Os métodos mecânicos incluem a colheita de FOPAs isolados ou inclusos no córtex ovariano. Para se recolher os FOPAs isolados, a filtragem em peneira metálica é o método mais utilizado. Porém, o fatiamento com lâmina de bisturi, *tissue choper* ou tesouras cirúrgicas, ou a trituração com *mixers* ou pequenas pinças podem ser indicados (ROSSETO et al., 2011).

A técnica de filtragem em peneira foi desenvolvida por Jewgenow e Pitra (1993) para colheita de FOPAs de gatas domésticas e, posteriormente aplicado para colheita de espécies selvagens (JEWGENOW e STOLTE, 1996). Esta técnica permite colher folículos primordiais, primários e secundários após a dissecação e isolamento. Com esta técnica, os FOPAs isolados permanecem

circundados por uma membrana basal intacta (JEWGENOW e GORITZ, 1995; JEWGENOW, 1998; JEWGENOW et al., 1998). A porcentagem de folículos saudáveis medindo 40 a 90 μm , recuperáveis pelo sistema de filtragem em peneiras, corresponde em média a 32,5% do total de folículos primordiais e primários, 13,1% são folículos com alterações morfológicas e 50% são folículos atrésicos (JEWGENOW e GORITZ, 1995; JEWGENOW et al., 1998).

A técnica de filtragem em peneira consiste em pressionar cuidadosamente o ovário sobre uma peneira metálica em tampão fosfato salina de Dulbecco (DPBS), o que resulta numa suspensão de células que deve ser filtrada através de uma série de peneiras de *nylon*. Primeiramente, a suspensão é filtrada em peneira com poros de 90 μm , sobre uma placa de Petri. A suspensão filtrada é recuperada e os folículos maiores que 90 μm podem ser utilizados ou descartados (JEWGENOW et al., 1998). Posteriormente a suspensão é filtrada em peneira de 40 μm , e os FOPAs, entre 40 e 90 μm (folículos primordiais, transicionais, primários e secundários iniciais) retidos na peneira são recuperados (JEWGENOW et al., 1998; JEWGENOW AND GORITZ, 1995). A suspensão, contendo os FOPAs deve ser centrifugada a 200G durante 10 minutos e o *pellet* ressuspendido em meio adequado. Os folículos recuperados podem ser utilizados para maturação, caracterização, criopreservação ou outros estudos e aplicações.

O *tissue choper*, ou fatiador de tecido, também tem sido usado em alguns experimentos. A porcentagem de folículos viáveis coletados nesta técnica pode estar relacionada ao método de preparação do tecido ovariano. Lopes et al. (2009) reportaram 79% a 83% de viabilidade para os folículos pré-antrais de cadelas. Alves (2010) usando a mesma técnica (*tissue chopper*), encontraram 37,86% e 60,31% de FOPAs recobertos por células da granulosa, e 48,72% e 74,55% FOPAs viáveis, nos intervalos de 250 e 500 μm , respectivamente. Foram contados 25.200 ± 6.676 folículos pré-antrais por ovário no intervalo de corte de 250 μm , e 11.000 ± 2.727 no intervalo de 500 μm . Ademais, também existiu uma maior viabilidade e cobertura por células da granulosa no intervalo de corte de 500 μm (Alves, 2010).

Outra técnica bastante difundida para recuperação de FOPAs inclusos na matriz cortical do ovário é a dissecação do tecido cortical (WIEDEMANN et al. 2013). O processo consiste em dividir o ovário em duas metades, no sentido longitudinal. Em seguida, utilizando pinças e bisturi, suavemente remove-se a porção medular por raspagem, até que reste uma fina porção cortical transparente (200 μ m). O tamanho dos fragmentos varia de acordo com o tipo de procedimento a ser realizado. Se o material for utilizado para cultivo, criopreservação lenta ou coloração, o córtex pode ser seccionado com o *punch*, em fragmentos de 2 mm de diâmetro. Se o material for utilizado para vitrificação, a peça do córtex deve ser seccionada em fragmentos de 2 cm² usando uma lâmina de bisturi.

Criopreservação de Folículos Pré-antrais

Bancos genéticos ou “zoológicos congelados” foram recomendados como parte crucial da estratégia de conservação de espécies (WILDT et al., 1992). Além de congelar gametas masculinos, novas técnicas têm permitido a criopreservação de FOPAs isolados ou inclusos no tecido cortical ovariano de espécies ameaçadas. A conservação desse material objetiva manter por longo prazo a diversidade genética, especialmente a manutenção de indivíduos geneticamente importantes que foram esterilizados, eutanasiados (JEWGENOW, 1998) ou de animais convalescentes ou mortos prematuramente (LUVONI et al., 2006).

As técnicas de criopreservação aplicadas à conservação de gametas e tecidos gonadais de fêmeas incluem refrigeração (colheita e transporte), congelação lenta (curva de congelação programada) e vitrificação (congelação ultra-rápida).

A refrigeração a 4°C, com vistas à preservação e transporte, é uma ferramenta de conservação muito importante para transpor a distância entre os locais de coleta da gônada e os laboratórios de reprodução assistida. Embora seja uma técnica muito positiva pode ter impactos negativos sobre o tecido. Em gatas, a conservação dos ovários inteiros em solução fisiológica manteve a morfologia oocitária, quando o tecido foi preservado por até 48 horas a 4°C (WOOD et al., 1997). Além disso, a integridade dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro*

durante uma semana, depende basicamente de como foi do período de estocagem a 4°C até 12 horas; entre 12 e 24 horas de refrigeração, não foram observadas alterações na viabilidade dos FOPAs. Nesta espécie, o número de folículos isolados saudáveis estimados que podem ser recuperados após a refrigeração a 4°C por <12h, foi de 150 FOPAs (JEWGENOW et al., 1998).

O fator que mais influencia o sucesso da congelação dos FOPAs é a razão entre área de superfície celular e volume. Embriões e oócitos maduros são formados por células grandes e requerem períodos longos de tempo para estabelecer um balanço osmótico com as soluções crioprotetoras (CRISTER et al., 1997). FOPAs são células muito pequenas, porém muito mais resistentes aos danos causados pelo frio, por apresentarem membrana basal fina, facilitando a entrada dos crioprotetores, metabolismo basal baixo, ausência de eixo metafásico e grânulos corticais (HOVATTA, 2005).

A criopreservação do tecido ovariano contendo FOPAs oferece vantagens sobre a congelação de oócitos maduros ou embriões. Além disso, o tecido ovariano poder ser colhido de animais de todas as idades (idosos, adultos, pré-púberes e fetos) ou *status* (vivo ou morto). Porém, é importante enfatizar que a criopreservação de tecidos é tecnicamente mais complexa e depende não somente da criotolerância e sensibilidade dos gametas, mas também das características das células somáticas ovarianas (CLEARY et al., 2001). Neste sentido, as interações entre as células somáticas e os gametas devem ser preservadas de modo a manter a integridade funcional do folículo após a descongelação (LUVONI, 2006).

Os métodos de congelação lenta são baseados nos protocolos já desenvolvidos para embriões, ajustados com base na metodologia previamente descrita por Willadsen (1978). Desde então, amostras biológicas de humanos e animais têm sido congeladas com sucesso com equipamentos pré-programados, com diferentes velocidades de queda controlada da temperatura, durante o processo de congelação. Utilizando este processo evita-se, ou minimiza-se, a formação de cristais de gelo. A curva de congelação deve ser lenta o suficiente

para favorecer a saída de toda a água das células durante o processo de congelação.

A taxa ótima de congelação difere de acordo com o tipo celular, o que é influenciado pelo tamanho da célula e está relacionada à permeabilidade à água. A velocidade de congelação mais apropriada para a maioria das células de mamíferos oscila entre -0,2 a -0,5°C por minuto, embora a taxa ótima para cada tipo celular e espécie animal necessite ser estabelecida (JEWGENOW et al., 2011).

Em gatas, a congelação de FOPAs, em meio contendo 3M de dimetil sulfóxido (DMSO), observou-se uma preservação da viabilidade de 40% das estruturas, quando comparada a viabilidade anterior à congelação ($12,1\% \pm 14,7$ versus $29,1\% \pm 14,2$, respectivamente) (JEWGENOW e GORITZ, 1995).

Em amostras pré-expostas ao glicerol, embora a queda imediata tenha sido maior, a perda de viabilidade foi menor (15%) após uma semana de cultivo, quando comparado ao DMSO, propadiol ou etilenoglicol. A qualidade dos FOPAs também influencia a qualidade pós-criopreservação, sendo que quanto melhor a qualidade folicular, maior a resistência à criopreservação (JEWGENOW et al., 1998).

A congelação lenta de FOPAs de gatas com propanodiol e DMSO como crioprotetores, preservou 10% dos FOPAs intactos e metabolicamente ativos, mesmo após uma semana de cultivo (JEWGENOW et al., 1998). Quando o tecido cortical de gatas foi congelado lentamente, utilizando-se 1,5M de etilenoglicol como crioprotetor, seguido de xenotransplante em ratas receptoras imunossuprimidas, a viabilidade manteve-se em 10%, mesmo após 62 dias pós-enxerto. A baixa taxa de sobrevivência foi associada aos efeitos isquêmicos durante a fase inicial de implantação no tecido hospedeiro (BOSCH et al., 2004).

A criopreservação de tecido ovariano de gatas, utilizando-se a congelação lenta e dois crioprotetores demonstraram que 58% dos FOPAs, após a descongelação, estavam viáveis, sendo que os resultados foram superiores quando 1,5M de etilenoglicol foi utilizado, comparado ao glicerol (LIMA et al., 2006). Resultados semelhantes foram obtidos em leas, tigras e em mais sete

diferentes espécies de felídeos selvagens, utilizando-se a mesma concentração de etilenoglicol e curva de congelação (WIEDEMANN et al., 2012; 2013).

O método de congelação lenta de tecido ovariano de felídeos parece já estar bem estabelecido, baseado nos recentes resultados obtidos por Jewgenow et al., (2011) e Wiedemann et al. (2013). Os protocolos base de preparação para criopreservação de córtex ovariano de felídeos domésticos e selvagens aplicam o método previamente descrito por Bosch et al., (2004) e replicado e discutidos por Smitz et al., (2010) ou adaptados de métodos aplicados para ovários humanos, Andersen et al., (2008).

A vitrificação, outro método de criopreservação, é considerada uma técnica mais simples e barata, na qual as amostras são imersas diretamente no nitrogênio líquido e a preservação da amostra se dá de modo ultra-rápido (JEWGENOW et al., 2011). Nestas condições a formação de cristais de gelo é inibida pela produção de um estado vítreo sólido, tanto no meio extracelular, quanto no intracelular (RALL e FAHY, 1985). A vitrificação do tecido ovariano já foi aplicada com sucesso em ovinos (SANTOS et al., 2007), bovinos (CELLESTINO et al., 2010), bem como em ratos (WANG et al., 2008), humanos (HUANG et al., 2008; KEROS et al. 2009), gatas (LUVONI et al., 2012) e cadelas (ISHIJIMA et al., 2006).

Evidências morfológicas, determinadas por exame histológico, indicam que a técnica de vitrificação pode ser aplicada para congelação de tecido ovariano de gatas. Num estudo recente, folículos pré-antrais de gatas foram vitrificados. A solução crioprotetora era composta por 2M de DMSO, 1M de acetamida e 3M de propilenoglicol (denominada solução DAP 213). Apesar de algum sucesso, os autores sugerem que a técnica de vitrificação necessita ser aperfeiçoada, para que ela um dia possa ser aplicada na rotina de criopreservação de córtex de felídeos (LUVONI et al., 2012) para formar crio-bancos de tecidos.

Recentemente, Martins et al. (2015) combinaram diferentes tempos de estocagem ovariana a 4°C (0 a 6 horas, 24 horas e 72 horas) em DPBS, com o protocolo de vitrificação descrito por Keros et al. (2009), que utilizaram etilenoglicol, propanodiol, DMSO e polivinilpivolidona (PVP) numa concentração

final de 40% de crioprotetores. Estes autores encontraram FOPAs viáveis, marcados pelo vermelho neutro e corados para análise morfológica, após 72 horas de refrigeração seguida de vitrificação. Não foram observados impactos da vitrificação na sobrevivência de FOPAs, independente do tempo de estocagem.

A viabilidade dos FOPAs em cadelas após a criopreservação varia de acordo com o método de congelação e o crioprotetor utilizados. Os principais crioprotetores utilizados são o dimetil-sulfóxido (DMSO), o etilenoglicol e o glicerol. Um estudo avaliou o efeito da pré-exposição de glicerol e etilenoglicol sobre o sucesso da criopreservação de FOPAs de cadelas. Na pré-congelação foi observada uma maior citotoxicidade do glicerol a 3M (28,5% de FOPAs viáveis) e menor de etilenoglicol a 1,5M (51,2% de FOPAs viáveis), contudo estes valores são significativamente inferiores à viabilidade das amostras antes da pré-exposição aos crioprotetores (63,2%). O etilenoglicol 3M apresentou os melhores resultados pós-descongelação (28% de FOPAs viáveis). Este experimento usou iodeto de propídio para analisar a viabilidade celular (ALVES, 2010).

Em cães, a vitrificação preserva a integridade tecidual avaliada por histologia, quando comparada às amostras frescas e pode ser utilizada para a criopreservação de tecido ovariano em solução DAP 213. Foi observada uma taxa de 85% de sucesso dos enxertos teciduais. Porém, também foram observados efeitos da hipóxia tecidual após o xenotransplante. Apesar de não ter sido observado nenhum folículo antral, foi observada a proliferação das células da granulosa, o que é indicativo de preservação de funções endócrinas e do potencial de ovulação destes folículos (ISHIJIMA et al., 2006).

Ativação e Maturação de Folículos Pré-antrais

A ativação e maturação de FOPAs *in vitro* requerem um prévio entendimento de como isto ocorre na escala intra-ovariana, especialmente no que diz respeito à fisiologia e às particularidades da foliculogênese das espécies (LILLY et al., 2009; COMMIZOLI et al., 2011, 2014).

Após a colheita e a criopreservação de córtex ovariano ou de FOPAs isolados, é necessária a maturação e ativação folicular para induzir o crescimento

de folículos pré-antrais até os estágios mais avançados de maturidade, para que possa ser possível integrá-los a outras estratégias de reprodução assistida. Até o momento a ativação e total maturação *in vitro* de FOPA seguida do nascimento de filhotes saudáveis foi descrita apenas em camundongos (EPPIG et al., 1996; MOTOHASHI et al., 2011). Contudo, este fato pode ser justificado pelo longo período requerido de desenvolvimento dos FOPAs até os estádios finais de maturação, que na maioria dos mamíferos envolve mais de dois meses, e que é necessário simular *in vitro*. Durante este período prolongado, seria necessário simular todas as condições fisiológicas *in vitro*. Apesar disto, o xenotransplante de tecido cortical ovariano (desenvolvimento *in vivo*) em animais imunossuprimidos, pode ser uma opção para promover a maturação folicular, a qual já foi demonstrada em algumas espécies, como elefantes, ovelhas, cadelas e felídeos (GUNASENA et al., 1998; OKTAY et al., 1998; BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007; WIEDEMANN et al., 2013).

Técnicas para Monitoramento de Viabilidade de Folículos Pré-antrais

Durante e após o cultivo folicular é possível avaliar a integridade das células, baseando-se nas suas características morfológicas (FIGUEIREDO et al., 1994), viabilidade folicular (JEWGENOW e PITRA, 1996), bem como no aumento do diâmetro e conteúdo de DNA dos folículos cultivados (NUTTINGK et al., 1993). Em pequenos FOPAs, a sobrevivência das células da granulosa e dos oócitos (JEWGENOW e PITRA, 1993; VAN DER HURK et al., 1997) são úteis para monitorar condições de cultura. Adicionalmente, a coloração destas células com marcadores de viabilidade como Tripan Blue, Hoechst 33258 e a incorporação de BrdU durante a cultura, pode refletir a atividade de proliferação das células da granulosa e viabilidade do oócito. Usando a hematoxilina/eosina é possível observar em detalhes a morfologia celular. O uso de imunohistoquímica para monitorar expressão de PCNA foi utilizado por Bosch et al (2004) e Caspase 3 e integridade de DNA por Martins et al (dados não publicados). A microscopia eletrônica auxilia nas análises ultra-estruturais e avaliações sub-celulares (JEWGENOW, 1998; CARRIJO et al., 2010). O iodeto de propídio, um corante

supra-vital, auxilia na observação da integridade da membrana celular (Alves (2010) e o corante vermelho neutro é capaz de marcar as células corticais ovarianas vivas, sem alterar a viabilidade celular (MARTINS et al., 2014).

Desenvolvimento folicular/oocitário *in vitro*

O crescimento *in vitro* de FOPAs tem sido mais estudado em camundongos (EPPIG, 1977), *hamster* e ratos (DANIEL et al., 1989; ROY e GREEWALD, 1990). Apesar disto, pouco se conhece a respeito dos fatores envolvidos na ativação inicial e crescimento dos folículos primordiais, principalmente as questões relacionadas às diferenças entre as espécies quanto ao requerimento hormonal *in vitro*. Em diferentes espécies de mamíferos, diferentes protocolos e conceitos podem ser necessários para que seja possível o desenvolvimento folicular de longo prazo. Para isto é necessário conhecer os requerimentos dos folículos e oócitos durante o crescimento (TELFER et al., 2008). Enzimas e fatores de crescimento desempenham um papel importante na ativação e maturação dos FOPAs, entre estes a proteína morfogenética óssea (BMP-15), o *knockout serum replacement* (KSR), o kit ligante (KL) e o fator de crescimento fibroblástico (FGFs) (HORII et al., 2003; JUENGEL et al., 2004; SONGSASEN et al., 2009), contudo ainda é escasso o conhecimento bioquímico específico nas diferentes espécies, inclusive felinos.

Recentemente Luz et al. (2012) reportaram a produção de um embrião de oito células a partir de FOPAs (secundários iniciais) de ovelhas. Os folículos foram cultivados separadamente num sistema 3D e após três semanas o oócito foi isolado, maturado e fertilizado.

Apesar desta descrição, Jewgenow e Pitra, em 1993 já mencionavam o desenvolvimento *in vitro* de oócitos secundários de gatas, em meio de cultivo suplementado com hormônios, embora nenhum sucesso foi obtido na produção de embriões. Neste estudo, foram encontrados padrões meióticos intactos em cerca de 65% da população de oócitos investigados; quebra de vesícula germinativa em 15%, com extrusão do primeiro corpúsculo polar. A adição de hipoxantina ao meio

de cultivo preveniu a quebra da vesícula germinativa, o que foi útil para preservar o estágio nuclear dos oócitos em crescimento.

O meio de cultivo e a adição de fatores de crescimento podem auxiliar na maturação *in vitro* de FOPAs. Jewgenow e Goritz (1995) estudaram o desenvolvimento de FOPAs *in vitro* por curtos períodos, utilizando diferentes meios de cultivo. A viabilidade folicular, imediatamente após o isolamento, foi de 32,5%. Após uma semana de cultivo, a viabilidade folicular variou dependendo do meio de cultura. Em monocamada a viabilidade foi de 37,5%, em gel de colágeno 30,8%, em meio condicionado 9,3% e em agarose foi de 17,9%. Crescimento de mais de 10 µm foi observado em aproximadamente 65% dos folículos (variando de 61,3% a 68,6%) dependendo das condições de cultivo. Após uma semana de cultivo, mais de 48% dos folículos estavam parcialmente ou completamente desprovidos das células da granulosa. A perda de células da granulosa circundando os oócitos e o índice de atresia folicular foram parcialmente controlados utilizando meios com a adição de fatores de crescimento como EGF (*epidermal growth factor*) e ITS (*insulin-transferrin-selenite*). No grupo controle, após uma semana de cultivo, somente 22% dos oócitos intra-foliculares apresentaram vesícula germinativa intacta, enquanto que os cultivados com adição de EGF tinham 33% e os cultivados com ITS, 57%.

Em cultivos por períodos prolongados, meios menos complexos devem ser utilizados, apesar da necessidade de suplementação com fatores de crescimento. Jewgenow (1998) encontrou cerca de 30% de folículos de gatas morfolologicamente íntegros após cultivo de 10 dias, porém demonstrou o efeito supressivo do piruvato e lactato de sódio sobre a síntese de DNA em FOPAs. Também foram observados efeitos positivos do meio Dubelco MEM (DMEM), contendo albumina sérica bovina para sustentar a integridade estrutural dos FOPAs durante o período de maturação.

Efeitos positivos sobre o desenvolvimento e esteroidogênese de folículos secundários de gatas cultivados *in vitro* são observados quando o meio de cultivo é elaborado com fibras de hidroalginato (colóide), com formação de cavidade antral em 50% das estruturas (COMIZZOLI et al., 2011). Meios contendo proteínas

ou aminoácidos não são essenciais para o cultivo e maturação *in vitro* de FOPAs desta espécie e sistemas contendo gel de agarose são promotores de sobrevivência folicular, provavelmente devido a melhor performance na absorção de oxigênio (FUJIHARA et al., 2012). Weidmann et al (2013) observaram um efeito negativo da Vitamina C e um efeito positivo do BSA em meios de cultivo, sobre a viabilidade de folículos pre-antrais de gata doméstica e leopardo.

O desenvolvimento oocitário *in vitro* de FOPAs de cães permanece sendo um desafio, em vista das diferenças do ciclo estral e maturação folicular *in vivo*. Apesar disto, Bolamba et al. (1998) concluíram que todo folículo pré-antral tardio e antral inicial (diâmetro entre 152 a 886 μm) são competentes para reiniciar a meiose até o estágio de metáfase I e II. Ademais, observaram a maturação dos folículos até o estágio secundário (com multicamadas de células da granulosa intactas) com 11,5 % em metáfase I e II após 48 horas de cultivo. Neste estudo, o meio utilizado foi gel de agarose 3D, acrescido de FSH e estradiol.

Em cadelas, meio contendo fibras de hidroalginato e FSH também apresenta efeitos positivos sobre o incremento da esteroidogênese *in vitro* (SONGSASEN et al., 2012). A incorporação de LH ao meio de cultivo também acelerou o crescimento e a produção de esteroides *in vitro* em folículos cultivados na ausência de FSH (NAGASHIMA et al., 2010) nesta espécie. Pelos resultados destes diferentes estudos, parece não haver benefícios na combinação de ambas gonadotrofinas *in vitro* em sistemas de cultivo. Em espécies não domésticas de canídeos (lobo Guará, *Chrysocyon brachyurus*), o cultivo de FOPAs utilizando meios descritos para cães domésticos preservou a viabilidade de aproximadamente 30% das estruturas após nove dias de cultura (SONGANSEM et al., 2012).

FOPAs inclusos em tecido cortical ovariano de cadelas são mais susceptíveis à degeneração do que os das gatas. Contudo, também não são necessários meios suplementados com proteínas para o cultivo de folículos de cadelas (FUJIHARA et al., 2012). Os efeitos adversos da alta concentração de soro homólogo (10%), o qual é considerado uma fonte de suplementação proteica, sobre a sobrevivência dos FOPAs e antrais iniciais pode estar associada com a

presença de fatores inibidores de proliferação no soro. No entanto, FOPAs tardios cultivados com 1% e 3% de soro canino foram competentes na preservação das características morfológicas consideradas normais para a espécie após oito dias de cultivo *in vitro*. Trinta dias após o início do cultivo folicular, todos os oócitos recuperados apresentavam-se pálidos e desnudos de células do *cumulus* (SONGSANSEN et al. 2012).

Desenvolvimento folicular/oocitário *in vivo*

Para se criar as condições de crescimento de FOPAs inclusos no córtex ovariano *in vivo*, é necessário o uso de hospedeiros imunossuprimidos para o enxerto tecidual. Camundongos SCID e NOD/SCID são os modelos mais usados para o xenotransplante ovariano. No xenotransplante o tecido cortical ovariano é enxertado sob a cápsula renal ou no tecido subcutâneo da pele do camundongo (BOSCH et al., 2004; WIEDEMANN et al., 2013).

O camundongo SCID tem uma mutação no cromossomo 16, a qual é responsável por uma imunodeficiência severa, marcada pela agamaglobulinemia e ausência de linfócitos B e T maduros, proporcionando tolerância ao xenotransplante tecidual (BOSMA et al., 1983; 1989). Os camundongos SCID podem permanecer saudáveis por mais de dois anos caso sejam criados em condições adequadas com as barreiras sanitárias recomendadas. Este período é suficientemente longo para o pleno desenvolvimento folicular em todas as espécies. Apesar da imunossupressão destes animais, os enxertos podem induzir a produção de IgG detectável e a destruição tecidual (SANDHU et al., 1996).

O crescimento folicular é induzido por gonadotrofinas endógenas ou suplementado com FSH e LH exógeno em receptores castrados. Camundongos machos, não obesos, diabéticos e com severa imunodeficiência (NOD/SCID), tratados com gonadotrofinas podem ser outra opção de hospedeiro para favorecer o desenvolvimento folicular após o xenotransplante (WEISSMAN et al., 1999). Este modelo pode ser mais sustentável para xenotransplante por ter um bloqueio imunológico mais completo, em vista da deficiência de linfócitos T e B, ausência da atividade de macrófagos e do sistema complemento (ISHIJIMA et al., 2006).

A sobrevivência dos oócitos em hospedeiros, bem como a indução do seu crescimento já foi reportada numa grande variedade de espécies, incluindo cabras (GOSDEN et al., 1994), saguis (CANDY et al., 1995), elefantes (GUNASENA et al., 1998), marsupiais (WOLKEKAMP et al., 2001; MATTISKE et al., 2002), vacas (SENBON et al., 2003; HERNANDEY-FONSECA et al., 2005), gatas (GOSDEN et al., 1994; BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007;), leoas (WIEDEMANN et al., 2012), cadelas (METCALFE et al., 2001; ISHIJIMA et al., 2006) e mulheres (OKTAY et al., 1998).

Os folículos encontrados em xeno-enxertos representam uma porcentagem limitada do total de folículos, em torno de 30%. Aparentemente, a maioria dos folículos falha em sobreviver nas primeiras 48 horas após o enxerto, em função da hipóxia ocorrida antes que se estabeleça a revascularização, causando perda de aproximadamente 50% dos FOPAs do tecido cortical transplantado (DISSEN et al., 1994). Este problema pode ser minimizado utilizando técnicas de anastomose de vasos sanguíneos, a fim de reduzir o período de isquemia de um ou mais dias para alguns minutos. Contudo este procedimento é inviável para técnicos inexperientes e menos versátil que um simples implante. Desta maneira a sobrevivência dos folículos depende da velocidade da angiogênese do tecido transplantado (WEISSMAN et al., 1999).

Durante o xenotransplante, a sobrevivência dos folículos também pode ser prejudicada pelas condições corporais do receptor (temperatura, pH e reações imunológicas). Assim, o hospedeiro deve estar no mínimo saudável, sem alterações clínicas evidentes, a fim de diminuir as chances de rejeição e destruição do tecido (BRITT, 1991).

A criopreservação é uma prática normalmente utilizada em combinação com o transplante de tecido ovariano, e é responsável por uma adicional redução do número de folículos do enxerto (CANDY et al., 1995). Apesar disto, tanto tecido ovariano fresco de gatas (GOSDEN et al., 1994), assim como o descongelado (BOSCH et al., 2004) foram transplantados para camundongos imunossuprimidos com evidências de desenvolvimento folicular de estádios inicial ao avançado. Adicionalmente, folículos antrais presentes no xeno-enxerto permaneceram aptos

a responder à administração exógena de gonadotrofina com luteinização das células da granulosa e da teca.

Fassbender et al. (2007) monitoraram o crescimento folicular de tecido transplantado de gatas em hospedeiros imunodeficientes com repetidas análises de ultrassonografia transcutânea. Eles conseguiram puncionar folículos antrais e obter oócitos de gatas totalmente desenvolvidos, 19 semanas após o xenotransplante. Wiedemann et al. (2012) transplantaram córtex ovariano de leas em camundongos imunodeficientes e observaram a sobrevivência do tecido e o crescimento folicular inicial, quatro semanas após o xenotransplante.

Em cães, a primeira citação data de 1899, por McCone o qual realizou um alo transplante de tecido ovariano canino para o ligamento largo de outra cadela, resultando em gestação. Posteriormente, Metcalfe et al. (2001) realizaram xenoenxerto de tecido ovariano de cadela na cápsula renal de camundongos SCID. Cinquenta e seis dias após o transplante, o tecido foi removido e embora houvesse folículos primordiais íntegros e viáveis, não observaram formação antral nos folículos. Resultados semelhantes foram obtidos por Ishijima et al. (2006) após o xenotransplante para a *bursa* ovariana de camundongos NOD/SCID de tecido ovariano vitrificado de cadelas. Neste estudo, quatro semanas após o transplante, o tecido foi recuperado de todos os camundongos, porém não havia a formação de folículos antrais, apenas a proliferação de células da granulosa, indicando o restabelecimento da função endócrina.

A revascularização do tecido transplantado ocorre num prazo de 48 horas (DISSEN et al., 1994), o que pode ser considerado tardio para manter a viabilidade da maioria dos folículos. Com o objetivo de acelerar o processo de angiogênese, Commin et al. (2012) utilizaram eritropoietina no tecido ovariano de cadelas xenotransplantado para camundongos SCID, após a descongelação de fragmentos ovarianos. Apesar dos efeitos da eritropoietina sobre a angiogênese, não houve redução da perda folicular após o transplante no grupo tratado.

Consideração Final

Tendo como base as informações disponíveis na presente revisão, podemos inferir que ainda hoje, a despeito dos conhecimentos adquiridos, existem muitas dificuldades, principalmente no que tange as estratégias de conservação de germoplasma feminino. A necessidade de um protocolo de criopreservação de tecido ovariano em condições de campo com resultados satisfatórios ainda não é uma realidade. As técnicas de monitoramento de viabilidade folicular apesar de descritas carecem de resultados seguros e fidedignos, portanto, é necessário avançar nos estudos *in vitro* de modo que os protocolos sejam eficientes em recrutar, ativar e maturar folículos pré-antrais, a partir da reserva oocitária de FOPAs primordiais e primários. Só desta maneira viabilizaríamos o uso dos recursos genéticos para o manejo reprodutivo de espécies e populações ameaçadas de extinção.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o impacto da refrigeração seguida da vitrificação de tecido ovariano sobre a viabilidade dos folículos pré-antrais (FOPAs) de felinos domésticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar os efeitos da refrigeração a 5°C nos tempos de 0, 24 e 72 horas sobre a viabilidade de folículos pre-antrais isolados e inclusos de gatas domésticas usando o corante supra vital vermelho neutro (VN) e *trypan blue* (TB).
2. Avaliar a viabilidade de folículos pre-antrais inclusos no córtex ovariano de gatas domésticas após refrigeração prolongada (0, 24 e 72 horas) seguida de vitrificação.

CAPÍTULO 2

Trabalho a ser enviado para a revista Theriogenology

ESTUDO DO EFEITO DA REFRIGERAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DE

FOLICULOS PRÉ-ANTRAIS DE GATAS DOMÉSTICAS USANDO O CORANTE

VERMELHO NEUTRO

RESUMO

Folículo pré-antral (FOPA) é um material valioso e deve ser preservado quando se institui um programa de banco genético para espécies ameaçadas de extinção. O Vermelho Neutro (VN) é um biomarcador barato e foi usado durante décadas em células para estudos toxicológicos na indústria e pesquisa. No entanto o VN ainda não é validado para acessar a viabilidade de FOPAs de gata. O corante TB em contraste foi já estabelecido para a avaliação da viabilidade dos FOPAs isolados de gata. O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de FOPAS de gatas isolados e/ou inseridos no córtex ovariano em diferentes momentos após refrigeração por intermédio da coloração com VN e TB. A coleta de FOPAs isolados foi realizada através de filtração em peneiras e as amostras de FOPAs inclusos no córtex ovariano foram coletadas pela dissecação ovariana. Ambas as metodologias foram realizadas conforme protocolos previamente estabelecidos para a espécie por Jewgenow e Goritz (1995) e Jewgenow et al. (2011). Os FOPAs isolados foram corados em DPBS e VN (40:1 v/v) e DPBS com TB(10:1 v/v); os FOPAs incluso por meio de lavagem e VN (40:1 v/v). Para FOPAs isolados resultados indicam resultados semelhantes para ambos os corantes VN e TB. Foi observada diferença significativa entre controle e 72h e entre 24h. Observou-se

25 uma correlação moderada ($r^2=0,53$, $P=0,0073$) entre os resultados das colorações
26 TB e V N nos grupos isolados. Não houve diferença significativa sobre a
27 viabilidade de FOPAs inserido no córtex em nenhum dos tempos de refrigeração.
28 Os resultados de viabilidade de FOPAs incluídos mostram uma variabilidade
29 grande entre os grupos examinados, o que pode ser decorrente de uma grande
30 variação individual. Os resultados demonstram que o VN pode ser utilizado como
31 um biomarcador de viabilidade de FOPAs de gatas domésticas.

32 **Palavras Chave:** folículo pré-antral, gata, vermelho neutro, viabilidade,
33 refrigeração

34

35 **ABSTRACT**

36 Pre-antral follicle (PAF) is a valuable material and should be preserved when
37 introducing a gene bank program for endangered species. The Neutral Red (VN) is
38 an cheap biomarker and has been used for decades in cells for toxicology studies
39 in industry and research. However, the VN is not validated to access the feasibility
40 of cat PAFs. The dye BD in contrast already was established for assessing the
41 viability of the isolated cat PAF s. The aim of this study was evaluated the viability
42 of isolated and / or inserted into the ovarian cortex cats PAF s at different times
43 after cooling through the VN and TB staining. The collection of isolated PAF s was
44 performed by sieves filtering and PAF s samples included in the ovarian cortex
45 were collected by ovarian dissection. Both methods were performed according to
46 previously established protocols for the species by Jewgenow and Göritz (1995)
47 and Jewgenow et al. (2011). The isolated PAF s were stained with DPBS and VN
48 (40: 1 v / v) DPBS with TB (10: 1 v / v); the PAF s included by washing and VN (40:

1 v / v). To isolated PAF s results indicate similar results for both VN and TB dyes.
Significant difference between control and 72h and between 24h and 72h. There
was a moderate correlation ($r^2 = 0.53$, $P = 0.0073$) between the results of staining
TB and VN in isolated groups. There was no significant difference on the viability of
PAFs inserted into the cortex in either cooling times. Included PAFs viability
results show great variability among the examined groups, which may be due to a
large individual variation. The results demonstrate that the VN can be used as a
biomarker feasibility PAF s domestic cats.

Keywords: pré-antral follicle, cats, neutral red, viability, frozen.

58

59 1. Introdução

60

61 Folículos pré-antrais (FOPAs) inclusos no córtex ovariano são estruturas
62 importantes e devem ser preservados em bancos genéticos de espécies
63 zootecnicamente superiores ou espécies ameaçadas de extinção [1]. Para a
64 utilização dessas estruturas, entretanto é necessário o desenvolvimento de
65 técnicas de reprodução assistida (ART) como a maturação oocitária e a
66 fertilização *in vitro*.

67 Atualmente para a avaliação de FOPAs inclusos ou isolados do córtex
68 ovariano é utilizada a histologia, a microscopia eletrônica e ou marcadores
69 fluorescentes, sendo todos parâmetros morfológicos [2, 3, 4]. Os corantes
70 fluorescentes utilizados para avaliação de viabilidade de gametas apresentam
71 muitas limitações no monitoramento de células vivas. Esses métodos não
72 permitem repetidas avaliações dos folículos, são invasivos ou requerem solventes
73 como o etanol e o DMSO os quais podem ser danosos para as células [5].

74 O corante *trypan blue* (TB) é usado normalmente na coloração de células
75 não viáveis e está bem padronizado para a análise da viabilidade de FOPAs
76 isolados de gatas e de outras espécies, mas não é utilizado para corar FOPAs
77 incluso em tecido, não permitindo uma diferenciação entre células vivas e mortas.

78 Até o momento, somente FOPA de camundongo foram manipulados *in vitro*
79 para iniciarem a ativação e o desenvolvimento de folículos primordiais até o
80 estágio pré-ovulatório gerando embriões e filhotes viáveis [6]. Os fatores
81 responsáveis pela ativação e crescimento folicular inicial em carnívoros
82 permanecem desconhecidos [7]. Estudo *in vitro* usando análise morfométrica

sugere que os folículos primordiais, iniciam seu crescimento baseados na ordem em que eles foram formados [8]. Entretanto mecanismos de nutrição, como a proximidade de terminações nervosas, vasos, grandes folículos e corpos lúteos também são importantes nesse recrutamento [9].

O vermelho neutro (VN) é um corante acessível e tem sido utilizado nos estudos de toxicidade celular na indústria e pesquisa, mas o seu uso como um biomarcador para monitorar a viabilidade de FOPA permanece ainda não padronizado. O VN é solúvel em água, facilitando cultivos *in vitro* de folículos isolados ou fragmentos corticais ovarianos. Quando células viáveis são expostas ao VN, o corante é estocado nos lisossomos corando também a membrana celular e nuclear [10,11]. O VN tem valor biológico pois não é tóxico, é extremamente sensível as mudanças de pH e pode auxiliar no monitoramento da mesma célula em colorações sequenciais [5]. As células vivas e metabolicamente ativas se coram em vermelho quando expostas ao VN.

De acordo com o exposto o objetivo do presente estudo foi testar o uso do corante supravital VN para avaliação da viabilidade de FOPAs isolados e inclusos no córtex ovariano de gatas domésticas em diferentes tempos de refrigeração a 4°C: (0-6h) controle, 24horas e 72horas.

101

102 **2. Material e métodos**

103

104 *2.1. Reagentes*

105 Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO,

106 EUA), Callbiochem (EMD Chemical Inc., San Diego, CA, EUA). Em caso de
107 exceções as empresas foram citadas.

108

109 *2.1. Aspectos Éticos*

110 Essa pesquisa foi realizada de acordo com os Princípios Éticos de
111 Experimentação Animal e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais
112 (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu
113 sob o número de protocolo nº 80/2012-CEUA.

114

115 *2.2. Obtenção e transporte dos ovários*

116 Durante os meses de maio a junho de 2013, foram obtidos 45 ovários de
117 gatas domésticas adultas (acima de 2 anos de idade) submetidas a castração
118 eletiva em clínicas particulares de Berlin, Alemanha. Os ovários apresentavam-se
119 em interestro ou em fase folicular. Após a cirurgia os ovários foram
120 acondicionados em tubos plásticos contendo solução salina tamponada -
121 Dubelcco (DPBS), transportados refrigerados, em caixa térmica de poliestireno
122 expandido e no laboratório os ovários foram transferidos para um refrigerador
123 previamente estabilizado a 4°C.

124

125 *2.3. Grupos experimentais e refrigeração*

126 Cada ovário correspondeu a uma amostra. Os 45 ovários foram separados
127 em 3 grupos experimentais: grupo *Trypan Blue* Isolado (TBI, n=12), grupo
128 Vermelho Neutro Isolado (VNI, n=15) e o grupo vermelho neutro incluso no córtex
129 ovariano (VNC, n=18). Cada grupo foi mantido sob refrigeração a 4°C por três

130 períodos de tempo: controle (0-6 horas), 24 e 72 horas.

131

132 2.4. Isolamento folicular e colorações por TB e VN

133 Nos grupos TBI e VNI os folículos ovarianos foram isolados segundo a
134 técnica de Jewgenow e Pitra (1991)[12]. Os ovários foram divididos ao meio
135 seguindo a linha longitudinal. As metades foram pressionadas através de um filtro
136 de aço de dissociação (malha 100µm, Sigma Aldrich Co., St. Louis, EUA), sob
137 placa de petri contendo DPBS a temperatura ambiente. A suspensão de células
138 obtida foi pressionada em filtro de nylon (malha 90 µm, Cell Strainer, BD Falcon™,
139 Franklin Lakes, NJ, EUA) sob placa de petri. A solução com FOPAs com tamanho
140 inferior a 90 µm foi novamente filtrada (malha 40 µm, Cell Strainer, BD Falcon™,
141 Franklin Lakes, NJ, EUA). A suspensão resultante foi descartada e o filtro de 40
142 µm foi lavado em placa de petri com 10 mL de DPBS para recuperação dos
143 folículos com diâmetro entre 40 e 90 µm, medida que corresponde ao espectro de
144 tamanho dos folículos primordiais, transicionais, primários e secundários iniciais
145 em gatas.

146 A suspensão resultante foi centrifugada (200xg, 10 minutos) e
147 ressuspensas em 1 mL de MEM-Hepes (HMEM Sigma Chemical Co., St Louis
148 EUA) acrescido de (10µg/mL) albumina sérica bovina (BSA).

149 Uma alíquota de 0,5 mL foi usada para avaliar a viabilidade e quantificar o
150 número de FOPAs utilizando o TB 0,05% 0,05 mL (Serva, Heidelberg, Alemanha),
151 na (proporção 1:10). A alíquota foi mantida em repouso por 2 minutos e avaliada
152 em microscópio invertido (Axiovert, Karl-Zeiss, Colonia, Alemanha) em aumento
153 400X. Foram contados 100 FOPAs diferenciando os FOPAs vivos (não corados) e

154 mortos (corados em azul). O 0,5 mL restante foi utilizado para avaliar a viabilidade
155 e quantificar o número de FOPAs com VN. Essa alíquota foi acrescida da solução
156 de vermelho neutro (Sigma Chemical Co., St. Louis EUA) na proporção de 1:40
157 mantida por 2 minutos em repouso. Foram quantificados 100 FOPAs, distinguindo-
158 os em vivos para os corados em vermelho (Fig. 1A) e mortos, os não corados.

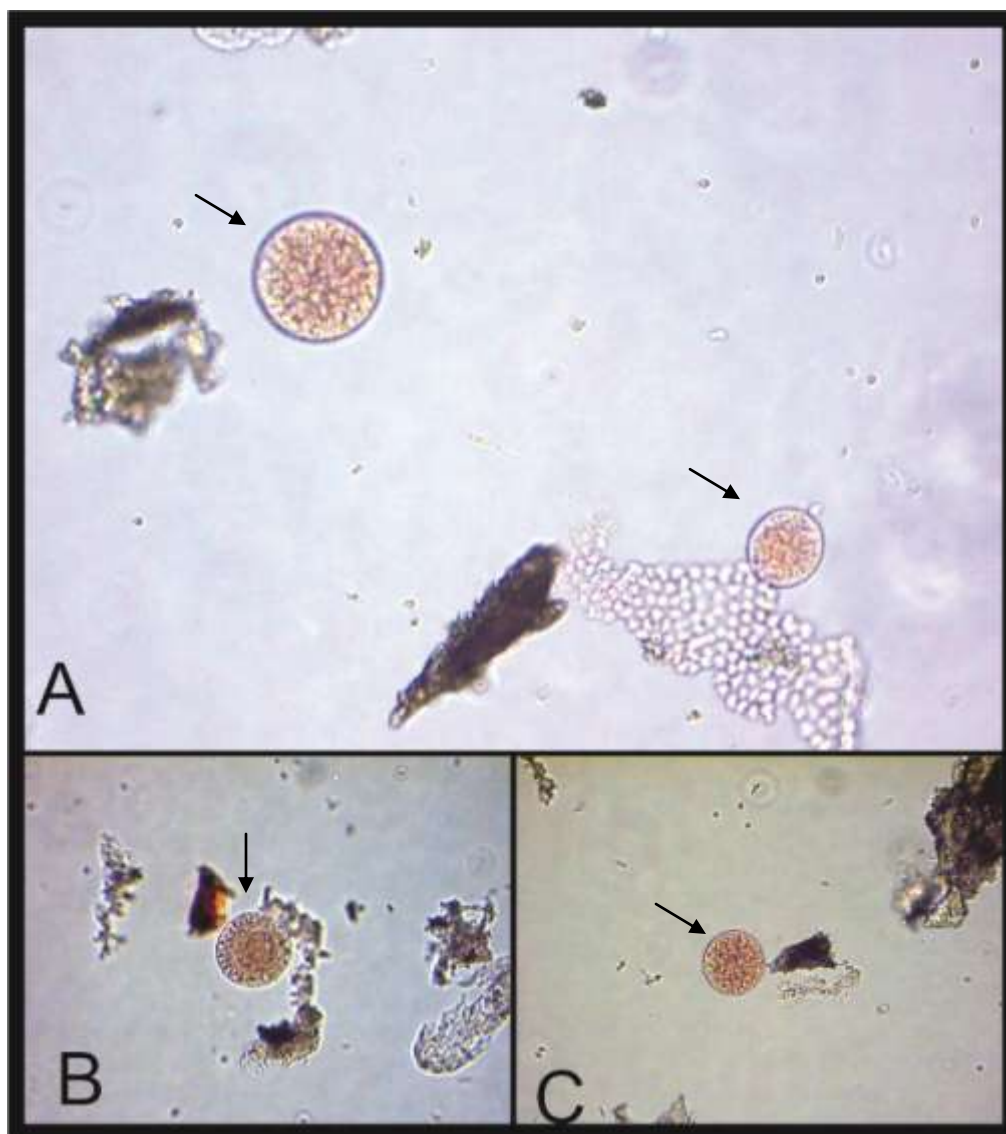
159

160 *2.5. Coleta de tecido cortical e coloração por VN*

161 Os ovários pertencentes ao grupo VNC (n=18) foram cortados ao meio no
162 sentido longitudinal e lavados em placas de petri de 60 a 15 (Thermo Fischer
163 Scientific, Braunschweig, Alemanha) contendo meio de lavagem M199 (Sigma-
164 Aldrich, Taufkirchen, Alemanha) acrescidos de 0,1 mg/mL de cisteína, 3 mg/mL
165 de BSA, 4ng/mL de lactato de sódio, 2,3 mM de piruvato de sódio, 6 mM de
166 Hepes, 55 µg/mL de gentamicina e 3mM de L-glutamina). Usando um bisturi a
167 medula ovariana foi removida até que somente permanecesse uma fina camada
168 do córtex ovariano (aproximadamente 200 µm de espessura).

169 As camadas de córtex ovariano foram submetidas a biopsias colhidas com
170 um *punch* de 2 mm (Fig. 2A) (GFP, Colônia, Alemanha) para obtenção de
171 amostras teciduais de tamanho semelhante. Os fragmentos foram acondicionados
172 em placas de petri com quatro poços (Termo Scientific Nucleon, Rochester NY,
173 EUA). Em cada poço foi colocado um máximo de 4 fragmentos de tecido ovariano
174 em 400 µL de meio de lavagem acrescido com 10 µL de VN. Após a preparação,
175 as placas foram transferidas para uma incubadora a 37,5°C e 5% de CO₂ por um
176 período de 16 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para laminas
177 recobertas por lamínulas e avaliadas em microscópio invertido. Os folículos

178 contados por fragmento de 2 mm e corados em vermelho foram considerados
179 viáveis.



180

181 **Fig. 1.** Fotomicrografia de folículos pré-antrais (FOPAs) isolados de ovários de
182 gatas domésticas corados com vermelho neutro. **A.** FOPA do grupo controle
183 (seta), aumento 400X. **B.** Detalhe de um FOPA (seta) isolado após refrigeração de
184 24h, aumento 400X. **C.** Detalhe de um FOPA (seta) isolado após 72h de
185 refrigeração, aumento 400X.

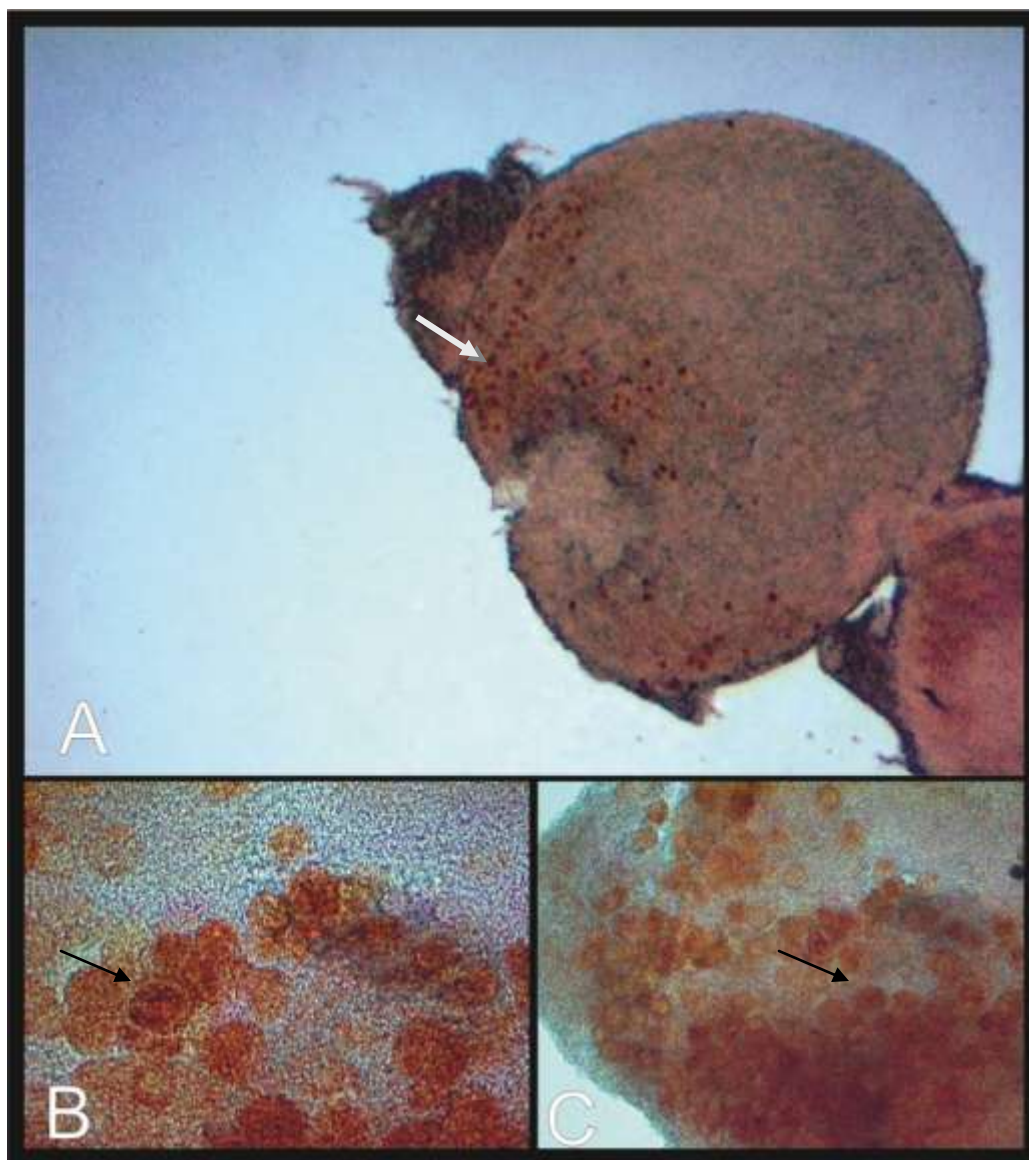


Fig. 2. Fotomicrografia do tecido cortical contendo folículos pré-antrais (FOPAs) do ovário de gatas domésticas corados com o vermelho neutro. **A.** FOPAs (seta) do grupo controle em peça de 2 mm, aumento 100X. **B.** Detalhe do tecido cortical contendo FOPA (seta) após 24h de refrigeração, aumento 600X. **C.** Detalhe de tecido cortical contendo FOPA (seta) após 72h de refrigeração, aumento 400X.

194 2.6 Análises Estatísticas

195 O efeito do tempo de refrigeração (controle, 24 e 72 horas) sobre a
196 viabilidade de FOPAs isolados e inclusos no córtex ovariano foram analisados
197 aplicando-se modelos lineares generalizados com resposta binomial negativa
198 utilizando função de ligação logarítmica e considerando medidas repetidas [13,
199 14]. O modelo foi ajustado considerando como efeitos principais (tempo e técnica)
200 e a interação. Dentro de cada técnica, foram comparados os tempos pelo LS
201 Means (ajustado por Bonferroni) do procedimento Proc Genmod do programa SAS
202 (Statistical Analysis System, versão 9.3, licenciado para a Universidade Estadual
203 Paulista, UNESP). A qualidade do ajuste foi verificada através dos desvios por
204 grau de liberdade (scaled deviance). Valores próximos a unidade denotam um
205 bom ajuste do modelo. Foi obtida a correlação de Spearman entre o número de
206 folículos viáveis isolados analisados com TB e VN. A correlação foi considerada
207 fraca para r entre 0,10 a 0,30, moderado para r entre 0,40 a 0,60 e forte para r
208 entre 0,70 a 1,0.

209 3. Resultados

210 Os resultados de viabilidade de FOPAs isolados (TBI e VNI) e inclusos no
211 córtex ovariano (VNC) estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

212 O resultado do estudo de correlação dos valores obtidos de FOPAs viáveis
213 isolados corados pelas técnicas de TB e VN está representado na Fig. 3.

214

215

216

Tabela 1. Porcentagem de FOPAs isolados de ovários de gatas domésticas, viáveis, corados com pelas técnicas *trypan blue* (TBI) e vermelho neutro (VNI), mantidos sob refrigeração prolongada (Controle, 24h e 72h). O valor obtido para *scaled deviance* foi de 2,11, o que denota um bom ajuste do modelo. Média e desvio padrão ($\pm$ DP) (n=36, $p < 0,05$).

Grupos	Tempo (h)	Ovários (n)	Media ($\pm$ DP)%
VNI	Controle	5	68 ($\pm$ 15,46) ^a
	24	5	50 ($\pm$ 10,62) ^a
	72	5	18 ($\pm$ 12,32) ^b
TBI	Controle	4	75 ($\pm$ 5,57) ^a
	24	4	68 ($\pm$ 5,92) ^a
	72	4	38 ($\pm$ 13,74) ^b

Letras diferentes entre linhas (^a^b) quando os tempos diferem estatisticamente dentro dos grupos VNI e TBI ($P \leq 0,001$).

Tabela 2. Número total de FOPAs viáveis inclusos em peças de 2 mm de córtex de ovários de gatas domésticas, corados com vermelho neutro mantidos sob refrigeração prolongada (Controle, 24h e 72h). O valor obtido para *scaled deviance* foi de 1,25, o que denota um bom ajuste do modelo. Média($\pm$ Desvio padrão).

Grupo	Tempo	Ovários (n)	Fragmentos 2 mm (n)	Média e ($\pm$ Desvio padrão)
VNC	Controle	6	23	87 ($\pm$ 52) ^a
	24	6	27	83($\pm$ 55) ^{ab}
	72	6	33	48($\pm$ 58) ^b

Letras diferentes nas linhas (^a^b) quando os tempos diferem estatisticamente ($p \leq 0,01$)

Observou-se uma correlação positiva forte entre a porcentagem de folículos pré-antrais isolados viáveis ($r = 0,73$, $p = 0,0073$) e corados com VN e TB.

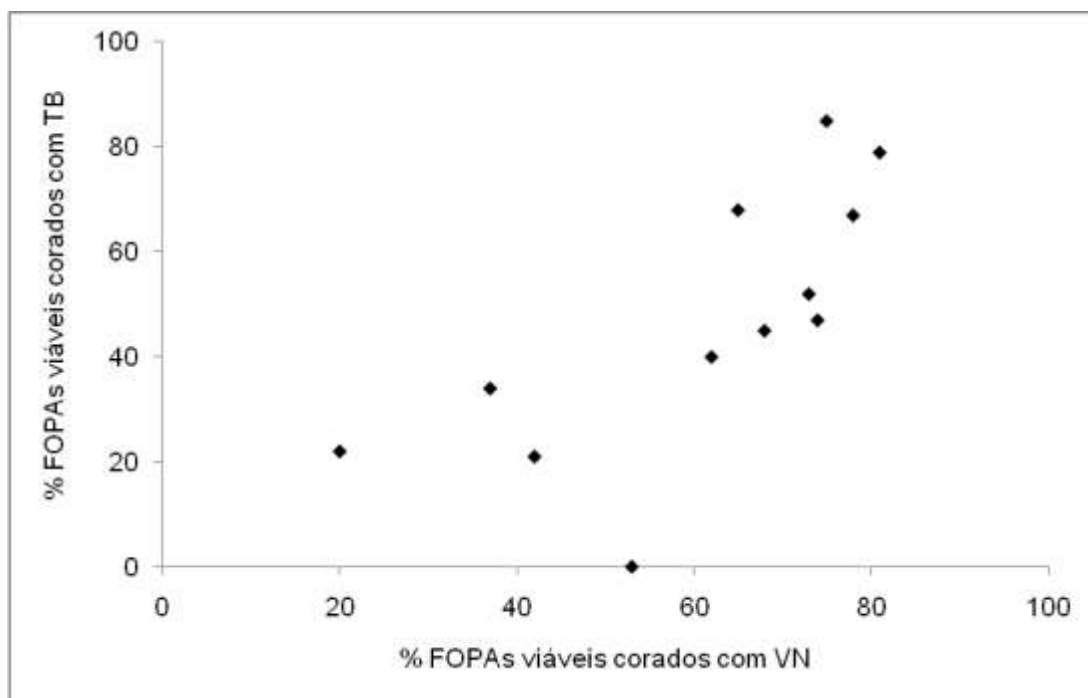


Fig. 3. Correlação de Spearman entre os resultados de viabilidade de FOPAs isolados, corados pelos corantes *tripan blue* e vermelho neutro ($r = 0,73$, $p = 0,0073$).

4. Discussão

Foram selecionados dois corantes supravitais, TB e VN para avaliar e quantificar os FOPAs isolados de ovários de gatas domésticas. O TB é um corante normalmente utilizado para tal finalidade com resultados satisfatórios, entretanto, o VN não é utilizado na rotina de avaliação de FOPAs. De acordo com a literatura [22] o VN é um corante de baixo custo, não invasivo apresentando vantagens consideráveis.

246 Outros métodos usados na avaliação da viabilidade de FOPAs são os
247 marcadores fluorescentes. No entanto, os corantes fluorescentes apresentam
248 limitações no monitoramento de células vivas, incluindo os FOPAs. Esses
249 métodos não permitem repetidos monitoramentos de um mesmo folículo, são
250 invasivos, e/ou requerem solventes como o etanol e o DMSO, os quais podem ser
251 danosos para o funcionamento normal das células, conduzindo-as para a morte
252 celular [5].

253 Uma revisão publicada em 1971 [17] reuniu informações sobre os efeitos
254 negativos do VN no metabolismo celular. Foram observadas interferências na
255 atividade enzimática das células, quebra de glicose e aumento da atividade dos
256 lisossomas. Outros autores [18] reportaram que na exposição à luz visível, o VN
257 poderia atuar como um fotossensibilizador e estudos relataram efeitos negativos
258 relacionados ao aumento da produção de substâncias oxigênio reativas (ROS).
259 Foi relatado também que o VN tende a precipitar e pode aderir-se ao DNA em sua
260 forma catiônica [19-21].

261 Recentemente, o VN foi usado para avaliar a viabilidade para FOPAs de
262 ruminantes inclusos em córtex ovariano e isolados [5,22,24]. Langbeen et al. [23]
263 confirmaram que VN cora folículos isolados de maneira reversível, bastando
264 transferir, por poucas horas, a amostra para um meio livre de VN. Em cultivo *in*
265 *vitro*, aproximadamente 70% dos FOPAs de ruminantes sobreviveram a duas
266 colorações subsequentes com VN por um período de seis dias, mostrando
267 crescimento e desenvolvimento. Isto indica a possibilidade de monitorar a
268 viabilidade das células de um FOPA, sequencialmente, em sistemas de cultura *in*
269 *vitro*. Estudos precisam ser realizados para observar se esta mesma tendência

270 pode ser observada em carnívoros.

271 O protocolo de VN utilizado neste experimento foi diferente dos outros
272 estudos [5,24] em termos de tempo de exposição, concentração de VN e
273 condições de incubação. Essas diferenças são consideradas normais, uma vez
274 que se trata de espécies diferentes. Recentemente pesquisadores [21] sugeriram
275 que as condições de cultura *in vitro* e a concentração de VN para FOPAs
276 necessitam ser ajustadas para cada espécie, a fim de que seja possível acessar
277 as melhores condições para cultivo *in vitro*. Em 2010 [23], foi demonstrado que o
278 corante VN não é deletério ao tecido e aparentemente não compromete a cultura
279 *in vitro*; também observaram que um baixo número de células em apoptose pode
280 ser identificado pela coloração com VN, em tecido cortical ovariano, sugerindo que
281 o VN apresenta afinidade por folículos saudáveis.

282 A análise da tabela 1 mostra que em se considerando os grupos de FOPAS
283 isolados corados com TB e VN não foi constatada diferença significativa entre os
284 tempos de controle e 24 horas, ou seja, o transporte de ovários pode ser realizado
285 refrigerado a 4°C por um período relativamente longo. Isto é benéfico nos casos
286 de transporte de gônadas entre locais distantes reforçando a possibilidade de êxito
287 quando se considera trabalhar com gametas femininos de animais eutanasiados
288 ou mortos em fazendas ou reservas distantes de centros urbanos.

289 Ainda analisando a Tabela 1 constatamos uma diferença significativa entre
290 os tempos controle e 24 horas em relação ao tempo máximo de refrigeração de 72
291 horas nos dois grupos estudados (TBI e VNI). A porcentagem de FOPAS isolados
292 e viáveis cai consideravelmente quando os ovários são transportados refrigerados
293 a 4°C por 72 horas. Essa condição foi observada tanto nos FOPAS corados com

294 TB quanto por VB. É evidente a queda de viabilidade dos FOPAS em relação ao
295 tempo e utilizando o corante TB como um controle do VN, houve uma
296 correspondência dos dois corantes na detecção da perda de viabilidade dos
297 FOPAs quando acompanhados por 72 horas ($r = 0,73$, $p = 0,0073$).

298 A perda de viabilidade dos FOPAs quanto mais prolongado for o período de
299 refrigeração, já foi demonstrada em outras publicações [16]. A observação dos
300 folículos pré-antrais corados e a capacidade dos corantes de detectar em a perda
301 de viabilidade dos folículos, com o passar do tempo durante a refrigeração
302 prolongada, nos mostraram que o Vermelho Neutro foi tão eficiente quanto o TB
303 para avaliar a viabilidade de FOPAs de ovários de gatas domésticas, isolados no
304 córtex ovariano.

305 Em relação aos FOPAS inclusos no córtex ovariano, após os diferentes
306 períodos de estocagem a 4°C, foi detectada uma queda significativa de viabilidade
307 entre os tempos Controle e 72 horas. Da mesma forma que nos FOPAS isolados,
308 os FOPAS inclusos em córtex ovariano sofreram uma queda na viabilidade
309 quando submetidos a uma temperatura de 4°C por 72 horas reforçando a
310 existência de um determinado período no qual os FOPAS podem ser utilizados em
311 técnicas de reprodução assistida ou serem criopreservados.

312 Foi observada uma variação considerável na contagem dos FOPAs no
313 grupo VNC Isto fica evidente pelo desvio padrão alto assinalado para cada tempo.
314 Essa variação também foi demonstrada por estudos anteriores [1,2] onde foi
315 observada uma grande variação no número de FOPAs viáveis entre amostras de
316 tecido de tamanho padronizado (2 mm) de córtex ovariano Grupo:

317 A despeito da queda de viabilidade no tempo de 72 horas ainda existiam
318 FOPAs viáveis sugerindo que alguns FOPAs mantêm sua atividade metabólica
319 após 72 horas de refrigeração. No entanto, Wood et al. [16] sugeriram que o limite
320 de tempo para evitar alterações tafonômicas e causar a perda de viabilidade de
321 FOPAs de gatas é de 48 horas. Neste experimento o período de 48 horas não foi
322 avaliado podendo inclusive reforçar a afirmação de Wood et al. (16) já que houve
323 uma diferença significativa entre os tempos (controle e 24 horas) e 72 horas nos
324 FOPAs isolados e entre Controle e 72 horas nos FOPAs inclusos. Além disso,
325 esses autores usaram a análise morfológica como medida de viabilidade dos
326 FOPAs.

327 Em outro estudo foi observado [5] que FOPAs classificados como viáveis,
328 após análise morfológica, não foram corados previamente pelo VN. A ocorrência
329 de folículos não corados positivamente com VN *in situ*, mas classificados como
330 viáveis na avaliação histológica, sugere a necessidade de uma combinação de
331 métodos funcionais e morfológicos para testar a viabilidade de FOPA conforme já
332 previamente sugerido por outro estudo [6].

333 Uma das grandes aplicações para o VN é seu uso em culturas *in vitro* a fim
334 de monitorar a viabilidade de FOPAs durante cultura. Recentemente
335 pesquisadores [22] sugeriram que as condições de cultura *in vitro* e a
336 concentração de VN para FOPAs necessitam ser ajustadas para cada espécie, a
337 fim de que seja possível acessar as melhores condições para cultivo *in vitro*. Em
338 2010 [22] foi demonstrado que o corante VN não é deletério ao tecido e
339 aparentemente não compromete a cultura *in vitro*; também observaram que um
340 baixo número de células em apoptose pode ser identificado pela coloração com

341 VN, em tecido cortical ovariano, sugerindo que o VN apresenta afinidade por
342 folículos saudáveis.

343 **5. Conclusão**

344 O VN mostrou-se um corante adequado para a quantificação e avaliar a
345 viabilidade de FOPAs isolados e inclusos no córtex ovariano de gatas domésticas
346 podendo ser utilizado para esse fim.

347 **6. Agradecimentos**

348 Agradecemos o suporte financeiro e a bolsa de estudos cedidas pela
349 CAPES e ao Programa de Ciências sem Fronteiras. Agradecemos também o
350 apoio da FMVZ, UNESP de Botucatu e IZW – Leibinz Institut de Berlin.

351

Referências:

- [1] Jewgenow K, Wiedemann C, Bertelsen MF, Ringleb J. Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. *International Zoo Yearbook* 2011;45:124-132.
- [2] Jewgenow K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small pré-antral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology* 2008 998:49:1567-77.
- [3] Wiedemann C, Zahmel J, Jewgenow K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Vet Res* 2013: 9:37.
- [4] Luvoni GC, Tessaro I, Apparicio M, Ruggeri E, Luciano AM, Modina, SC. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reprod Domest Anim* 2012: 47: 385-91.
- [5] Ellen PA, Jorssen AN, Langbeen E, Frasen EL, Martinez J, Leroy LMR, Peter, EJ. Monitoring pré-antral follicle survival and growth in bovine ovarian biopsies by repeated use of neutral red and cultured in vitro under low and high oxygen tension *Theriogenology* 2014:82:387–395.
- [6] Matos M, Silva J, Rodrigues A, Figueiredo J. Técnicas para Avaliação da qualidade de foículos ovarianos pré-antrais cultivado in vitro. *Revista Brasileira de*

376 Reprodução Animal 2007:31:433-442.

377

378 [7] Eppig JJ, O'brien M, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and

379 development in vitro. Mol Reprod Dev 2013:44:260-73.

380

381 [8] McLaughlin EA, Mciver, SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle

382 development. Reproduction 2009:137:1-11.

383

384 [9] Hirshfield, AN. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol.

385 1991:124:43-101.

386

387 [10] Greewald GS, Terranova PF. Follicular selection and its control. In: KNOBIL,

388 E, NEIL, J et al.(Eds): The Physiology of Reproduction. Raven Press, Ltd, New

389 York, 1988:387-445.

390

391 [11] Elliot WM, Auersperg N. Comparison of the neutral red and methylene blue

392 assays to study cell growth in culture. Biotechnology Histochemistry 1993;68:29–

393 35.

394

395 [12] Jewgenow, K.; Pitra, C. The Isolation of Pré-antral Follicles from Bovine

396 Ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*. 1991;26:281-289.

397

398 [13] Chambers EL, Gosden RG, Yap C, Picton HM. In situ identification of follicles

399 in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and

400 developmental potential in strategies to preserve female fertility. Hum Reprod
401 2010;25:2559–68.

402

403 [14] Nelder JA, Wedderburn RW. Generalized linear models. Journal of the Royal
404 Statistical Society Series A, 1972;3:370–384.

405

406 [15] Liang K, Scott LZ. Longitudinal data analysis using generalized linear models.
407 Biometrika 1991;73:13-22.

408

409 [16] Wood TC, Richard JM, Wildt D. Follicle–Oocyte Atresia and temporal
410 taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. Molecular Reproduction and
411 Development 1997;46:190–200.

412

413 [17] Barbosa P, Peters M. The effects of vital dyes on living organisms with special
414 reference to Methylene Blue and Neutral Red. Histochemical Journal 1971;3:71-
415 93.

416

417 [18] Allison A, Magnus I, Young M. Role of lysosomes and of cell membranes in
418 photosensitization. Nature 1966; 209: 874–8.

419

420 [19] Marks GT, Lee ED, Aikens DA, Richtol HH. Transient photochemistry of
421 neutral red. Photochem Photobiol 1984; 39:323–8.

422

423 [20] Singh MK, Pal H, Bhasikuttan AC, Sapre AV. Photophysical properties of the

- 424 cationic form of neutral red. Photochem Photobiol 1999; 69:529–35.
- 425
- 426 [21] Guérard M, Zeller A, Singer T, Gocke E. In vitro genotoxicity of neutral red
427 after photo-activation and metabolic activation in the Ames test, the micronucleus
428 test and the comet assay. Mutat Res 2012; 746:15–20.
- 429
- 430 [22] Langbeen EPA, Jorssen N, Granata E, Fransen JLMR, Leroy Bols, PEJ.
431 Effects of neutral red assisted viability assessment on the cryotolerance of isolated
432 bovine pré-antral follicles J Assist Reprod Genet. Publish on line, Spring 2 de out
433 de 2014(a).
- 434
- 435 [23] Chambers EL, Gosden RG, Yap C, Picton HM. *In situ* identification of follicles
436 in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and
437 developmental potential in strategies to preserve female fertility. Hum. Reprod.
438 2010; 25:2559–68.
- 439
- 440 [24] Langbeen EPA, Jorssen E, Fransen APA, Rodriguez M, Chong, Garcia JLMR,
441 Leroy PEJ. Bols. Characterization of freshly retrieved pré-antral follicles using a
442 low-invasive, mechanical isolation method extended to different ruminant species.
443 Cambridge University Press 2014(b).
- 444
- 445 [25] Picton HM, Gosden, RG..In vitro growth of human primordial follicles from
446 frozen-banked ovarian tissue. Mol Cell Endocrinol Review. V. 15; 166(1):27-35.2

CAPÍTULO 3

Trabalho a ser enviado para a revista Cryobiology

VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS NO CÓRTEX OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO.

RESUMO

Os bancos de tecido cortical ovariano apresentam um enorme potencial para serem aplicados na conservação das espécies de felinos selvagens ameaçados. Os ovários abrigam uma reserva genética, os folículos pré-antrais (FOPAs), que correspondem a aproximadamente 90% do *pool* de oócitos. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o impacto do transporte de ovários refrigerados a 4°C seguido de vitrificação, sobre a viabilidade de FOPAs. Ovários de doze gatas foram mantidos a 4°C durante 0-6 (controle), 24 e 72 horas em um refrigerador pré-programado. Após cada tempo de refrigeração o córtex ovariano foi isolado e amostras de 2 mm foram coletadas com um *punch* para padronizar o tamanho das amostras. As amostras foram submetidas à análise de viabilidade com vermelho neutro (VN), análise histológica e ultra-estrutural, e posteriormente vitrificadas. O procedimento de vitrificação foi realizado segundo o preconizado por Keros et al (2009, *Hum Reprod*, 24, 1670-83). Após a vitrificação as amostras foram desvitrificadas e analisadas novamente pelas mesmas técnicas. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na viabilidade de FOPAs após a desvitrificação entre os grupos controle e 24 horas; ao contrário, o grupo 72 horas foi afetado pelo procedimento de vitrificação. Estes resultados nos permitem

24 combinar estratégias de transporte refrigerado de gônadas femininas com a
25 vitrificação do córtex ovariano até um período de 24 horas, viabilizando a coleta e
26 armazenamento deste material e manutenção em bancos genéticos de tecidos
27 corticais ovarianos.

28

29 **ABSTRACT**

30 The ovarian cortical tissue banks have a huge potential to be applied in the
31 conservation of threatened wild cats. The ovaries are home to a huge gene pool -
32 the pre-antral follicles (PAF), corresponding to approximately 90% of the oocyte
33 pool. The purpose of this research is to evaluate the impact of ovary transport
34 refrigerated at 4 ° C followed by vitrification, on the PAF viability. Ovaries from
35 twelve cats were kept at 4 ° C for 0-6 (control), 24 and 72 hours at a pre-
36 programmed refrigerator. After each time cooling the ovarian cortex was isolated
37 and 2mm samples were collected with a punch to standardize the size of the
38 samples. The samples were subjected viability analysis with neutral red (NR),
39 histological, ultrastructural and then vitrified. The vitrification procedure was
40 performed according to the recommendations by Keros et al. (2009, *Hum Reprod*,
41 24, 1670-83). After warm samples were analyzed again with and VN, histology,
42 and ultrastructure. The results showed no significant difference in the viability of
43 FOPAs after devitrification between the control groups and 24 hours, on the
44 contrary, the group 72 hours was affected by vitrification procedure. These results
45 allow us to combine refrigerated transport strategies to a 24-hour for female

46 gonads with vitrification of ovarian cortex, enabling the collection and storage of
47 this material through a genetic bank of ovarian cortical tissue.

48

49 1. Introdução

50 Segundo o *Living Report* de 2014 recentemente publicado pela WWF, todas
51 as espécies de felídeos selvagens estão ameaçadas de extinção, com algumas
52 espécies reduzidas a poucos indivíduos em cativeiros e em vida livre. Esta
53 situação promove uma erosão genética e conduz as espécies à extinção [1,2]. O
54 gato doméstico é a única das 36 espécies de felinos que não se encontra
55 ameaçada de extinção.

56 Atualmente, cada indivíduo vivo representa parte do *pool* genético
57 remanescente da espécie. No caso das fêmeas, os ovários contêm uma enorme e
58 importante reserva genética, os folículos pré-antrais (primordiais, primários e
59 secundários iniciais) FOPAs [3]. Os oócitos de mamíferos se desenvolvem a partir
60 de poucas células germinativas primordiais, migram para a gônada primitiva,
61 multiplicam-se em milhões durante a vida fetal e se mantêm em estágio
62 quiescente até o recrutamento para crescimento, ovulação e talvez fertilização
63 para que se tornem embriões iniciais [4,5]. A grande maioria dos oócitos mantém-
64 se quiescente no córtex ovariano durante toda a vida reprodutiva da fêmea,
65 tornando-se uma valiosa fonte de gametas para serem utilizados.

66 O desafio para a manutenção e utilização desse material necessita do
67 desenvolvimento de protocolos de transporte e criopreservação do tecido cortical
68 ovariano aplicável mesmo em condições de campo. Nesse contexto a refrigeração
69 seguida de vitrificação é uma opção de técnicas para se atingir este objetivo.

70 A vitrificação consiste numa técnica de criopreservação ultrarrápida onde as
71 amostras de tecido são colocadas diretamente em contato com o nitrogênio líquido

72 [3]. Nestas condições a formação de cristal de gelo é inibida resultando em uma
73 massa vítrea sólida, tanto no meio extracelular quando na intracelular [6]. Em
74 estudo recente com ovários de mulheres [7] observou-se melhores resultados de
75 morfologia de folículos pré-antrais, após a vitrificação do córtex ovariano em
76 relação à congelação lenta, principalmente na preservação das interações entre
77 os oócitos e células da granulosa. Embora a vitrificação já tenha sido também
78 utilizada em córtex ovariano de cadelas [9] e de gatas [10] os resultados
79 permanecem pouco satisfatórios.

80 O aperfeiçoamento de protocolos de transporte e vitrificação de córtex
81 ovariano depende o uso da reserva oocitária de animais castrados ou
82 eutanasiados por razões médicas ou abatidos para controle populacional os quais
83 podem fornecer material gonadal que auxilie no desenvolvimento dessas
84 biotecnologias. Nesta condição, os gatos domésticos adquirem uma posição
85 estratégica porque são excelentes modelos experimentais para felídeos selvagens
86 [19-23] e podem auxiliar na transferência de tecnologia para a preservação do
87 material genético de felídeos ameaçados, para ser utilizado em programas de ART
88 no futuro.

89 Deste modo o objetivo desta pesquisa foi o de investigar o impacto da
90 refrigeração a 4°C, seguida de vitrificação do córtex ovariano, sobre a viabilidade
91 de folículos pré-antrais (FOPAs) inclusos no córtex ovariano de gatas domésticas.

92

93

94 **2. Material e métodos**

95 *2.1. Reagentes*

96 Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO,
97 EUA), Callbiochem (EMD Chemical Inc., San Diego, CA, EUA). Em caso de
98 exceções as empresas foram citadas.

99

100 *2.1. Aspectos éticos*

101 O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de
102 Experimentação Animal e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais
103 (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu
104 sob o número de protocolo n° 80/2012-CEUA

105

106 *2.3. Obtenção e transporte e refrigeração dos ovários*

107 Durante os meses de novembro a dezembro de 2013 foram obtidos 12
108 ovários de gatas domésticas, em anestro estacional, com idade entre 2 e 6 anos.
109 Os ovários foram obtidos de gatas submetidas a ovariectomia realizadas
110 em clínicas veterinárias locais de Berlin, Alemanha. Os ovários foram
111 acondicionados em tubos plásticos de 50 mL (Greiner bio-one, Frickenhausen,
112 Alemanha) contendo meio mínimo essencial (Eagle), HEPES modificado,
113 suplementado com BSA (3 mg/ml) (Merck, Darmstadt, Alemanha), solução
114 antibiótica e antimicótica, e transferidos para o laboratório a 4°C durante um
115 período máximo de seis horas em caixa térmica de poliestireno expandido. Em
116 seguida ovários foram transferidos para tubos plásticos de 20 mL contendo DPBS

117 e divididos de acordo com os grupos experimentais: grupo controle refrigeração a
118 4°C por no máximo 6 horas, grupos experimentais 24 horas de refrigeração e 72
119 horas de refrigeração. Após esses períodos seguiu-se a preparação do córtex
120 ovariano (Fig. 1).

121

122 2.4. Preparação do córtex ovariano

123 Cada um dos ovários refrigerados foi dividido em duas metades
124 longitudinais e posteriormente cada metade foi novamente dividida ao meio
125 resultando em quatro partes, sendo uma para o grupo controle, e outras duas para
126 o grupo 24 horas e 72 horas totalizando três quartos do ovário. O quarto final foi
127 mantido como reserva em caso de perda de algum dos quartos anteriormente
128 citados.

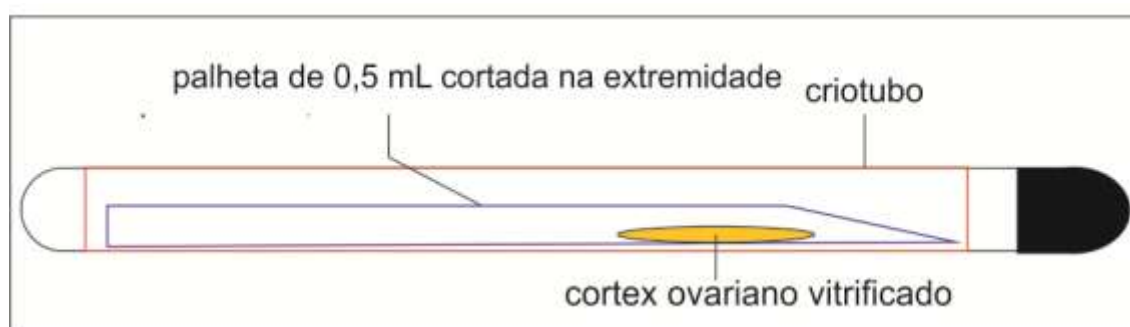
129 Com o uso de uma lâmina de bisturi cada quarto, previamente refrigerado,
130 foi dissecado da porção medular até que restasse apenas uma fina camada de
131 córtex ovariano (aproximadamente 200 µm de espessura) em placa de petri 60x15
132 mm (Thermo Fischer Scientific, Nunc IVF petri dish, non-treated surface,
133 Braunschweig, Alemanha). Conforme ilustrado na Fig. 1 cada quarto de ovário foi
134 dividido novamente gerando amostras de um oitavo cada. Em uma destas peças
135 de um oitavo foram realizadas biópsias, com um *punch* de 2 mm de diâmetro
136 (PFM, Colônia, Alemanha), para obtenção de amostras ovarianas de tamanho
137 similar. Essas amostras foram utilizadas para análise de viabilidade dos folículos
138 pré-antrais com vermelho neutro, análise histológica e microscopia eletrônica
139 (TEM). O oitavo (1/8) restante foi vitrificado.

144 O procedimento de vitrificação das amostras de córtex ovariano foi
145 realizado conforme o descrito por Keros et al. [7] usando o protocolo de 5 minutos.
146 O protocolo resumidamente consiste em três passos de incubação do tecido
147 cortical ovariano em soluções de vitrificação (VS) com concentrações crescentes
148 de crioprotetores (VS1, VS2 e VS3). A solução base consistiu de DPBS (Invitrogen
149 Corporation, Scotland, UK) suplementado com 10mg/mL de albumina sérica
150 bovina (BSA, Vitrolife Inc. Englewood, Colorado, EUA). Os crioprotetores utilizados
151 foram dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Suécia), 1,2-propanodiol (PrOH),
152 etileno glicol (EG) e o polímero polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich, Suécia).

153 Os fragmentos de tecido cortical destinados a vitrificação obedeceram a
154 seguinte sequência: Os fragmentos foram inicialmente colocados com uma pinça
155 fina num tubo de 2 mL contendo a VS1 (2,5% de cada crioprotetor DMSO, PrOH e
156 EG) em uma concentração final de 7,5%, onde permaneceram por 5 minutos a
157 temperatura ambiente; após este período o tecido cortical foi transferido
158 gentilmente com uma pinça para a VS2 (5% de cada crioprotetores DMSO, PrOH
159 e EG) para uma concentração final de 15%, onde também foi mantido pelo
160 período de 5 minutos. Após esta etapa o fragmento tecidual foi novamente
161 transferido para um tubo plástico contendo VS3, onde a concentração de cada
162 crioprotetor foi de 10% (DMSO, PrOH e EG) suplementado com (10% p/v) com
163 PVP, numa concentração final de 40%. A imersão do tecido no VS3 foi realizada
164 com uma solução de VS3 à temperatura de 4°C por 5 minutos, após os quais a
165 amostra foi cuidadosamente posicionada numa palheta de congelação de 0,5 mL,
166 aberta, cortada em bisel (Fig. 2) numa das extremidades, previamente refrigerada

167 a 4°C. Após esta etapa a palheta foi imersa diretamente no nitrogênio líquido e
168 posteriormente acondicionada em crio-tubo identificado para armazenamento em
169 botijão de nitrogênio líquido.

170



171

172 **Fig. 2.** Ilustração do posicionamento do tecido cortical ovariano vitrificado de gatas
173 domésticas na palheta francesa e criotubo.

174

175 2.6. Reaquecimento

176 As soluções de reaquecimento consistiram num conjunto de quatro
177 soluções que tinham como base DPBS com BSA na proporção 10mg/mL
178 acrescida de concentrações decrescentes de sacarose, acondicionadas em tubo
179 plástico de 2 mL com tampa. A primeira solução de reaquecimento (SA) SA1 com
180 0,5 M de sacarose (usada a 37°C) e as soluções SA2, SA3 e SA4 tem a mesma
181 base (DPBS/BSA) com concentrações decrescentes de sacarose 0,25 M, 0,125 e
182 0 M, respectivamente, as quais foram utilizadas à temperatura ambiente. O
183 procedimento de reaquecimento das amostras vitrificadas e a remoção dos
184 crioprotetores consistiram de quatro passos. O criotubo contendo a palheta foi
185 removido do botijão criogênico e depositado em uma caixa térmica de poliestireno

186 expandido contendo nitrogênio líquido. Posteriormente, a palheta foi imersa
187 diretamente na primeira solução de aquecimento (SA1) a 37°C por 5 minutos. A
188 remoção cuidadosa do tecido foi feita com uma pinça lisa fina de modo a
189 salvaguardar a integridade do tecido. A transferência foi feita sequencialmente
190 pelas soluções de aquecimento SA2, SA3 e SA4 a temperatura ambiente
191 respeitando o tempo de 5 minutos para cada banho. Cada amostra foi reaquecida
192 separadamente.

193 As amostras foram coradas com vermelho neutro segundo o protocolo
194 Martins, et al (2014). O máximo de três amostras do córtex de 2 mm foi
195 acondicionada em placas cultivo celular (Thermo Scientific Nunclon Surface,
196 Rochester, NY, EUA) com 400 µL de meio de lavagem (25 mL de M199, Sigma
197 Aldrich, St. Louis, EUA) acrescido de 0,1 mg/mL de cisteína, 3 mg/mL de BSA,
198 4µg/mL de lactato de sódio, 2,3 mM de piruvato de sódio, 6 mM de Hepes, 55
199 µg/mL de gentamicina e 3mM de L-glutamina)) com 10µl de vermelho neutro
200 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e incubados a 37,5°C em atmosfera contendo 5%
201 de CO₂, por 16 horas. Após este período cada amostra foi avaliada em
202 microscópio invertido (Axiovert, Karl-Zeiss, Colônia, Alemanha). Foram contados
203 todos os FOPAs viáveis (corados em vermelho) presentes em cada amostra de
204 mesmo tamanho de tecido cortical e o resultado foi expresso em número total de
205 folículos viáveis por mostra de 2 mm.

206 Em seguida, as mesmas amostras foram transferidas para solução de
207 Bouin para análise histológica e mantidas sob refrigeração a 4°C.

208 *2.7. Análise histológica*

209 Após 24 horas a 4°C em solução Bouin, as amostras de 2 mm foram
210 transferidas para um tubo plástico de 2mL contendo álcool etílico 70% e
211 armazenados 4°C até processamento histológico. Para análise histológica foram
212 utilizadas somente as seis primeiras amostras das 12 que compuseram o
213 experimento. As amostras foram acondicionadas individualmente na posição
214 vertical em bloco de parafina. Após a desidratação e blocagem foram realizados
215 cortes seriados de 3 µm de espessura. Os dois primeiros cortes de cada série de
216 10 cortes foram montados em laminas mantendo-se a distância de 30 µm entre as
217 séries. Cada lâmina abrigou uma média de quatro séries correspondendo a
218 aproximadamente 120 µm. Posteriormente as laminas foram coradas segundo
219 protocolo descrito para Hematoxilina Eosina (HE) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

220

221 2.8. Contagem de FOPAs em amostra histológica

222 A contagem de FOPAs na amostra histológica (CFN) correspondeu ao total
223 de folículos intactos na amostra de 2 mm. Nessas amostras foram considerados
224 somente FOPAs onde o núcleo do oócito estava presente e as estruturas
225 preservadas (Fig. 3).

226

227

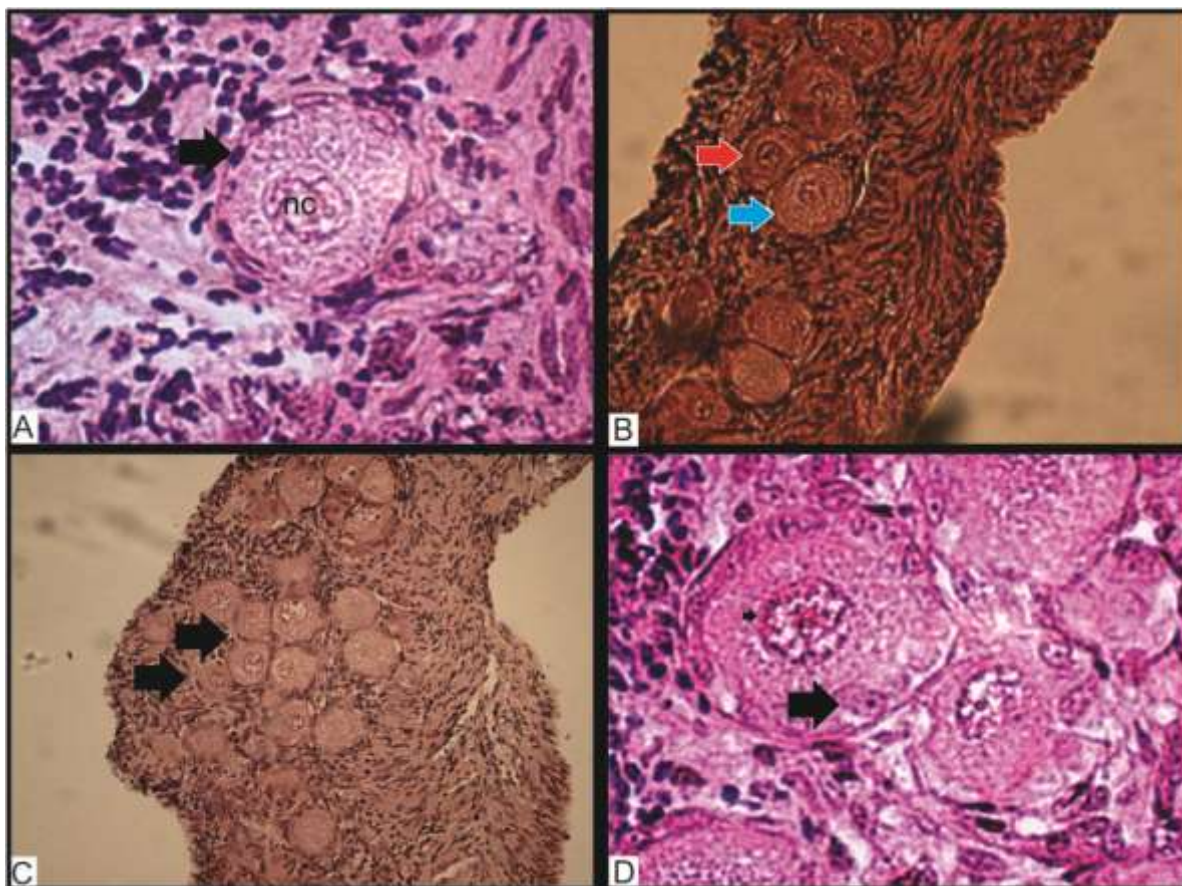


Fig. 3. Fotomicrografia de amostras de tecido cortical ovariano de gatas domésticas corados com hematoxilina e eosina. **A.** Folículo primordial íntegro com núcleo (nc) após a vitrificação do grupo controle, aumento 800x. **B.** FOPAs com morfologia normal corados (seta vermelha) ou não (seta azul) com vermelho neutro do grupo 24h pós aumento 400X. **C.** FOPAs (setas pretas) agrupados do grupo 24h pós, aumento 400X. **D.** FOPA transicional grupo 72h pós com membrana nuclear intacta (seta preta pequena) e células da granulosa (seta preta grande) aumento 600X.

Para cada amostra foi anotado o número de secções teciduais necessárias para a contagem de 40 folículos pré-antrais íntegros. Estes valores foram usados para compor a fórmula do CFN para estimar o número de folículos intactos

240 presentes em cada amostra tecidual de 2 mm. Os FOPAs foram contados e
 241 classificados quanto a seu estágio de desenvolvimento. Também foi anotado o
 242 número de folículos degenerados.
 243 **CFN** = $\pi/4$ [(diâmetro x n FOPAs) / (n x distância)], onde:
 244 **CFN** representa o número total de FOPAs íntegros em cada amostra tecidual;
 245 **diâmetro** da amostra ovariana = 2mm; **n** é o número de seções necessárias para
 246 contar 40 FOPAs viáveis; n FOPA = 40, e distância é o intervalo entre as seções =
 247 30 μ m.

248 **Resultando em**

249 $CFN = 3,1415/4$ [(2000 x 40)/(n seções x 30)]

250 O número de seções variou conforme a densidade de FOPAs no tecido cortical de
 251 cada amostra.

252

253 *2.8. Microscopia eletrônica de transmissão*

254 Amostras de 2 mm foram transferida para solução de Karnowsky para
 255 preservação e posteriormente processada para ser avaliada em microscopia
 256 eletrônica de transmissão (TEM). Duas amostras foram selecionadas para serem
 257 analisadas, correspondentes ao melhor e ao pior resultado, definidos pelo menor e
 258 maior número de FOPAs corados com Vermelho Neutro no tempo controle, sendo
 259 selecionadas as amostras 2 e 6, com uma contagem de 0 e 309 de FOPAs,
 260 respectivamente.

261 Brevemente, após lavagem em tampão fosfato, foi realizada a pós-fixação
 262 com tetróxido de ósmio. As amostras foram desidratadas em concentrações

263 crescentes de etanol e incluídas em Epon 812. À microscopia de luz, foram
264 realizados cortes finos em seções de 1 μm e corados com azul de toluidina. Novos
265 cortes ultrafinos (70 nm) foram corados com acetato de uranil, seguido de citrato
266 de chumbo e examinadas. Os folículos primordiais presentes nas amostras
267 selecionadas foram analisados e fotografadas com aumentos entre 12.500X e
268 30.000X usando Câmera Megaview III.

269 Em relação às modificações ultraestruturais nos tecidos foram avaliados
270 apenas folículos primordiais. Estes foram avaliados quanto à integridade das
271 membranas basal e citoplasmática, presença e densidade de mitocôndrias, outras
272 organelas e nucléolo. Também foi avaliada a presença, posição e morfologia das
273 células da granulosa bem como a integridade de suas membranas. A integridade
274 dos FOPAs foi analisada de modo comparativo, para os diferentes grupos
275 experimentais.

276

277 *2.9. Análise estatística*

278 Inicialmente a distribuição das variáveis foi analisada. O número de folículos
279 viáveis com VN foi transformado para a escala log para atingir a normalidade.
280 Uma análise de variância multivariada para medidas repetidas (PROC MIXED,
281 SAS Institute, 2011) foi utilizada para comparar o número médio de folículos entre
282 os tratamentos e momentos. Um termo de interação entre tratamento e momento
283 foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre
284 tratamentos foi dependente do momento analisado. Uma estrutura de covariância
285 auto-regressiva foi usada para modelar a correlação entre as medidas obtidas

dentro do mesmo animal. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores de P resultantes de comparações múltiplas.

Para estudo do efeito da vitrificação sobre o número de folículos primordiais intactos (CFN) dentro de cada tempo foi ajustado um modelo linear generalizado com resposta binomial negativa utilizando função de ligação logarítmica e considerando medidas repetidas [13, 14]. As comparações foram feitas usando o LS Means do procedimento Proc Genmod do programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3, licenciado para a Universidade Estadual Paulista, UNESP). A qualidade do ajuste foi verificada através dos desvios por grau de liberdade (scaled deviance). Para todas as análises o nível de significância estatística foi definido em $P \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Viabilidade de FOPAs avaliados pelo vermelho neutro

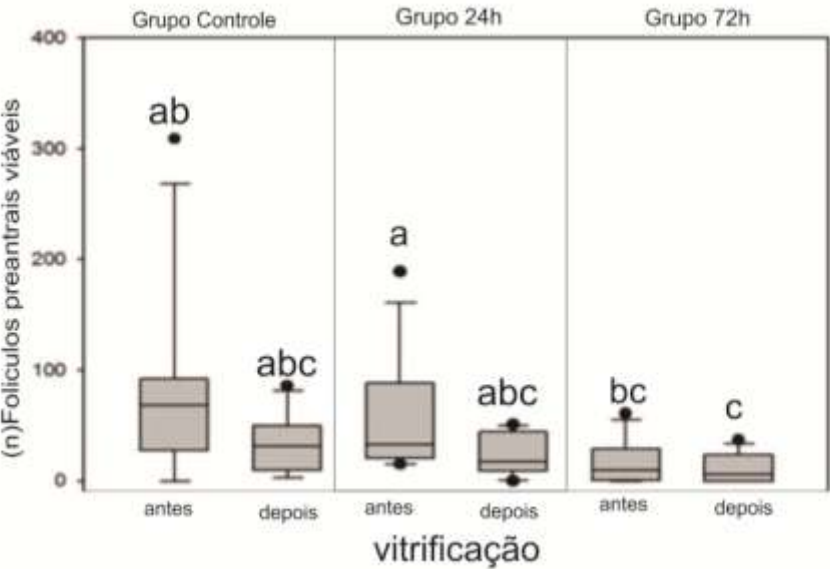
Os resultados de viabilidade de FOPAs inclusos em ovários de gatas domésticas e corados com vermelho neutro estão descritos na Tabela 1 e Fig. 4.

Com respeito ao processo de refrigeração foi evidenciada a seguinte relação entre os grupos: controle = 24h $\neq$ 72h = controle. Após a desvitrificação das amostras não houve diferença entre os grupos. Não foi observado efeito significativo da vitrificação dentro de cada tempo quando os grupos foram analisados isoladamente. Na comparação entre os grupos (controle x 24 horas x 72 horas) foi observada diferença significativa entre o controle/pré e 72 horas/pós ($P=0,0143$) e grupo 24h/pré com 72h/ pré ($P=0,0357$) e pós-vitrificação ($P=0,0092$).

Tabela 1. Número de FOPAs inclusos viáveis corados com vermelho neutro nos grupos controle, 24 e 72 horas, pré e pós-vitrificação, em amostras de mesmo tamanho (2 mm) de córtex ovariano de gata doméstica. (Média± Desvio Padrão).

	Pré- Vitrificação			Pós-Vitrificação		
Refrigeração (4°C)	controle	24h	72h	controle	24h	72h
Média±DP	83±85 ^{ab}	56±51 ^a	16±19 ^{bc}	34±26 ^{abc}	23±18 ^{abc}	11±13 ^c

309 Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística entre Grupos controle e
310 experimentais após a refrigeração e vitrificação (n 12, p>0,05).



311
312 **Fig. 4.** Box plot representando a viabilidade de folículos pré-antrais inclusos no
313 tecido cortical ovariano de gatas domésticas, em amostras de 2 mm, antes e após
314 a vitrificação, corados com vermelho neutro (mediana, percentis e out layers),
315 n=12, P<0,05.

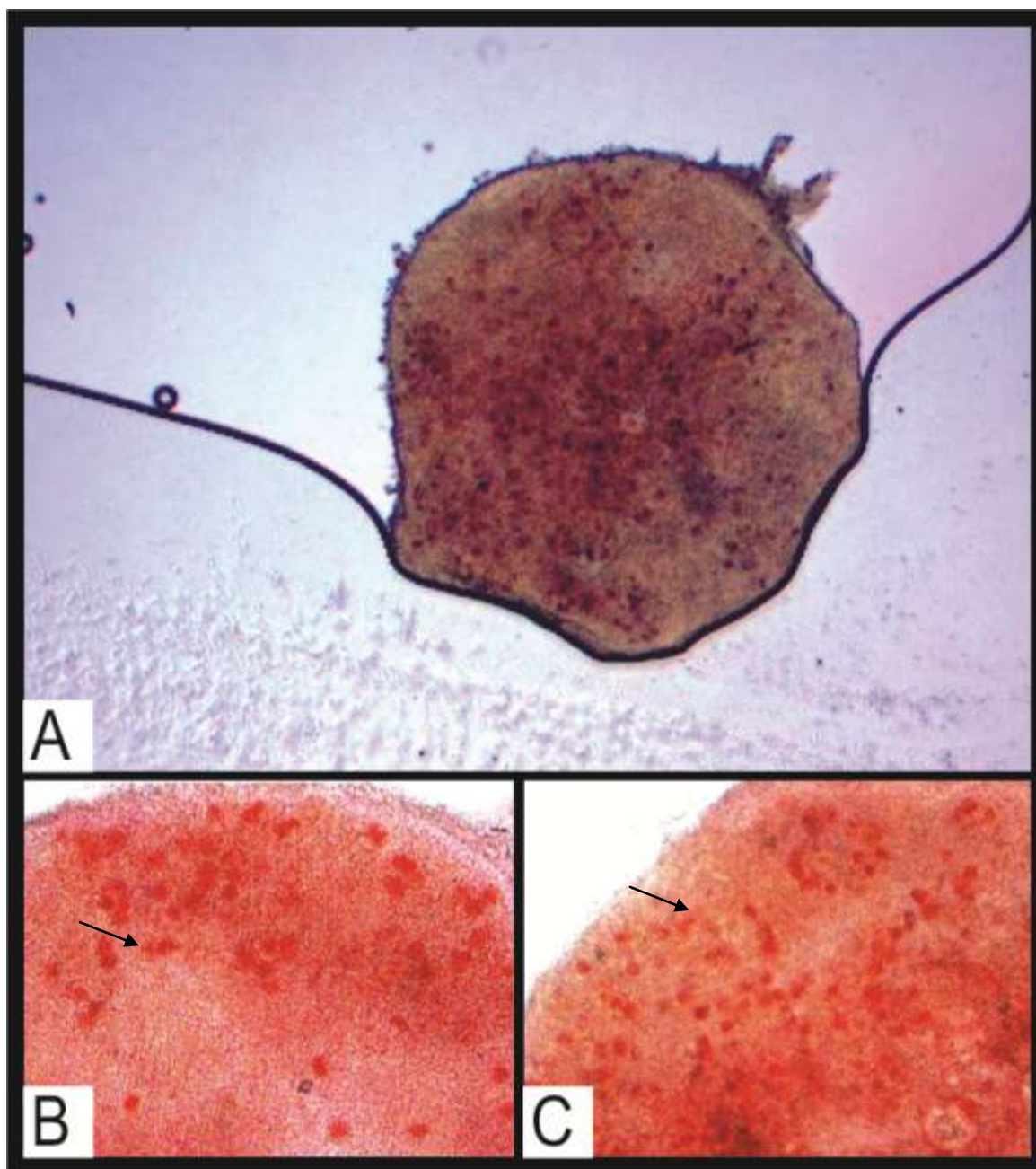


Fig. 5 - Fotomicrografia de amostras de tecido cortical ovariano de gatas domésticas após a vitrificação (reaquecidos) contendo FOPAs corados com vermelho neutro. **A.** Visão total da peças de 2mm do grupo controle, aumento 200X. **B.** Visão parcial da peça de 2mm do grupo 24h, aumento 400X. **C.** Visão parcial da peça de 2mm do grupo 72h, aumento 400X.

Quando os tempos foram agrupados em pré e pós vitrificação foi observada diferença significativa ($p=0,0276$), sendo evidenciado o efeito da vitrificação sobre a viabilidade folicular média (tabela 2).

Tabela 2. Número de FOPAs inclusos viáveis marcados com vermelho neutro agrupados em pré e pós-vitrificação em amostras de mesmo tamanho (2mm) de córtex ovariano de gata doméstica (média $\pm$ desvio padrão).

Tempos de refrigeração - agrupados		
	Pré-Vitrificação (Controle+24h+72h)	Pós-Vitrificação (Controle+24h+72h)
Média $\pm$ DP	52 $\pm$ 63 ^a	23 $\pm$ 21 ^b

Letras diferentes (^{ab}) indicam diferença estatística entre Grupos antes e após a vitrificação (n 36, $p<0,05$).

3.2. CFN - Histologia

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos e tempos do CFN das 6 amostras histológicas analisadas (Tabela 3 e Fig. 5).

Tabela 3. Efeito da Vitrificação sobre o total de FOPAs intactos (CFN) contados em amostras histológicas coradas com hematoxilina eosina em amostras de tecido cortical do mesmo tamanho (2mm) de córtex ovariano de gata doméstica. (Média $\pm$ Desvio Padrão).

Tempo de Refrigeração (4°C)	Pré Vitrificação			Pós Vitrificação		
	Controle	24h	72h	Controle	24h	72h
Média ($\pm$ DP)	138 ($\pm$ 243) ^a	107 ($\pm$ 93) ^a	137 ($\pm$ 194) ^a	201 ($\pm$ 273) ^a	68 ($\pm$ 108) ^a	31,5 ($\pm$ 34) ^a

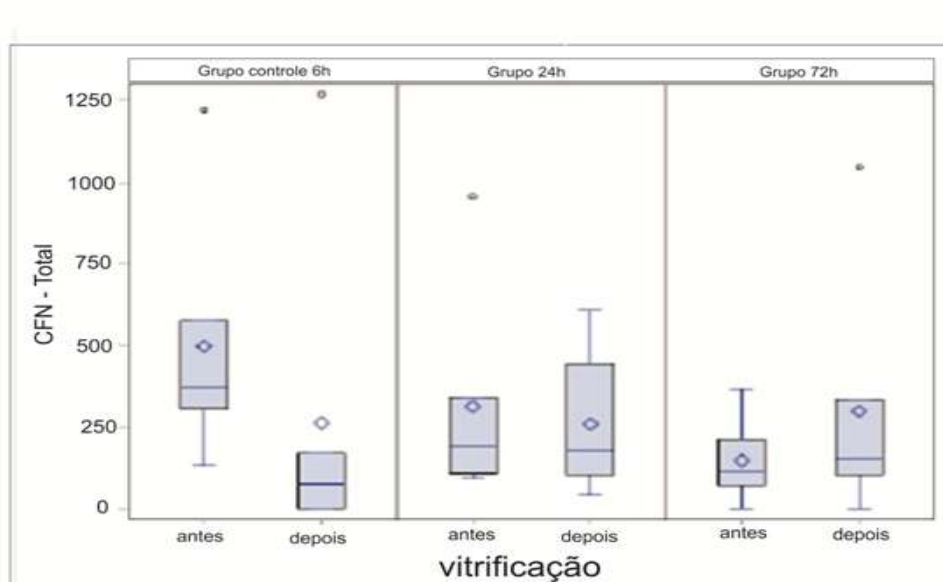


Fig. 6. Box plot do total de folículos pré-antrais íntegros (CFN) de gatas domésticas em peças de 2mm antes e após a vitrificação, corados com hematoxilina e eosina (mediana, percentis e *out layers*). n=6, P>0,05. Não houve diferença entre grupos.

3.3. Microscopia eletrônica de transmissão

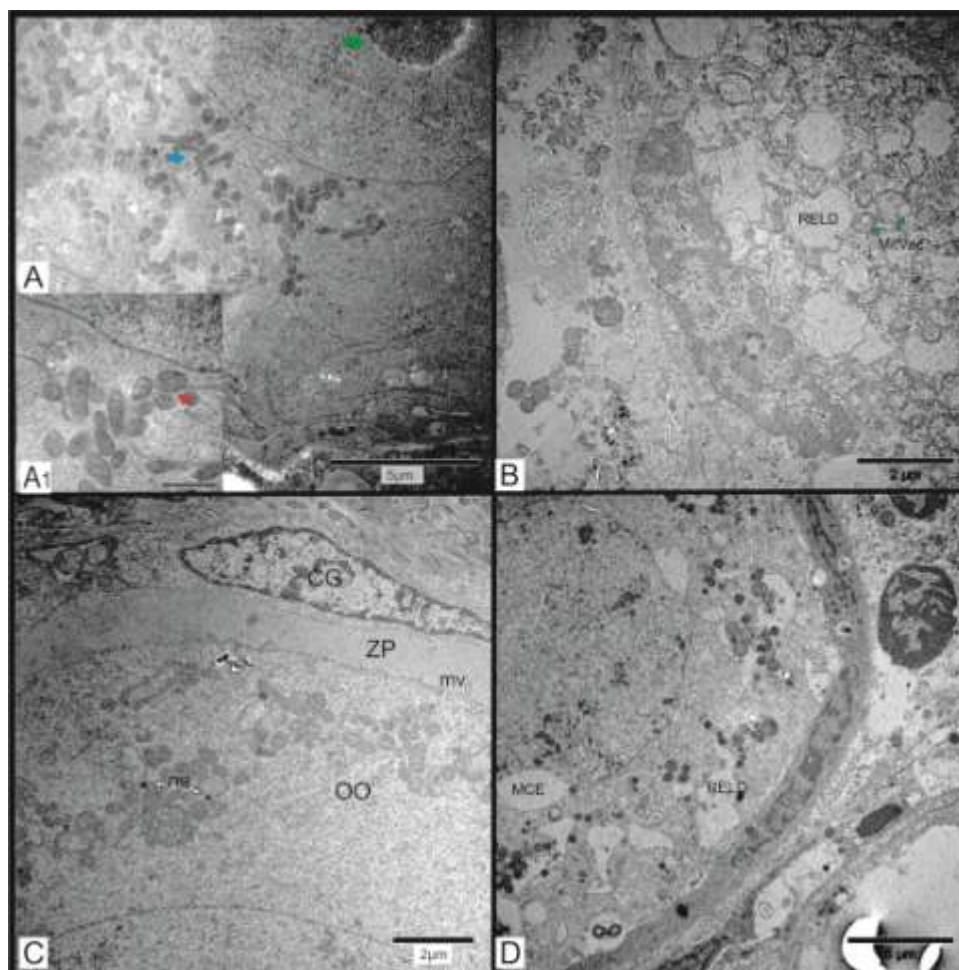
3.3.1. Pré-vitrificação

No grupo controle foram observados folículos íntegros com cromatina condensada (Fig. 7A). Uma das amostras apresentava-se com retículo endoplasmático rugoso rodeado de mitocôndrias (Fig. 7A1). As mitocôndrias apresentavam-se em formato lobular e redondo, com cristas claras e dupla membrana (Fig. 7A1). Células da pré-granulosa apresentavam morfologia normal e o folículo com todas as membranas íntegras (Fig. 8A). No grupo 24h foi observada a preservação morfológica das estruturas foliculares estudadas (Fig. 8C). Foram observados oócitos e células da pré-granulosa com morfologia normal,

com presença de zona pelúcida e microvilosidades (Fig. 7C). Após 72h de refrigeração as amostras apresentavam membranas de oócitos e células da pré-granulosa rompidas, com citoplasma desorganizado (Fig. 8E). Observação de vacuolização das mitocôndrias e dilatações do retículo endoplasmático liso (Fig. 7B).

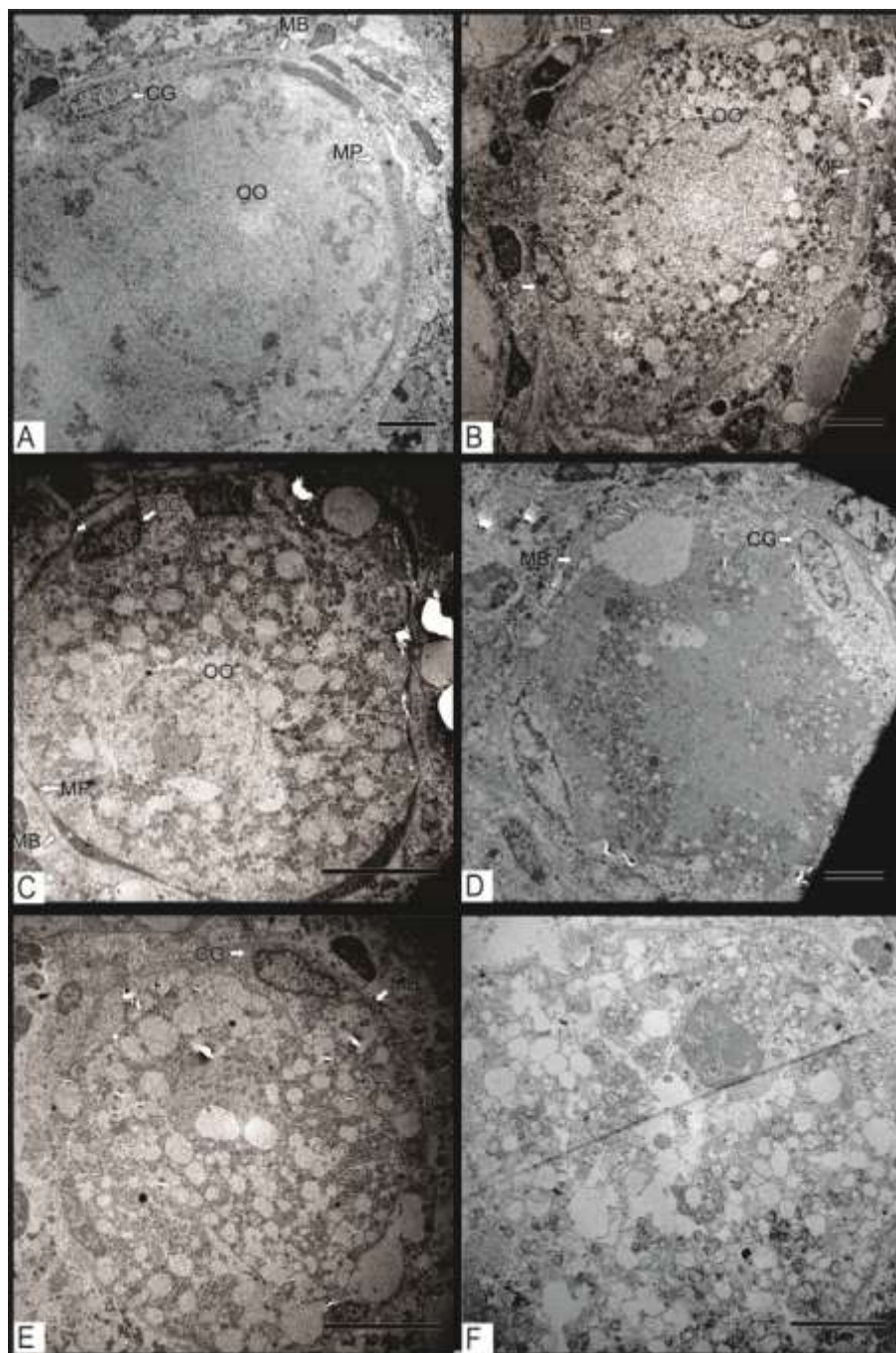
3.3.2. Pós-vitrificação

As amostras de microscopia eletrônica descongeladas do grupo controle mostraram uma boa preservação de todas as estruturas celulares (Fig. 8B). Foram observados FOPAs com leve ondulação da membrana basal e discreta perda de estrutura folicular e do arranjo entre células da granulosa e oócito. As mitocôndrias apresentaram perda das cristas e os retículos endoplasmáticos lisos estavam com dilatação das cisternas. A carioteca apresentou-se ondulada. Observou-se uma preservação melhor do oócito do que das células da granulosa (Fig. 8B). Nas amostras do grupo 24 horas o folículo apresentava-se com dilatação do espaço perivitelineo e dilatações do retículo endoplasmático liso (Fig. 7D). Observação de folículo com a membrana basal íntegra, porém, severa desorganização do citoplasma e organelas celulares (Fig. 8D). Amostras do grupo 72h exibiram completa desorganização folicular (Fig. 8F).



371

372 **Fig. 7.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais ovarianos
 373 de gatas domésticas. **A.** Cromatina condensada (seta verde), mitocôndrias
 374 íntegras com boa morfologia (seta azul) do grupo controle. **A1.** Retículo
 375 endoplasmático rugoso rodeado por mitocôndrias (seta vermelha), das amostras
 376 do grupo controle. **B.** Retículo endoplasmático liso dilatado (RELD), mitocôndrias
 377 vacuolizadas (MitVac, setas verdes), das amostras do grupo 72h. **C.** Zona
 378 pelúcida (ZP) entre oócito (OO) e células da granulosa (CG), das amostras do
 379 grupo 24h com presença de microvilosidades (mv). **D.** Membrana carioteca
 380 expandida (MCE) Retículo endoplasmático liso dilatado (RELD), das amostras do
 381 grupo 24h.



382

383 **Fig. 8.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de folículos primordiais de gatas
 384 domésticas. Visão total da composição dos foliculos primordiais: OO=Oócito; CG=
 385 Célula da Granulosa; MP=Membrana Plasmática do Oócito; MB= Membrana
 386 Basal do Folículo. **A.** Grupo controle pré-vitrificação. **B** Grupo controle pós-

387 vitrificação. **C.** Grupo 24h pré-vitrificação. **D.** Grupo 24h pós-vitrificação. **E.** Grupo
388 72h pré-vitrificação. **F.** Grupo 72h pós-vitrificação.

389 **4. Discussão**

390 No presente experimento, um conjunto de técnicas foi selecionada para
391 avaliar os FOPAs inclusos depois da refrigeração e da vitrificação em seus
392 aspectos morfológicos e funcionais. A coloração com HE, para avaliação
393 histológica, e a microscopia eletrônica de transmissão foram utilizadas com o
394 propósito de subsidiar as análises morfológicas. O vermelho neutro, com base em
395 estudo preliminar [31], foi usado como bio-indicador de viabilidade dos FOPAs.

396 Atualmente existem algumas opções para a se avaliar a viabilidade celular
397 de FOPA em tecido cortical. Técnicas histológicas, incluindo a imunohistoquímica,
398 e técnicas de fluorescência, são importantes, mas sempre pressupõem a morte
399 celular. Estas técnicas são relevantes, embora não permitam um monitoramento
400 seriado de uma mesma célula, ou conjunto de células, cronologicamente no
401 tempo, sem que se comprometa sua viabilidade.

402 Já foi demonstrado que a técnica de vitrificação tem algumas vantagens
403 sobre os protocolos de congelação lenta para serem aplicados na criopreservação
404 de tecido cortical ovariano. Além do baixo custo, portabilidade e praticidade, a
405 viabilidade de FOPAs após reaquecimento é melhor em amostras desvitrificadas
406 do que em amostras descongeladas, principalmente no que tange a preservação
407 da interação entre oócito e células da granulosa [7].

408 A relação entre a área e a superfície celular influencia no tempo para se
409 estabelecer o balanço osmótico com as soluções crioprotetoras [24]. Isto significa

410 que quanto menor for o tamanho e a área da célula, mais rápido será o
411 estabelecimento deste equilíbrio. FOPAs são estruturas formadas por um conjunto
412 de células pequenas. Estas células estão em estado de semi- quiescência, com
413 baixo metabolismo. O oócito primário do folículo primordial não apresenta eixo
414 metafásico [25]. Estas condições combinadas supostamente conferem uma maior
415 crio-resistência a estas estruturas. No entanto, a criopreservação de tecidos é
416 tecnicamente mais complexa e depende não somente da criotolerância e
417 sensibilidade do gameta à congelação, mas também das características das
418 células somáticas ovarianas. A interação entre o oócito e as células da granulosa
419 deve ser mantida a fim de preservar da integridade funcional do tecido e do
420 folículo, após o reaquecimento [26].

421 O protocolo utilizado, adaptado de Keros et al. (2009), utilizou uma
422 combinação de quatro crioprotetores (DMSO, etilenoglicol, propanodiol e PVP) até
423 uma concentração final de 40%. Observamos que houve FOPAs viáveis em
424 todas as amostras (Fig. 3), o que sugere que essas combinações de crioprotetores
425 proporcionou um equilíbrio adequado para proteção dos diferentes tipos celulares
426 e suas crio-sensibilidades específicas, garantindo a sobrevivência de oócitos e
427 células da granulosa. Conforme já descrito na literatura [27] a toxicidade global
428 pode ser reduzida pelo uso combinado de diferentes crioprotetores. Apesar de sua
429 alta concentração final (40%) de crioprotetores no protocolo utilizado, o tempo de
430 5 minutos mostrou um aparente bom equilíbrio entre crioproteção e citotoxicidade.

431 Estudos morfométricos prévios conjecturam que o recrutamento folicular
432 pode ser realizado com base na ordem em que os FOPAs foram formados [29].

433 Outros estudos sugerem que mecanismos de nutrição, como veias, e proximidade
434 de terminações nervosas, bem como a proximidade de grandes folículos e de
435 corpos lúteos são importantes nesse processo [30]. Este recrutamento e
436 crescimento folicular abrem a matriz tecidual do ovário e mudam constantemente
437 a posição e a distribuição de FOPAs no córtex ovariano. A densidade de FOPAs
438 no córtex é influenciada também pela idade. Todos estes fatores em conjunto
439 contribuem para que a distribuição da população de FOPAs do córtex ovariano
440 seja desconhecida. Algumas vezes, num mesmo ovário, é possível encontrar
441 amostras de tecido com um bom número de FOPAs e amostras sem nenhum
442 FOPA. Isto produz uma grande variação na contagem de FOPAs nas amostras de
443 2 mm, demonstrada pelos desvios padrões altos encontrados nos grupos controle
444 e experimentais desta pesquisa (Tabelas 1 e 3).

445 O impacto da refrigeração sobre a viabilidade folicular média analisada com
446 VN foi percebido estatisticamente entre os grupos 24 h e 72h. Na comparação do
447 numero de FOPAs dentro de cada grupo (controle, 24h e 72h) não foi observada
448 diferença significativa entre antes e depois da vitrificação, não sendo detectado
449 estatisticamente nenhum efeito do procedimento de vitrificação sobre a viabilidade
450 folicular média. Quando os tempos foram agrupados em pré (controle + 24h + 72h)
451 e pós (controle + 24h + 72h) vitrificação, foi observada diferença estatística
452 ($P=0,0276$) (Tabela 2). Na prática esta informação indica que o efeito da
453 vitrificação só foi detectado, quando as perdas de viabilidade folicular dos grupos
454 se somaram e então foram detectadas pela prova estatística.

455 Não foi observada diferença estatística entre os grupos diferentes tempos
456 da análise CFN (Tabela 3 e Fig. 5). Um reduzido número de animais do CFN
457 (n=6) e a grande variação no número de FOPAs por amostra também pode ter
458 ajudado a mascarar eventuais diferenças estatísticas entre os grupos. A diferença
459 dos resultados estatísticos entre VN e CFN na contagem de FOPAs pode reforçar
460 que as análises morfológicas e de viabilidade, medem parâmetros diferentes, não
461 totalmente dependentes entre si, respondendo questões diferentes e
462 complementares.

463 Foi observado durante a contagem de FOPAs, na avaliação histológica, a
464 presença de FOPAs corados e não corados com VN (Fig. 6B), ambos com
465 morfologia considerada normal. Isso sugeriu que existem células que podem estar
466 com a morfologia normal, mas não vivas, ou metabolicamente ativas. Esta
467 observação sugere que parâmetros morfológicos isoladamente podem favorecer
468 uma sobre estimativa do número médio de FOPAs viáveis.

469 Nas análises de microscopia eletrônica, as descrições do estudo de Carrijo
470 et al. (2010) [33] sobre os aspectos ultraestruturais de folículos primordiais de
471 gatas foram confirmados nas observações deste estudo, sobretudo na descrição
472 do formato e distribuição das mitocôndrias e pela situação das membranas dos
473 folículos. Foram observados folículos com as estruturas celulares preservadas em
474 amostras desvitrificadas do grupo 24 horas. O número reduzido (2) de amostras
475 analisadas limitou o detalhamento dos efeitos da vitrificação em folículos
476 primordiais em nível sub-celular.

477 Embora tenham sido encontrados FOPAs viáveis (VN) (Fig. 4C) e íntegros
478 (CFN) (Fig. 6D) após a desvitrificação de amostras do grupo 72 horas, quando
479 agregamos as observações da HE e TEM, pudemos sugerir que este tempo foi
480 demasiado prolongado, onde as células apesar de viáveis e íntegras, podem já
481 estar lesadas de maneira irreversível ou iniciando a apoptose, sem que nenhum
482 sinal morfológico de degeneração tenha sido observado, diminuindo muito as
483 chances de se encontrar FOPAs vivos.

484 A prova final do sucesso de um procedimento de criopreservação de tecido
485 ovariano, que não seja o nascimento de filhotes vivos, é o crescimento de FOPAs
486 após o xenotransplante desse tecido para um hospedeiro imunodeficiente. Este
487 procedimento já foi demonstrado em humanos e animais, incluindo o gato
488 doméstico [28]. No entanto, o alo, auto ou xenotransplante são técnicas muito
489 caras, que consomem muito tempo e exigem uma estrutura laboratorial complexa.
490 O transplante tecidual é aceitável para efetivamente ajudar na reprodução de
491 humanos e espécies ameaçadas, mas é muito difícil de ser inserida na rotina de
492 pesquisa.

493 A ausência de observação de diferença significativa no número médio de
494 FOPAs viáveis de-vitrificados entre amostras dos grupos controle e do grupo 24h
495 constituiu o principal achado deste experimento. Aqui se compatibilizam duas
496 questões importantes nas estratégias de coleta de materiais para banco genético
497 de tecidos corticais ovarianos de felídeos ameaçados de extinção: O transporte
498 refrigerado dos ovários por até 24 horas permitindo transpor grandes distâncias; e
499 uma técnica de vitrificação do córtex ovariano, compatível com condições a

500 campo. Desta maneira, podemos sugerir que a técnica de refrigeração por 24
501 horas seguida de vitrificação, usando os protocolos descritos, foram adequadas
502 para a preservação da morfologia e viabilidade dos FOPAs de gatas.

503

504 **Agradecimentos**

505 Agradecemos o suporte financeiro e as bolsa de estudo cedidas pela
506 CAPES e Programa Ciências sem Fronteiras. Agradecemos também o apoio da
507 FMVZ UNESP de Botucatu e IZW – Leibinz Institut de Berlin.

508 **Referências**

509 [1] J.D. Ballou, Strategies for Maintaining Genetic Diversity in Captive Populations
510 through Reproductive Technology. Zoo Biology. 3 (1984) 311-323.

511

512 [2] D. Wildt, B. Pukazhenth, J. Brown, S. Monfort, J. Howard, T. Roth,
513 Spermatology for understanding, managing and conserving rare species.
514 Reproduction and Fertility Development. 7 (1995) 811-824.

515

516 [3] K. Jewgenow, C. Wiedemann, M.F. Bertelsen, J. Ringleb, Cryopreservation of
517 mammalian ovaries and oocytes. International Zoo Yearbook. 45 (2011) 124-132.

518

519 [4] S.M. Downs, Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that
520 nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. Molecular Reproduction
521 Development. 35 (1993) 82-94.

522

523 [5] C. Thinbault, Hammond Memorial Lecture. Are follicular maturation and oocyte
524 maturation independent processes? Journal of Reproduction and Fertility. 51
525 (1997) 1-15.

526

527 [6] W.F. Rall, G.M. Fahy, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196
528 degrees C by vitrification. Nature. 313 (1985) 573-575.

529

- 530 [7] V. Keros, S. Xella, K. Hultenby, K. Petersson, M. Sheikhi, A. Volpe, J.
531 Hreinsson, O. Hovatta, Vitrification versus controlled-rate freezing in
532 cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*. 24 (2009) 1670-
533 1683.
- 534
- 535 [8] C.Y. Andersen, M. Rosendahl, A.G. Byskov, A. Loft, C. Ottosen, M. Dueholm,
536 K.L. Schmidt, A.N. Andersen, E. Ernst, Two successful pregnancies following
537 autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*. 23
538 (2008) 2266–2272.
- 539
- 540 [9] T. Ishijima, Y. Kobayashi, D.S. Lee, Y.Y. Ueta, M. Matsui, J.Y. Lee, Y. Suwa,
541 K. Miyhara, H. Suzuki, Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J*
542 *Reprod. Dev.* 52 (2006) 293–299.
- 543
- 544 [10] G.C. Luvoni, I. Tessaro, M. Apparicio, E. Ruggeri, A.M. Luciano, S.C. Modina,
545 Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and
546 competence. *Reprod Domest Animal*. 47 (2012) 385-91.
- 547
- 548 [11] M. Cleary, M.C. Paris, J. Shaw, G. Jenkin, A. Trounson, Effect of ovariectomy
549 and graft position on cryopreserved common wombat (*Vombatus ursinus*) ovarian
550 tissue following xenografting to nude mice. *Reproduction, Fertility and*
551 *Development*. 15 (2003) 333–342.
- 552

- 553 [12] M.C. Paris, M. Snow, S.L. Cox, J.M. Shaw, Xenotransplantation: a tool for
554 reproductive biology and animal conservation? *Theriogenology*. 61(2004) 277–291.
555
- 556 [13] K. Jewgenow, M. Paris, Preservation of female germ cells from ovaries of cat
557 species *Theriogenology*. 66 (2006) 93–100.
558
- 559 [14] M.C. Paris, S. Schlatt, Ovarian and testicular tissue xenografting: its potential
560 for germline preservation of companion animals, non-domestic and endangered
561 species. *Reproduction, Fertility and Development*. 19 (2007) 771–782.
562
- 563 [15] D.E. Wildt, Endangered species spermatozoa: diversity research and
564 conservation. In: Bartke, A. (ed.) *Function of somatic cells in the testis*. Springer-
565 Verlag Inc., New York, NY, 1994.
566
- 567 [16] K. Jewgenow, S. Blottner, T. Lengwinat, H.H. Meyer, New methods for gamete
568 rescue from gonads of nondomestic felids. *J Reprod Fertil Supplement*. 51 (1997)
569 33-39.
570
- 571 [17] W.F. Swanson, Application of assisted reproduction for population
572 management in felids: the potential and reality for conservation of small cats.
573 *Theriogenology*. 66 (2006) 49-58.
574

575 [18] P. Comizzoli, W.V. Holt, Recent advances and prospects in germplasm
576 preservation of rare and endangered species. *Advances Experimental Medicine*
577 *Biology*. 753 (2014) 331-356.

578

579 [19] D.E. Wildt, Genetic Resource Banks for Conserving Wildlife Species -
580 Justification, Examples and Becoming Organized on a Global Basis. *Animal*
581 *Reproduction Science*, 28 (1992) 247-257.

582

583 [20] W.F. Swanson, D.E. Wildt, Strategies and progress in reproductive research
584 involving small cat species. *Int Zoo Yearbook*. 35 (1997) 152-159.

585

586 [21] B.S. Pukazhenthil, K. Neubauer, K. Jewgenow, J. Howard, D.E. Wildt, The
587 impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild
588 relatives. *Theriogenology*. 66 (2006) 112-121.

589

590 [22] C.E. Pope, G.L. Keller, B.L. Dresser, In vitro fertilization in domestic and
591 nondomestic cats including sequences of early nuclear events, development in-
592 vitro, cryopreservation and successful intraspecies and interspecies embryo-
593 transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47 (1993) 189-201.

594

595 [23] J.L. Brown, Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids.
596 *Theriogenology*. 66 (2006) 25-36.

597

598 [24] J.K. Critser, Y. Agea, K.T. Gunasena, The cryobiology of mammalian oocytes.
599 Reproductive Tissue Banks. Editor: A.M. Karow, J.K. Crister, Scientific Principle,
600 San Diego CA. Academic press, 1997, pp. 329-357.

601

602 [25] O. Hovatta, Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. Reprod
603 Biomed Online. 10(6) (2005) 729-734.

604

605 [26] G. Luvoni, Gamete cryopreservation in the domestic cat. Theriogenology. 66
606 (2006) 101-111.

607

608 [27] G.M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, S. Paynter, Improved vitrification solutions based
609 on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology. V.48, p.22–35.
610 2004.

611

612 [28] P. Bosch, H.J. Hernandez-Fonseca, D.M. Miller, J.D. Wininger, J.B. Massey,
613 S.V. Lamb, B.G. Brackett, Development of antral follicles in cryopreserved cat
614 ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. Theriogenology. 61 (2004)
615 581-594.

616

617 [29] A.N. Hirshifield, Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev
618 Cytol. 124 (1991) 43-110.

619

- 620 [30] G.S. Greenwald, P.F. Terranova, Follicular selection and its control. In:
621 KNOBIL, E, NEIL, J et al.(Eds): The Physiology of Reproduction, 1988.
622
- 623 [31] MARTINS, J.L.A., LOPES, M.D., PASSOS, J. R. JEWGENOW, K Use of
624 Neutral Red like a biomarker for cat pré-antral follicle. CHILE - Santiago Simposio
625 Latino Americano de Reproducion Animal - November/ 2014. COD ABSTRACT:
626 QC833PG
627
- 628 [32] E.P.A. Langbeen, E. Jorssen, A.P.A. Fransen, M. Rodriguez, C. García,
629 J.L.M.R. Leroy ,P.E.J. Bols. Characterization of freshly retrieved pré-antral follicles
630 using a low-invasive, mechanical isolation method extended to different ruminant
631 species. Cambridge University Press. (2014) 1-12.
632
- 633 [33] O.A. Carrijo Jr., A.P.S. Marinho, A.A. Campos, C.A. Amorim, S.N. Bão, C.M.
634 Lucci, Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian pré-antral follicle
635 population in queens. Cells Tissues Organs. 191 (2010) 152-160.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES FINAIS

O VN mostrou-se um corante adequado para a quantificação e avaliação da viabilidade de FOPAs isolados e inclusos no córtex ovariano de gatas domésticas. Segundo os resultados apontados pelas provas realizadas com VN e TB, o período de 24 horas de refrigeração a 4°C, não compromete a porcentagem de folículos isolados, nem o número total de FOPAs viáveis presentes em tecido cortical ovariano de gatas.

A não observação de diferença significativa de FOPAs viáveis entre amostras devitrificadas, do Grupo 24/pós e grupo Controle pré e pós constitui o principal achado deste experimento. Aqui se compatibilizam duas questões importantes nas estratégias de coleta de materiais para banco genético de tecidos corticais ovarianos de felídeos ameaçados de extinção: O transporte refrigerado por até 24 horas permitindo transpor grandes distâncias, e uma técnica de vitrificação, compatível com condições a campo. Desta maneira, podemos sugerir que a técnica de refrigeração por 24 horas seguida de vitrificação, usando os protocolos descritos, foi adequada para a preservação da morfologia e viabilidade dos FOPAs de gatas.

Os resultados relacionados ao transporte refrigerado e vitrificação abrem possibilidades para o início imediato de multiplicação desta técnica a fim de qualificar zoológicos e profissionais que trabalhem em áreas naturais visando o encaminhamento de ovários de animais mortos, de modo que se inicie, o quanto antes, a preservação deste precioso material genético através de crio-bancos de tecido cortical ovariano de espécies de felídeos ameaçados de extinção no Brasil e no Mundo.

REFERÊNCIAS:

ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol.*, v. 21, p.887-98, 2006.

ALVES, K. A. Isolamento e Criopreservação de Folículos Pré-antrais Caninos. . 2010. 55f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

ANDERSEN, C. Y.; ROSENDAHL, M.; BYSKOV, A. G.; LOFT, A.; OTTOSEN, C.; DUEHOLM, M.; SCHMIDT, K. L.; ANDERSEN, A. N.; ERNST, E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reprod.* v. 23, p.2266–2272, 2008.

BALLOU, J. D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, v.29, p.19-25, 1992.

BALLOU, J. D. Strategies for Maintaining Genetic Diversity in Captive Populations through Reproductive Technology. *Zoo Biology*, 3, 311-323, 1984.

BARBIERI, R. L.; MARKIS, A.; RYAN, K. J. Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. *Fertil Steril*, v.40, p.237-41, 1983.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K. D.; DURRANT, B. S. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced pré-antral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49, 933-42, 1998.

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.581-94, 2004.

BOSMA, G. C.; DAVISSON, M. T.; RUETSCH, N. R.; SWEET, H. O.; SHULTZ, L. D.; BOSMA, M. J. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics*, v. 29(1), p. 54-7, 1989.

BOSMA, G. C.; CUSTER, R. P.; BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, v.301(5900), p. 527-30, 1983.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.

BRITT JH. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Bov Pract*, 24:39-43, 1991.

BROWN J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology*, v.66, p.25-36 2006.

CANDY, C. J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D. G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod*, v.10, p.2334-2338, 1995.

CARRILLO, E., SAENZ, J., FULLER, T. 2009. Interbirth interval of a free-ranging jaguar. Testing multiple paternity in a wild jaguar. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Biota Neotrop.*, v. 14(3), p.1–5, 2014.

CARRIJO Jr., O.A., MARINHO, A.P.S., CAMPOS, A.A., AMORIM, C.A., BÃO, S.N., LUCCHI, C.M. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian pré-antral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, v.191, p. 152-160, 2010.

CELESTINO, J. J.; SANTOS, R. R.; MELO, M. A.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Vitrification of bovine ovarian tissue by the solid-surface vitrification method. *Biopreserv Biobank.*, v. 4, p. 219-21, 2010.

CLEARY, M.; SNOW, M.; PARIS, M.; SHAW, J.; COX, S.L.; JENKIN, G. Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an ischemic environment. *Cryobiology*, 42, 121–133, 2001.

COMMIN, L.; BUFF, S.; ROSSET, E.; GALET, C.; ALLARD, A.; BRUYERE, P.; JOLY, T.; GUÉRIN, P.; NETO, V. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. *Reprod Fertil Dev*, 24(3), p 461-71, 2012.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W. V. Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Advances Experimental Medicine Biology*. v.753, p. 331-356, 2014.

COMIZZOLI, P.; PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. The competence of germinal vesicle oocytes is uVNelated to nuclear chromatin configuration and strictly depends on cytoplasmic quantity and quality in the cat model. *Hum Reprod.*, 26(8), p. 2165-77. 2011.

CRITSER, J.K.; AGEA, Y.; GUNASENA, K. T. *The cryobiology of mammalian oocytes*. *Reproductive Tissue Banks*. Editor: Karow, AM, Crister JK. Scientific Principle, San Diego CA. Academic press. P. 329-357. 1997.

DANIEL, S. A.; ARMSTRONG, D. T.; GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Res.*, v. 24(1), p. 109-121, 1989.

DEMEESTERE, I.; DELBAERE, A.; GERVY, C. Effect of pré-antral follicle isolation technique on follicular growth, oocyte maturation and fertilization in vitro in the mouse. *Hum. Reprod.* v.15:(Abst. book 1), p.89–90, 2000.

DESBIEZ, A. L. J. *Introdução à revisão do status de ameaça (IUCN Red List)*. In: Workshop para a conservação da onça-pintada *Panthera onca*. Relatório final. CENAP. 135p, 2010.

DIRZO, R.; YOUNG, H.S.; GALLETTI, M.; CEBALLOS, G.; ISAAC, N.J.B.; COLLEN, B. Defaunation in the Anthropocene. Review. *Science*, v.345, p. 401 – 406, 2014.

DISSEN, G. A.; LARA, H. E.; FAHRENBACH, W. H.; COSTA, M. E.; OJEDA, S. R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autografting and show a gonadotrophin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*, v. 134, p. 1146-1154, 1994.

DOWNS, S. M. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol Reprod Dev*, v.35, p.82-94, 1993.

DURRANT, B. S.; PRATT, N. C.; RUSS, K. D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced pré-antral and early antral follicles. *Theriogenology*, v. 49, p. 917-32, 1998.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. and Endocrinol.*, v.4, p.1-11, 2006.

EIZIRIK, J.; KIM, M.; MENOTTI-RAYMOND, P.G.; CRAWSHAW, J. R.; O'BRIEN, S.J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation

genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae) *Molecular Ecology*, v.10, p. 65–79, 2001.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M.; WIGGLESWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev*, v.44, p.260-73, 1996.

EPPIG, J. J. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev Biol.*, v. 60(2), p. 371-88, 1977.

FASSBENDER, M.; HILDEBRANDT, T. B.; PARIS, M. C.; COLENBRANDER, B.; JEWGENOW, K. High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. *J Reprod Dev.*, v. 53(5), p. 1023-34, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; VAN DEN HURK R.; ECTORS, F. J.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact pré-antral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, v.40, p.789-99,1993.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; VAN DEN HURK R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; ECTORS, F. J.; BECKERS, J. F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine pré-antral follicles cultured in vitro. *Theriogenology.*, v. 41(6), p. 1333-46, 1994.

FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril*, v.38, p.509-29, 1982.

FUJIHARA, M.; COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E.; SONGSASEN, N. Cat and dog primordial follicles enclosed in the ovarian cortex sustain viability after in vitro

culture on an agarose gel in a protein-free medium. *Reprod Domest Anim*, v. 47 (6), p. 102–108, 2012

GREENWALD, G. S.; MOOR, R. M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J Reprod Fertil*, v.87, p.561-71, 1989.

GREENWALD, G. S.; TERRANOVA, P. F. Follicular selection and its control. In: KNOBIL, E, NEIL, J et al.(Eds): *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, New York, pp. 387-445 (Eds), 1988.

GOUGEON, A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas*, v.30, p.137-42, 1998.

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.

GROB, H. S. Enzymatic Dissection of the Mammalian Ovary. *Science*, v. 146, p.73-4, 1964

GUNASENA, K. T.; LAKEY, J. R. T.; VILLINES, P. M.; BUSH, M.; RAATH, C.; CRITSER, E. S. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.266-275, 1998.

HAYSEN, V.; TIENHOVEN, V. A. *Asdell's Pattern of Mammalian Reproduction. A Compendium of Species-specific Data*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1993.

HERNANDEZ-FONSECA, H. J.; BOSCH, P.; MILLER, D. M.; WININGER, J. D.; MASSEY, J. B.; BRACKET, B. G. Time course of follicular development after

bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. *Fertil Steril*, v.83 (1), p.1180-1187, 2005.

HIRAO, Y., NAGAI, T., KUBO, M., MIYANO, T., MIYAKE, M. e KATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, v.100, p.333-9, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v. 124, p.43-101. 1991.

HORII, T.; NAGAO, Y.; TOKUNAGA, T.; IMAI, H. Serum-free culture of murine primordial germ cells and embryonic germ cells. *Theriogenology*, v. 59(5-6), p. 1257-64, 2003.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, v. 10, p. 729 – 734, 2005.

HUANG, J.Y.; TULANDI, T.; HOLZER, H.; TAN, S.L.; CHIAN R.C. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril*, v. 89, p.567-572, 2008.

ISHIJIMA, T., KOBAYASHI, Y., LEE, D.S., UETA, Y.Y., MATSUI, M., LEE, J.Y., SUWA, Y., MIYHARA, K., SUZUKI, H., : Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod. Dev.*, v.52, p.293–299, 2006.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. *IUCN Red List of Threatened Species*. <www.iucnredlist.org>, Acessado em 6 de Setembro de 2009.

JEMMET, J.E.; EVANS, J.M. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *J Small Anim Pract*, v.18, p.31-37, 1977.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small pré-antral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology*, v.49, p.1567-77, 1998.

JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S.; LENGWINAT, T.; MEYER, H. H. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. *J Reprod Fertil Suppl*, v.51, p.33-9, 1997.

JEWGENOW, K.; GORITZ, F. The Recovery of Pré-antral Follicles from Ovaries of Domestic Cats and Their Characterization before and after Culture. *Animal Reproduction Science*, v. 39, p.285-297, 1995.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L. M.; MEYER, H. H.; WILDT, D. E. Viability of small pré-antral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J Reprod Fertil*, 112, 39-47, 1998.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. The Isolation of Pré-antral Follicles from Bovine Ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*, v.26, p.281-289, 1991.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v.39, p.527-35, 1993.

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

JEWGENOW, K.; WIEDEMANN, C.; BERTELSEN, M. F.; RINGLEB, J. Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. *International Zoo Yearbook*, v.45, p.124-132, 2011.

JOHNSTON, L. A., DONOGHUE, A. M., O'BRIEN, S. J. & WILDT, D. E. Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biol Reprod*, v. 45, p. 898-906, 1991.

JUENGEL, J. L.; BIBBY, A. H.; READER, K. L.; LUN, S.; QUIRKE, L. D.; HAYDON, L. J.; MCNATTY, K. P. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod Biol Endocrinol*. v. 25, p. 2:78, 2004.

JUENGEL, J. L.; SAWYER, H. R.; SMITH, P. R.; QUIRKE, L. D.; HEATH, D. A.; LUN, S.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.191, p.1-10, 2002.

KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEITKHIN, M.; VOLPE, A.; HREINSSON, J.; HOVATTA, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, v. 24, p.1670-83, 2009.

KEZELE, P. R.; NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* v. 192, p. 37–43, 2002.

KEZELE, P.; SKINNER, M. K. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, v. 144(8), p. 3329-37, 2003.

KIM, I, GREENWALD, G.S. Hormonal requirements for maintenance of follicular and luteal function in the hypophysectomized cyclic hamster. *Biol Reprod.*, v.5, p.1063-72, 1984.

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 pré-antral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*, New York, v.66, p.1664-1666, 2006.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BAO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine pré-antral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*, v.115, p. 201-214, 2009.

LUVONI, G. C.; TESSARO, I.; APPARICIO, M.; RUGGERI, E.; LUCIANO, A. M.; MODINA, S. C. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.385-91, 2012.

LUVONI, G. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*. V. 66, p. 101-111, 2006.

LUZ, V. B.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B.; CELESTINO, J. J.; SILVA, T. F.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; ALMEIDA, A.P.; CAMPELLO, C. C.; FELTRIN, C; BERTOLINI, M.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Eight-cell parthenotes originated from in vitro grown sheep pré-antral follicles. *Reprod Sci*. v. 19(11), p. 1219-25, 2012.

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

MARTINS, J. L. A.; LOPES, M. D.; JEWGENOW, K. Survival of domestic cat oocytes within ovarian cortex after prolonged storage and vitrification *Anim. Reprod.*, abstract. v.12, n.1, p.129, Jan./Mar. 2015

MARTINS, J. L. A.; LOPES, M. D.; PASSOS, J. R.; JEWGENOW, K. Use of Neutral Red like a biomarker for cat pré-antral follicle. CHILE - Santiago *Simposio Latino Americano de Reproducion Animal* - November/ 2014.

MATTISKE, D.; SHAW, G.; SHAW, J. M. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction*, v.123, p.143-153, 2002.

METCALFE, S. S.; SHAW, J. M.; GUNN, I. M. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCDI) mice. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. V.57, p.323-329, 2001.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCLVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, v.137, p.1-11, 2009.

MCNATHY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.11-20, 2000.

MOTOHASHI, H. H.; SANKAI, T.; KADA, H. Live offspring from cryopreserved embryos following in vitro growth, maturation and fertilization of oocytes derived from pré-antral follicles in mice. *J Reprod Dev.*, v. 57(6), p. 715-22, 2011.

NAGASHIMA, J.; WILDT, D. E.; SONGSASEN, N. Follicle size and gonadotropin concentrations influence in vitro growth of pré-antral dog follicles. *Biol Reprod*, v. 83(1), p. 27, 2010.

NUTTINGK, F.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterisation of in vitro growth of bovine pré-antral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, 39: 811-821, 1993.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J. 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.

PETERS, H.; BYSKOV, A. G.; HIMELSTEIN-BRAW, R.; FABER, M. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil*, v.45, p.559-66, 1975.

PILGRIM, K. I.; MCKELVEY, K. S.; RIDDLE, A. E.; SCHWARTZ, M. K. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Mol Ecol*, v.5, p.60-61, 2005.

POPE, C. E.; KELLER, G. L.; DRESSER, B. L. In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, development in-vitro, cryopreservation and successful intraspecies and interspecies embryo-transfer. *J Reprod Fertil*, 47, 189-201, 1993.

POVEY, R. C. Reproduction in female domestic cats. A study of breeders. *Canadian Vet Journal*, v.19, p.207, 1978.

PUKAZHENTHI, 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, p. 112-21, 2006.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*. v. 313, p. 573–575, 1985.

REYNAUD, K., VIARIS de LESEGNO, C., CHEBROUT, M., THOUMIRE, S., CHASTANT-MAILARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*. V. 72, p.1120-1131, 2009.

REYNAUD, K., FONTBONNE, A., SAINT-DIZIER, M., THOUMIRE, S., MARNIER, C., TAHIR, M.Z., MEYLLEUC, T., CHASTANT-MAILARD, S. Folliculogenesis, Ovulation and Endocrine Control of Oocytes and Embryos in the Dog. *Reprod Dom Anim*. V. 47, p.66–69, 2012.

RODRIGUES, A.R.; EWERS, L. P. C.; SOUZA, A. V.; BALMFORD, A. “Boom-and-bust development patterns across the Amazon deforestation frontier. *Science*, v.324, p.1435–1437, 2009.

ROY, S. K.; GREENWALD, G. S. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology*, v. 126, p.1309-17, 1990.

ROSSETO, R.; LIMA, I. M. T.; VIVIANE, M. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo Pré-antrais. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, p.15-23, 2011.

RUSSEL, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.

SANDHU, J. S.; BOYNTON, E.; GORCZYNSKI, R.; HOZUMI, N. The use of SCID mice in biotechnology and as a model for human disease. *Crit Rev Biotechnol*. v. 16(1), p. 95-118, 1996.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat pré-antral follicles and closed

in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res.*, v. 327(1), p; 167-76, 2007.

SENBON, S.; OTA, A.; TACHIBANA, M.; MIYANO, T. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote*, v.11, p.139-149, 2003.

SENGER, P. L. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2. ed. Ephrata: Current Conceptions, 2003. 371p.

SILVA, J.R.V.; VAN DER HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v.11, p.461-71, 2005.

SMITZ, J.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human Reproduction*, v. 16, p. 395–414, 2010.

SONGSASEN, N.; WOODRUFF, T. K.; WILDT, D. E. In vitro growth and steroidogenesis of dog follicles as influenced by the In Vitro Follicle Development in the Dog and Cat 17 © 2012 Blackwell Verlag GmbH physical and hormonal microenvironment. *Reproduction*, v. 142, p. 113–122, 2011

SONGSASEN, N.; FICKES, A.; PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Follicular Morphology, Oocyte Diameter and Localisation of Fibroblast Growth Factors in the Domestic Dog Ovary. *Reprod Dom Anim*, v. 44(2), p. 65–70, 2009.

SWANSON, W. F. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, v. 66, p. 49-58, 2006.

SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *Int Zoo Yearb*, 35, 152-159, 1997.

SUH, C. S.; JEE, B. C.; CHOI, Y. M.; KIM, J. G.; LEE, J. Y.; MOON, S. Y.; KIM, S. H. Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. *J Assist Reprod Genet.*, v. 19(5), p. 209-14, 2002.

TELFER, E. E.; McLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*, v.23, p.1151-8, 2008.

TELFER, E.; GOSDEN, R.G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammals ovaries with particular reference to domestic bitch (*Canis Familiars*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v.81, p.137-147, 1987.

THINBAULT, C. Hammond Memorial Lecture. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fertil*, v.51, p.1-15, 1977.

TILLY, J. L.; NIIKURA, Y.; RUEDA, B. R. The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism? *Biol Reprod*, v. 80(1), p. 2-12, 2009.

TORRANCE, C.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Quantitative study of the development of isolated mouse pré-antral follicles in collagen gel culture. *J Reprod Fertil*, v.87, p.367-74, 1989.

VAN DER HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKER, J.F. In vitro development of pré-antral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, v.31, p.214-23, 2002.

WANG, X.; CATT ATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction*, 138, 527-535, 2009.

WASSERMAN, P.M. Fertilization in Mammals. *Sci Am*, v.259, p.78-84, 1988.

WEISSMAN, A.; GOTLIEB, L.; COLGAN, T.; JURISICOVA, A.; GREENBLATT, E. M.; CASPER, R. F. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod*, v.60, p.1462-1467, 1999.

WIEDEMANN, C.; ZAHMEL, J.; JEWGENOW, K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Vet Res*, v.9, p. -37, 2013.

WIEDEMANN, C.; HRIBAL, R.; RINGLEB, J.; BERTELSEN, M. F.; RASMUSSEN, K.; ANDERSEN, C. Y.; JEWGENOW, K. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into immunodeficient mouse. *Reprod Domest Anim*, v. 47 (6), 2012.

WILLADSEN, S., POLGE, C., ROWSON, L.E.A. The viability of deep-frozen cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.52, p. 391-393, 1978.

WILDT, D.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J.; ROTH, T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.811-24, 1995.

WILDT, D. E. Genetic Resource Banks for Conserving Wildlife Species - Justification, Examples and Becoming Organized on a Global Basis. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.247-257, 1992.

WILDT, D. E. Endangered species spermatozoa: diversity research and conservation. In: Bartke, A. (ed.) *Function of somatic cells in the testis*. Springer-Verlag Inc., New York, NY, 1994.

WOLVEKAMP, M. C. J.; CLEARY, M. L.; COX, S. L.; SHAW, J. M.; JENKIN, G.; TROUNSON, A. O. Follicular development in cryopreserved common wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. *Anim Reprod Sci*, v. 65, p. 135–47, 2001.

WOOD, T. C.; RICHARD, J. M.; WILDT, D. Follicle–Oocyte Atresia and temporal Taphonomy in Cold-Stored Domestic Cat Ovaries *Molecular Reproduction and Development*. V. 46, p.190–200, 1997.