



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DANIELLE CRISTINA CALADO DE BRITO

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATA
DOMÉSTICA (*FELIS CATUS*): UM MODELO PARA A
PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM FELINOS SILVESTRES**

BELÉM
2016

DANIELLE CRISTINA CALADO DE BRITO

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATA
DOMÉSTICA (*FELIS CATUS*): UM MODELO PARA A
PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM FELINOS SILVESTRES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Bioprospecção.

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à reprodução

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Pieczarka

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regiane Rodrigues dos Santos

**BELÉM
2016**

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Brito, Danielle Cristina Calado de

Vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (*Felis catus*):
um modelo para a preservação da fertilidade em felinos silvestres /
Danielle Cristina Calado de Brito ; Orientador, Júlio Cesar
Pieczarka ; Co-orientadora, Regiane Rodrigues dos Santos. - 2016.

Inclui bibliografia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia, Belém, 2016.

1. Criopreservação de órgãos, tecidos. 2. Trealose. 3.
Reprodução animal - felídeos. I. Pieczarka, Júlio Cesar, orientador.
II. Santos, Regiane Rodrigues dos, co-orientadora. III. Título.

CDD – 22 ed. 571.46451

DANIELLE CRISTINA CALADO DE BRITO

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATA
DOMÉSTICA (*FELIS CATUS*): UM MODELO PARA A
PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM FELINOS SILVESTRES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Data da aprovação. Belém - PA: 06/ 09/ 2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Júlio Cesar Pieczarka (Orientador)
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Regiane Rodrigues dos Santos (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues (Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Joyce Kelly do R da Silva (Examinadora)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Simone do S Damasceno Santos (Examinadora)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dra. Rossineide Martins da Rocha (Examinadora)
Universidade Federal do Pará

Dedico,

A toda minha família, em especial a meu pai Jesuíno Silva de Brito, a minha mãe Maria Antônia Calado de Brito e a minha tia Ana de Fátima Moraes Brito.

Que foram meu estio, minha segurança e que sempre estiveram ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis, durante toda a execução desta tese.

*À memória de minha vizinha sempre amada e querida,
Maria Madalena Rodrigues Calado, meu grande amor. Meu maior exemplo de vida.
Que sempre estará em mim, acompanhando meu crescimento,
e me apoiando em tudo na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por está sempre presente em minha vida, me mostrando o caminho que devo seguir. “O dia em que eu ficar com medo, eu, da minha parte, confiarei em ti.” (Salmos 56:3)

A meus queridos pais, Jesuíno Silva de Brito e Maria Antonia Calado de Brito (Mami) pelo grande amor, apoio e respeito. Sou extremamente grata pela educação que tive, pela coragem, humildade, compromisso, responsabilidade, honestidade, enfim... agradeço por estarem sempre comigo, nunca desistindo de acreditar em mim. Dou minha vida por vocês. Obrigada por tudo, os amo demais. Mami, o que seria de mim sem você? Temos nossas diferenças, mas nunca esqueça que, independente de qualquer coisa, todo meu verdadeiro amor será seu para toda a eternidade. Meu amor por você é incondicional, és meu exemplo de mulher guerreira, humilde, trabalhadora, honesta... espero um dia retribuir tudo que a senhora faz por mim.

A minha querida avó, minha segunda mãe, que também contribuiu em toda minha formação, não só acadêmica, mas como ser humano. E nos deixou um grande exemplo de luta, amor e caridade. Uma das pessoas mais belas que conheci e que sempre estará na minha vida, no meu coração, te amo para sempre.

A toda minha família que amo muito, especialmente aos que acompanham de perto tudo em minha vida, torcendo e apoiando, como as minhas primas-irmãs Bel e Ivana, minha tia Iracilda, tia Ângela, tia Ana e minha dinha que amo, Maria Dantas. Contudo, dentro dessa família maravilhosa, eu agradeço muito minha tia Ana, pela pessoa maravilhosa que é, sempre presente, sempre ajudando... Tia agradeço do fundo do coração tudo que fizeste por mim, muito obrigada, te amo!

A minha terceira mãe e orientadora, Profa. Dra. Regiane Rodrigues dos Santos, pela grande oportunidade dada para o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada por estar sempre presente, pela paciência, pela orientação em todo o momento de elaboração e execução do projeto. Profa Regiane, você não faz idéia do quanto me ensinou e o quanto aprendi durante todos esses 6 anos de pesquisa, sou sua fã, você é um grande exemplo de mulher, pesquisadora, mãe, esposa ... enfim, com inúmeros atributos... Muito obrigada por tudo, passei por uma grande mudança na minha vida e você tem grande contribuição nisso, me sinto uma pessoa muito melhor, mas confesso que até hoje ainda me tremo com seus emails que começam com Prezada, Danielle... nossa, que medo, heim!!!! (rsrs) ... Na verdade, não tenho palavras para lhe descrever, formadora de recursos humanos à longa distância.

A toda equipe do Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM) da UFPA, meus companheiros, meus amigos: Julianne, Karolzinha, Débora, Wlaysia, Cithia, Danuza e o Drico. Minhas pupilas lindas: Silmara, Juliana, Julyne, Gabriela e a Anny, meninas brilhantes, que tive e ainda tenho um grande aprendizado como co-orientadora. Agradeço muitíssimo à chefe do laboratório Profa Dra Sheyla Farhaylde S. Domingues que foi quem me deu a oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa, agradeço também o apoio e parceria no desenvolvimento de parte do primeiro artigo técnico dessa tese. Particularmente, tenho um orgulho imensurável de poder acompanhar o crescimento de todos na equipe, e dessa tese sair um protocolo de vitrificação que pode dar subsídio a outras pesquisas científicas em animais silvestres no BIOMEDAM.

A toda equipe do Laboratório de Citogenética da UFPA, que me deram o apoio que precisei para o desenvolvimento de parte dessa tese. Ao meu amigo Jorge Rissino que foi fundamental para o início da execução de parte do primeiro artigo técnico dessa tese. E, principalmente, ao chefe do laboratório e meu orientador Prof. Dr. Júlio Cesar Pieczarka, que foi muito importante, o sr. me aceitou para orientação, confiou em mim, me deu a oportunidade de colocar em prática meu projeto, em um momento muito crítico para mim. Muito obrigada, prof., você não tem ideia o que foi ter aceito meu projeto, serei eternamente grata pelo apoio e pela orientação.

À Profa Dra Joyce Kelly do Rosário da Silva, chefe do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais da UFPA, pelo apoio e parceria no desenvolvimento de parte do primeiro artigo técnico dessa tese. E que dessa parceria, nasceu uma amiga e confidente mesmo que a distância. Muito obrigada, te admiro demais.

A toda equipe do Laboratório de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE, pelo acolhimento, apoio, confiança, companheirismo, aprendizado e principalmente pelo carinho e amizade. Muito obrigada a minha equipe de experimento: Franciele Lunardi, Carol Macide, Luciana Mascena e Kele Amaral. Contudo, um agradecimento especial vai para os chefes do laboratório Prof. Dr. José Ricardo Figueredo e Profa Dra Ana Paula Ribeiro Rodrigues, que foram excepcionais, por me acolherem no laboratório, pela confiança depositada e por permitirem que grande parte dessa tese fosse desenvolvida no laboratório, não apenas cedendo o espaço, mas também os recursos necessários para a execução e desenvolvimento do segundo e terceiro artigos dessa tese. Profa Ana Paula, serei

imensamente grata pela oportunidade de ingressar nessa equipe, pois foi um aprendizado e parceria que levarei para o resto da vida.

Um agradecimento especial vai para meus suportes emocionais. Primeiramente, minhas amigas-irmãs Renata Barbosa e Potira Fernandes, que mesmo à distância, estavam sempre presente, conversando, me dando o apoio e a força que precisava em momentos difíceis, muito obrigada minhas amoras, vocês fazem parte da minha história de vida, e desejo que sempre continuemos unidas como verdadeiramente somos. Meu outro suporte foi o Thiago Campos, meu parceiro, companheiro e namorado, que foi muito importante para mim, foi a pessoa que viveu comigo meus lados bons e ruins nos últimos momentos dessa tese. Thiago, muito obrigada, que todo esse apoio, carinho, cuidado e amor dado possa perdurar em nossa relação, e que possamos participar diretamente, dessa forma, em momentos tão importantes quanto esse, que surgirão em nossas vidas, te amo!

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o mestrado.

E, por fim, a todos que não citei e que de alguma forma contribuíram para essa tese. Principalmente, as gatinhas utilizadas em toda a tese, que inconscientemente foram fundamentais para o alcance do objetivo dessa tese.

...meu muito obrigada a todos!

“Se cheguei até aqui, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

*“No começo, eu achei que estava lutando para salvar seringueiras.
Em seguida, eu pensei que estava lutando para salvar a Floresta Amazônica.
Agora eu percebi que estou lutando para a humanidade.”*
(Chico Mendes)

RESUMO

Esta tese tem como principal objetivo desenvolver um protocolo eficiente de vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (*Felis catus*). O estudo foi dividido em: Fase I: Efeito de diferentes tipos de meios-base durante a vitrificação de tecido ovariano de gata; Fase II: Efeito de diferentes crioprotetores extracelulares e técnicas de vitrificação em tecido ovariano de gata; Na fase I, a morfologia de folículos pré-antrais foi similar ao controle fresco ($p > 0,05$), quando o RPMI-1640 foi utilizado como meio-base. RPMI-1640 não contém vermelho fenol que, adicionado ao meio, intensificou a toxicidade do crioprotetor etileno glicol durante a vitrificação. Na fase II, a porcentagem de folículos morfologicamente normais foi similar ao controle, apenas quando o meio de vitrificação foi suplementado com 0,1 M ou 0,5 M de trealose ($p > 0,05$). Além disso, através dos parâmetros como a morfologia, proliferação celular e espessura de fibras colágenas pode-se dizer que a combinação de trealose com etilenoglicol (EG) sozinho ou adicionado de dimetilsulfóxido (DMSO), aplicando os métodos *Solid-surface vitrification* (SSV) ou *Ovarian Tissue cryosystem* (OTC), apresentaram sucesso na preservação do tecido ovariano vitrificado. Apesar do OTC com EG não apresentar diferença significativa dos demais tratamentos, uma vez que este protocolo apresentou o maior percentual de folículos morfologicamente normais (56%), sendo similar ao controle (64%). Adicionalmente, nenhum efeito sobre a regulação de expressão gênica foi observada nos grupos testados, quando foram avaliados marcadores de apoptose (BAX - proteína X associada ao Bcl-2), de estresse do retículo endoplasmático (ERP29 – proteína do retículo endoplasmático 29), de canais de água como as aquaporinas 3 e 9 (AQP3 e AQP9), e os transportadores de membrana ABC (ABCB1 e ABCG2), com exceção do método SSV com EG que apresentaram, após 7 dias de cultivo *in vitro*, um aumento da expressão da ERP29 (indica estresse no retículo endoplasmático) e a diminuição da expressão da AQP9 (afeta canais de transporte de água). Com isso, para a manutenção da preservação do tecido ovariano de gata é necessário o uso de um protocolo de vitrificação contendo meio-base livre de vermelho fenol, suplementado com trealose, como crioprotetor extracelular, e EG sozinho ou associado com DMSO, como crioprotetores intracelulares. Ambos os sistemas abertos (SSV) e fechados (OTC) são equivalentes na eficiência em manter a sobrevivência folicular durante o processo de vitrificação.

Palavras - chave: Criopreservação. Folículos pré-antrais. RPMI. Trealose. OTC.

ABSTRACT

The aim of the present thesis was to develop an efficient vitrification protocol of the ovarian tissue from domestic cat (*Felis catus*). This study was divided: Phase I: Effect of different basis media during the vitrification of cat ovarian tissue; Phase II: Effect of different sugars (extracellular cryoprotectants) and the vitrification technique for the vitrification of feline ovarian tissue. In phase I, the morphology of preantral follicles was similar ($p > 0.05$) to fresh control when RPMI-1640 was used as basis medium for vitrification. RPMI-1640 does not contain phenol red, which was found to enhance ethylene glycol (EG) toxicity during vitrification. In phase 2, the percentage of morphologically normal preantral follicles was similar ($p > 0.05$) to fresh control only when the vitrification medium contained 0.1 or 0.5 M trehalose, instead of sucrose or raffinose at same concentrations. Furthermore, based on parameters such as morphology, cell proliferation and thickness of collagen fibers, it is possible to assume that efficient vitrification of feline ovarian tissue can be performed by combining trehalose with EG, with or without dimethylsulfoxide (DMSO), applying the solid-surface vitrification (SSV) or ovarian tissue cryosystem (OTC) method. Although vitrification with OTC in the presence of EG did not differ from the other treatments, this protocol presented the highest percentages of preserved preantral follicles (56%), being similar to control (64%). Additionally, no effect on gene regulation was observed after vitrification when apoptosis markers (BAX – protein X associated to Bcl-2), endoplasmic reticulum (ER) stress (ER protein 29 – ERP29), water channels proteins like aquaporins 3 and 9 (AQP3 and AQP9), the membrane ABC transporters ABCB1 and ABCG2, except when the SSV method was applied using only EG as cryoprotectant followed by seven days *in vitro* culture, where ERP29 up-regulation (ER stress) and AQP9 down-regulation (impaired water transport) were observed. Based on this, it can be concluded that to efficiently preserve feline ovarian tissue, it is necessary the use of a vitrification protocol free of phenol red, supplemented with trehalose, as extracellular cryoprotectant, and EG alone or in combination with DMSO, as intracellular cryoprotectants. Both open (SSV) and closed (OTC) systems are equally efficient to maintain follicular survival during the vitrification procedure.

Key - words: Cryopreservation. Preantral follicles. RPMI. Trehalose. OTC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP/ CPAs	Agente crioprotetor (cryoprotectant agents)
AgNOR	Argyrophilic proteins related to nucleolar organizer regions (proteínas argirofílicas relacionadas com regiões organizadoras de nucléolos)
ANOVA	Analysis of variance (Análise de variância)
BAX	Bcl-2 associated X protein (proteína x associada ao Bcl-2)
BCL2	B-cell lymphoma 2 (linfoma de células B 2)
BSA	Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
cDNA	Complementary DNA
PGC	Células germinativas primordiais
DMSO	Dimetilsulfóxido (dimethylsulfoxide)
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
SD	Standard deviation (desvio padrão)
EG	Ethylene glycol (etilenoglicol)
EGF	Epidermal growth factor (fator de crescimento epidermal)
FBS	Fetal bovine serum (soro fetal bovino)
FCS	Fetal calf serum (soro fetal bovino)
FS	Folículos secundários
FSH	Follicle stimulation hormone (hormônio folículo estimulante)
CG	Granulosa cells
GH	Growth hormone (hormônio do crescimento)
HSA	Human serum albumin (albumina sérica humana)
IGF-I	Insulin-like growth factor I (fator de crescimento semelhante à insulina I)
IVF	In vitro fertilization (FIV - fertilização in vitro)
IVM	In vitro maturation (MIV - maturação in vitro)
KL	Kit ligand
LH	Luteinizing hormone (hormônio luteinizante)
LIF	Leukemia inhibitory factor (fator inibidor de leucemia)
LN2	Liquid nitrogen (nitrogênio líquido)
MEM	Meio essencial mínimo
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-

	antrais
NORs	Nucleolus organizer regions (regiões organizadoras de nucléolos)
OTC	Ovarian tissue cryosystem
PAS	Periodic acid-Schiff (ácido periódico-Schiff)
PFA	Paraformaldehyde (paraformaldeído)
PROH	Propanodiol (propanediol)
qPCR	Quantitative polimerase chain reaction (reação em cadeia polimerase quantitativa)
rbFSH	Recombinant bovine follicle-stimulating hormone
RNA _m /mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (messenger ribonucleic acid)
RNA _r / rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico (ribosomal ribonucleic acid)
RT-qPCR	Real time reverse transcription quantitative polimerase chain reaction (Transcrição reversa da reação em cadeia polimerase)
SEM	Standard error of the mean (erro padrão da media)
SSV	Solid-surface vitrification
TCM199	Tissue Culture Medium 199 (meio de cultivo para tecido)
TCM199	Meio de cultivo para tecido
TGF β	Transforming growth factor beta (fator de crescimento transformante beta)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.MORFOFISIOLOGIA OVARIANA EM MAMÍFEROS	17
2.2.BIOTECNOLOGIA VOLTADA PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE	21
2.2.1. Criopreservação	22
2.2.2. Agentes Crioprotetores (ACPs)	24
2.2.3. Estresse Osmótico, Oxidativo e Mecanismos Homeostáticos	27
2.3.UTILIZAÇÃO DO TECIDO OVARIANO VITRIFICADO EM SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO	32
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. OBJETIVO GERAL	36
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. CAPÍTULO 1	37
Vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (<i>Felis catus</i>): Um modelo para a preservação da fertilidade de felinos silvestres	
6. CAPÍTULO 2	101
Efeitos Prejudiciais do Vermelho Fenol na Vitrificação de tecido ovariano de gata (<i>Felis catus</i>)	
7. CAPÍTULO 3	118
Vitrificação de tecido ovariano de gato doméstico (<i>Felis catus</i>) usando trealose como crioprotector extracelular e o efeito de métodos aberto e fechado sobre a modulação da expressão de mRNA da aquaporin 3 e ABCB1	
8. CONCLUSÕES	151
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros impactos ambientais têm acarretado a diminuição da biodiversidade, levando determinadas espécies a tornarem-se vulneráveis, ameaçadas ou até mesmo extintas. Dentro desse contexto, há uma preocupação emergencial para a aplicação e desenvolvimento de medidas de conservação de recursos genéticos para restaurar populações tanto de espécies em cativeiro com dificuldades reprodutivas, bem como em risco de extinção (ARAT et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; LIMA et al., 2012). No caso dos felinos silvestres, um fator limitante para o desenvolvimento de técnicas de preservação da fertilidade é a disponibilidade de indivíduos para estudo, haja vista que se tratam de animais ameaçados de extinção (IUCN, 2014). Em virtude disso, o gato doméstico tem sido bastante utilizado como um confiável modelo experimental, visando salvaguardar a população felina (STORNELLI, 2007; CARRIJO Jr et al., 2010).

Nessa perspectiva, vários estudos já têm demonstrado a utilização dessas alternativas de reprodução em gatos domésticos, como a maturação e a fertilização *in vitro* de oócitos, transferência de embriões (JOHNSTON; O'BRIEN; WILDT, 1989; JEWGENOW et al., 1997; RINGLEB; ROHLER; JEWGENOW, 2004; JEWGENOW; PARIS, 2006), na produção de embriões *in vitro* a partir de oócitos vitrificados (POPE et al., 2012), na ativação partenogênica (RASCADO et al., 2010), na clonagem (SHIN et al., 2002), na criopreservação de gametas (LUVONI, 2006) e de tecido ovariano (LIMA et al., 2006). Entretanto, a criopreservação de material genético, vem sendo uma das biotécnicas mais utilizadas, visto que objetiva a possibilidade da formação de um banco de germoplasma (WOLF et al., 2004; DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006; SANTOS et al., 2008).

A criopreservação é uma tecnologia que consiste na preservação de material biológico – como tecidos, folículos ovarianos, gametas e embriões – para manutenção da viabilidade e funcionalidade celular a baixas temperaturas, geralmente em botijões de nitrogênio líquido a -196°C (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997; SANTOS et al., 2006a,b; SANTOS et al., 2008). Essa técnica tem melhorado as aplicações na reprodução assistida, por permitir um planejamento do uso do material, podendo ser estocado por tempo indeterminado (MAZUR, 1984; DONNEZ et al., 2004). Além disso, promove a retomada da função reprodutiva e endócrina (DONNEZ et al., 2006; DEMEESTERE et al., 2009; DEPALO; CAVALLINI, 2009; JIN et al., 2010).

Esta crioestocagem pode ser realizada por dois métodos básicos: congelamento convencional ou lento (exposição a baixas concentrações de agente crioprotetor – ACP – e resfriamento lento controlado em “freezers” programáveis) e a vitrificação (altas concentrações de ACP e resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido) (SANTOS et al., 2008). Porém, apesar das duas apresentarem variável nível de sucesso, a vitrificação é o método mais rápido (LIN et al., 2008), simples e menos oneroso, não requer equipamentos especiais e pode ser realizado no campo, após a morte de um animal selvagem. Luvoni et al. (2012) avaliaram o efeito da vitrificação de tecido ovariano felino, e demonstraram que a vitrificação pode preservar a integridade de folículos ovarianos e que os oócitos podem ser recuperados a partir de tecido criopreservado, mantendo, com isso, sua capacidade de retomar a meiose.

Entretanto, protocolos de vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica ainda são bastante escassos, e apresentam resultados abaixo do ideal (ALVES et al., 2012; LUVONI et al., 2012), pois o sucesso da técnica pode depender de alguns fatores, como o meio-base utilizado, a tolerância aos ACPs intra e extracelulares, o estresse osmótico, oxidativo e a técnica de vitrificação utilizada (SANTOS et al., 2006; 2008; CARVALHO et al., 2013). Portanto, seria fundamental o estabelecimento de um protocolo eficiente de vitrificação de tecido ovariano de gata, com a utilização de um meio-base, ACPs e técnicas adequadas, e que forneçam maiores taxas de sobrevivência para seu posterior uso em sistemas *in vivo* ou *in vitro*, objetivando a retomada da funcionalidade reprodutiva, obtendo, com isso, oócitos funcionais que podem ser usados em alternativas de reprodução, oferecendo embasamento para pesquisas posteriores em felinos em perigo de extinção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.MORFOFISIOLOGIA OVARIANA EM MAMÍFEROS

Em todas as espécies de mamíferos, a gônada feminina é um órgão complexo e multi-compartimentado, composto de muitos tipos de células diferenciadas, todas trabalhando em conjunto para promover diversas funções biológicas, que incluem a produção de células germinativas competentes para a fertilização (oócitos) e a produção de hormônios, como o estrogênio e progesterona, que são capazes de influenciar a função da maioria de outros órgãos e tecidos do corpo (PEREDA; ZORN; SOTO-SUAZO, 2006; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). Nos felinos domésticos, os ovários, órgãos pares, situam-se e permanecem dorsalmente na região sublombar, caudalmente aos rins, e fixam à extremidade do corno uterino pelo ligamento próprio do ovário (Fig. 01-A) (KÖNIG; LIEBICH, 2011), apresentando um tamanho médio em torno de um centímetro de comprimento por meio centímetro de largura (Fig. 01-C, D), e folículos em crescimento visíveis em sua superfície (Fig. 01-B), com dois ou mais corpos lúteos (LIMA, 2006).

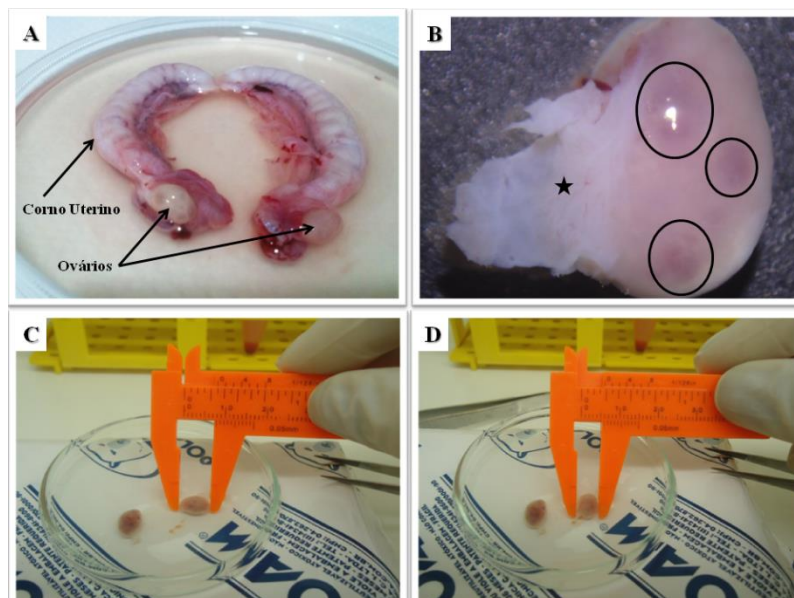


Fig 01. Estruturas reprodutivas de gata doméstica: (A) exposição dos cornos uterinos, com seus respectivos ovários fixados em suas extremidades através do ligamento próprio do ovário; (B) o ovário, no qual pode ser observado o ligamento próprio do ovário (indicado com uma estrela), em uma cor esbranquiçada, e os seus folículos antrais bem visíveis (nos círculos); (C e D) ovários isolados para medição do Comprimento e largura (0,5 e 0,8cm, respectivamente).

O ovário mamífero é revestido por um epitélio superficial anexada à túnica albugínea, e é formado por duas regiões: uma região mais interna chamada de medular, que é composta por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, que se ramificam para a outra região, chamada de cortical, que se encontra mais próxima ao epitélio. Contudo, é no córtex que os folículos ovarianos são observados, contendo oócitos rodeados por células especializadas, denominadas de granulosa, que podem estar agrupadas ou não com as células da teca (com suas duas camadas, teca externa e interna), dependendo do estágio de desenvolvimento dos folículos, os quais fornecem o ambiente necessário para o crescimento e a maturação do oócito, tornando-se, com isso, a unidade básica estrutural e funcional do ovário mamífero (VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Os folículos ovarianos são classificados, dependendo do seu estágio de desenvolvimento e da ausência ou presença da cavidade antral: Folículos pré-antrais, como *primordiais*, *transição*, *primários*, *secundários*; e folículos antrais, como *terciários* e *pré-ovulatórios* (Fig. 02; 03) (FIGUEREDO, 1995), e são envolvidos por um tecido conjuntivo bem vascularizado chamado de estroma, que apresenta um papel importante no desenvolvimento de folículos de fase inicial (primordiais e primários) (VAN DEN HURK; SANTOS, 2009). Sua matriz extracelular apresenta vários constituintes, como a elastina, a laminina, a fibronectina e o colágeno, sendo este último largamente distribuído nesse tecido. Contudo, sua morfologia varia entre o córtex e medula. No córtex, as células do estroma são organizadas paralelamente à superfície e têm uma estrutura arredondada. Na medula, as células exibem organização aleatória e tem uma estrutura alongada, apresentando uma maior capacidade esteroidogênica (SHEA; WOODRUFF; SHIKANOV, 2014).

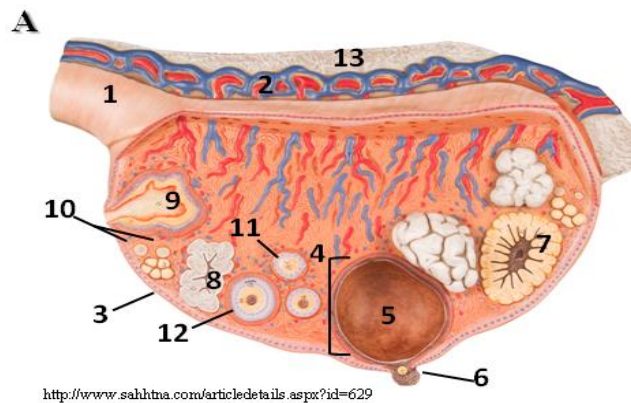


Fig 02. Estruturas ovarianas de gatas domésticas. (A) Desenho representando um ovário de gata, com seus constituintes enumerados: 1- Ligamento do ovário ; 2- Artérias e veias ovarianas; 3- Epitélio germinativo; 4- Folículo ovulatório ou de Graaf; 5- Cavidade antral; 6- oócito (ovulado); 7- corpo lúteo; 8- Corpo albicans ; 9- Formando corpo lúteo; 10- Folículos primordiais; 11- Folículo primário; 12- Folículo secundário; 13- Mesovário.

Em mamíferos no geral, a foliculogênese ovariana (que começa com a formação do folículo primordial, culminando com a ovulação por um folículo maturado), como é um processo sinérgico, em que a comunicação cruzada do complexo oócito-granulosa é essencial, apresenta folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, com características peculiares (Fig. 03). O *Folículo primordial*, com oócito (ou vesícula germinativa, se encontram na primeira parada meiótica, no diplóteno da profase I) com uma camada de células da pré-granulosa achatadas, que estabelece um estoque de células germinativas, onde uns podem crescer e se diferenciar, enquanto outros permanecem quiescentes. Contudo, à medida que começam a crescer, os folículos são encontrados na fronteira cortico-medular, que é altamente vascularizado em mamíferos (Fig. 03) (VAN WEZEL; RODGERS, 1996; JEWGENOW; PARIS, 2006)

Os *Folículos primários* são folículos em desenvolvimento, que através de fatores de crescimento, diferenciam as células da granulosa na forma (de plana para cúbicas), associadas com o núcleo redondo e citoplasma contendo filamentos intermediários de vimentina, apresentando também uma intensa atividade mitótica. O *Folículo de transição* apresenta em sua estrutura os dois formatos de células da granulosa, achatadas e cubóides. E o *Folículo secundário*, ainda com oócito imaturo, apresenta uma zona pelúcida formada, contendo duas ou mais camadas de células da granulosa e, periféricamente, o começo da formação da camada tecal (Fig. 03).

No tocante ao *Folículo terciário*, ele apresenta uma camada tecal desenvolvida, e o começo da produção do fluido folicular, formando, com isso, da cavidade antral, e o

Folículo pré-ovulatório, que corresponde ao estágio final do desenvolvimento folicular, onde o oócito encontra-se maturo no sentido nuclear, citoplasmática e molecular. Essa maturação oocitária envolve a passagem para o estágio de metáfase II, perturbações das junções cumulus-oolema, redistribuição das organelas, migração de mitocôndrias a uma posição perinuclear e acúmulo de grânulos corticais ao longo da oolema, e pela síntese de proteínas necessárias para um futuro desenvolvimento embrionário (Fig. 03) (LINTERN-MOORE, 1974; MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; ERICKSON, 2001; FERREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

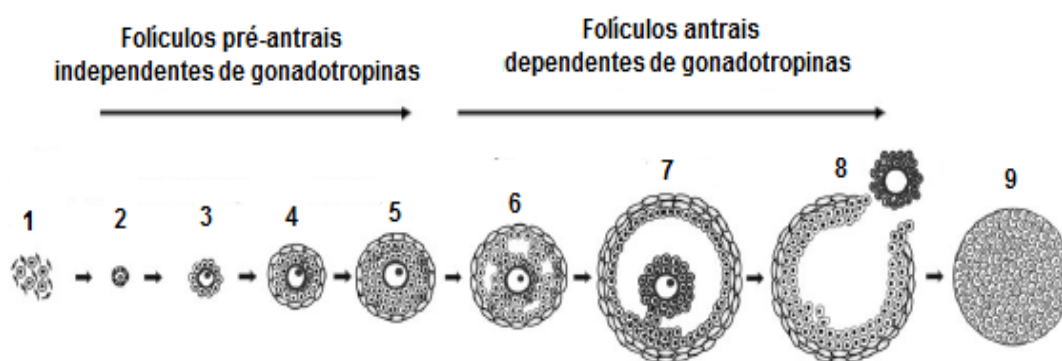


Fig. 03. Classificação dos estágios da foliculogênese de mamíferos. (1) Cisto de células germinativas. Folículos pré-antrais dependentes de fatores de crescimento: (2) Folículo primordial; (3) Folículo primário; (4,5) Secundário (formação da camada tecal - mais externa). Folículos antrais dependentes de gonadotropinas: (6) Terciário; (7) Pré-ovulatório. (8) Ovulação. (9) Corpo lúteo. Fonte modificada: Edson, Nagaraja e Matzuk, 2009.

Os folículos pré-antrais representam mais 90% da população folicular presente no ovário mamífero (SAUMANDE, 1981), e visto que nessa fase a vascularização é pouco desenvolvida, o crescimento folicular é controlado por interações complexas entre oócitos, células da teca e da granulosa (BURATINI et al. 2007), que se pode indicar, ao invés de controle endócrino, o parácrino e autócrino, por citocinas e fatores de crescimento, como o Fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF), Fator de crescimento e diferenciação -9 (GDF-9), Proteína morfogenética óssea (BMPs), Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1), Kit Ligante (KL), Fator de crescimento de fibroblasto -2 (FGF-2), Hormônio anti-mülleriano (AMH), Fator de crescimento epidermal (EGF), bem como os esteróides, que são compostos intrafoliculares importantes (MOTTA; MAKABE; NOTTOLA, 1997; MCLAREN, 2000; ERICKSON, 2001; PEREDA; ZORN; SOTO-SUAZO, 2006; SANTOS et al., 2008; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

Por outro lado, os folículos antrais são estritamente dependentes de gonadotrofinas (LH e FSH) para o seu desenvolvimento e do seu antro. Para tanto, a camada tecal do folículo adquire uma bainha vascular, que contém redes capilares. Esses vasos proporcionam um aumento da oferta de gonadotrofinas, fatores de crescimento, oxigênio e precursores de esteróides, bem como outras substâncias, para o folículo produzir o líquido antral, e com isso, crescer (BAKER; SPEARS, 1999).

Entretanto, independente dessa dinâmica observada na foliculogênese, com diferenciação, ativação, desenvolvimento, sobrevivência, dominância e ovulação, em uma fêmea adulta, este processo, que é continuado ao longo de sua vida reprodutiva, pode declinar em gatas mais velhas (após 8 anos de idade), deixando de apresentar um ciclo reprodutivo regular, o que pode levar à infertilidade ou baixa fertilidade. Esse fenômeno é natural com o avanço da idade em mamíferos no geral, pois o número de folículos primordiais degenerados aumenta (ERICKSON, 1966). Muitos estudos confirmam que esse processo, chamado de atresia ou morte folicular, é um fenômeno fisiológico e destino da maioria dos folículos, visto que, menos de 1% deles ovulam, enquanto que o resto torna-se atrésicos, por meio da degeneração celular (SAUMANDE, 1991) ou por apoptose (morte celular programada) (ASSELIN et al., 2000; SANTOS et al., 2008; VAN DEN HURK; SANTOS, 2009).

2.2. BIOTECNOLOGIA VOLTADA PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

As biotécnicas voltadas à reprodução podem ser alternativas para preservação de recursos genéticos, a fim de restaurar populações com dificuldades reprodutivas e ameaçadas de extinção. Dentro desse contexto, algumas dessas alternativas reprodutivas podem ser: a manipulação de oócitos *in situ* e *ex situ*, cultivo *in vitro*, fertilização *in vitro* (FIV), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a criopreservação de material genético que é uma biotécnica bastante utilizada (WOLF et al., 2004; DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006; SANTOS et al., 2008; ARAT et al., 2011; LIMA et al., 2012; BRITO et al., 2014). A criopreservação melhora as técnicas de reprodução assistida, permitindo o planejamento do uso do material, podendo ser estocado por tempo indeterminado (MAZUR, 1984; DONNEZ et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2006; ANDERSEN et al., 2008; SANTOS et al., 2010; ARAT et al., 2011).

2.2.1. Criopreservação

Em uma primeira tentativa de congelar folículos pré-antrais de gatas, Jewgenow e Göritz (1995), utilizando DMSO como crioprotetor, relataram que apenas 12% dos folículos que foram congelados, encontravam-se intactos após a descongelação. Posteriormente, Jewgenow et al. (1998) testaram diferentes crioprotetores (DMSO, PROH, EG e glicerol) também em folículos pré-antrais de felinos e observaram que o glicerol foi o único que apresentou uma diminuição no número de folículos intactos, e que a porcentagem de folículos viáveis utilizando os demais crioprotetores foi similar ao do controle. Com relação à criopreservação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano (*in situ*), ela pode permitir o uso de um número muito maior de oócitos imaturos (em folículos com vários estágios de desenvolvimento), sendo com isso, uma técnica que pode ser usada tanto em indivíduos pré-púberes, como adultos (SHAW et al., 2000; LEONEL, 2013). Porém, há um desafio para os profissionais de reprodução, porque tecido ovariano é composto por diferentes tipos de células que têm diferentes requisitos para a sobrevivência, assim como também pode apresentar uma lenta perfusão dos agentes crioprotetores (HOVATTA, 2005).

A criopreservação pode ser realizada por dois métodos básicos: a congelação convencional ou lenta e a vitrificação (SANTOS et al., 2008). De acordo com o método escolhido, mudanças podem interferir a função normal do material biológico, pois as células são expostas a diferentes forças (térmicas, químicas e mecânicas), alterações a nível de membrana e volume, assim como a formação de cristais de gelo (Revisado por SANTOS et al., 2010). O método convencional (ou lento), conhecido também como taxa controlada de congelação, requer a utilização de um equipamento de congelação programável, equipamento de alto custo, que pode garantir declínio gradual controlado da temperatura (HREDZÁK et al, 2005), sendo caracterizada pela exposição do material a baixas concentrações de agentes crioprotetores (PAYNTER, 2000), como em 1,5 mol/l (CECCONI et al., 2004; CELESTINO et al., 2007) e 1,0 mol/l, (SANTOS et al., 2006a; 2009; FAUSTINO et al., 2010) por um período que pode variar de 20 (RODRIGUES et al.,2004; SANTOS et al., 2006a; 2009) a 60 minutos (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997).

Entretanto, diferentemente do congelamento, a vitrificação é um método mais rápido (20.000 a 40.000°C/min) (LIN et al., 2008), simples e menos oneroso não

requer equipamentos especiais e pode ser realizado no campo, logo após a morte de um animal selvagem. Foi idealizada por Luyet em 1937, e depois de quase 50 anos, essa técnica foi descrita pela primeira vez por Rall e Fahy (1985), como uma alternativa ao processo de congelamento lento, sendo caracterizado por um resfriamento ultra-rápido, sem formação de cristais de gelo (uma das principais causas de danos celulares), ocorrendo uma subsequente formação de um estado vítreo (sólido amorfo), no qual a água é solidificada, mas não se expande, devido ao grande aumento na viscosidade da solução para um ponto onde as moléculas ficam imobilizadas e a amostra adquire as propriedades de um sólido (HREDZÁK et al, 2005; SANTOS et al., 2007; 2010). Esse método envolve a exposição, geralmente à temperatura ambiente, do material biológico a altas concentrações de crioprotetores (geralmente entre 4 a 6 mol/L), e por isso só podem ser expostas a um pequeno período de tempo e/ou um volume mínimo da solução (25 segundos a 5 minutos), seguido ao nitrogênio líquido (ARAV et al., 2002). Entretanto, altas concentrações de crioprotetores podem causar toxicidade e também resultar em estresse osmótico, e conseqüente dano celular (LUVONI, 2006; SANTOS et al., 2008; 2010).

Para tanto, esse método utiliza um volume mínimo de solução, como estratégia para reduzir os danos causados pelo choque osmótico, bem como efeito solução, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e conseqüente alteração na função celular (FAHY, 1980). Várias ferramentas têm sido usadas para minimizar os efeitos do volume ao submergir a amostra rapidamente no nitrogênio líquido, tais como, “grids” de microscopia eletrônica (MARTINO; SONGSASEN; LEIBO, 1996; PARK et al., 1999), capitares dentro de palhetas “open pulled straws” (OPS) (VATJA et al., 1998), “cryoloops” (FUCHINOUE et al., 2004), “cryotops” e “cryotips” (KUWAYAMA et al., 2005; KUWAYAMA 2007). Com a idéia de que, quanto menor o volume melhor, pois representa uma taxa de resfriamento maior evitando formações de cristais de gelo e diminuição do efeito tóxico do crioprotetor nos materiais biológicos.

Porém, a vitrificação com a ajuda de palhetas ou “grids” de microscopia eletrônica, não tem levado a um bem sucedido armazenamento de tecido do ovário. Outras técnicas têm sido utilizadas para vitrificação de tecido ovariano, como a superfície sólida (SSV), desenvolvida para tecido ovariano de cabra (SANTOS et al., 2007b). Essa técnica consiste de um cubo de alumínio aberto é colocado em uma caixa de isopor e submerso no nitrogênio líquido, o material biológico crioprotetido é

colocado sobre a superfície superior fria do cubo, e instantaneamente vitrificada (revisado por VAN DEN HURK; SANTOS, 2009). No entanto, quando um sistema aberto é utilizado, o contato da amostra com o vapor de nitrogênio pode permitir a exposição a agentes patogênicos resistentes às temperaturas criogênicas (GROUT; MORRIS 2009).

Por conseguinte, com objetivo de melhorar a técnica, Carvalho et al. (2013) desenvolveram em caprinos um novo método de vitrificação de tecido ovariano, chamado “Ovarian Tissue Cryosystem” (OTC). Este método manteve a morfologia e viabilidade dos folículos pré-antrais vitrificados semelhantes ao tecido fresco. O OTC é uma estrutura metálica cilíndrica composta por uma base na qual as amostras são colocadas, uma inserção contendo perfurações para permitir a exposição e remoção da solução de vitrificação e uma tampa para fechar hermeticamente o dispositivo. Este dispositivo evita o contato com o nitrogênio líquido e melhora a troca de calor, sem expor o tecido do ovário aos contaminantes. Entretanto, Bandeira et al. (2014) fizeram a comparação do OTC com o SSV, a fim de avaliar a influência dos métodos de vitrificação na matriz extracelular e no desenvolvimento folicular ovariano, e concluíram que o método OTC é mais eficiente que o SSV por preservar a viabilidade e morfologia folicular e permite um melhor desenvolvimento do folículo ovariano, além de ser capaz de manter a integridade dos componentes da matriz extracelular do ovário em ovinos. Carvalho et al. (2013) acrescentam ainda que a densidade celular de estroma não é reduzida pelo OTC e sugere que ele, satisfatoriamente, armazena a população de células estromais e que nele o estresse oxidativo parece não afetá-las.

2.2.2. Agentes crioprotetores (ACPs)

Como anteriormente descrito, o sucesso da criopreservação depende de ACPs, sendo necessário identificar o mais eficiente, com sua concentração adequada para que possa ser utilizado para redução de perdas durante os procedimentos de criopreservação. Os ACPs são agentes químicos que protegem as células contra formação de cristais de gelo, desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. No geral, esses agentes podem penetrar com facilidade as membranas das células (ACP intracelular ou permeáveis), substituindo parcialmente moléculas de água que saíram em virtude da criopreservação, formando ponte de hidrogênio com moléculas de água intracelular remanescentes, atrasando, com isso, a diminuição da temperatura da mistura

resultante, prevenindo assim, a cristalização de gelo por reduzir o ponto de congelamento (RALL et al., 1984; PEREIRA; MARQUES, 2008). Em contrapartida, há os que não penetram (ACP extracelular ou não-permeáveis), permanecendo no meio extracelular para proteger o material biológico com a retirada de água de dentro da célula causando desidratação e aumento da concentração de ACP intracelular. As membranas celulares também são protegidas pelos ACPs extracelulares, por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídios, mantendo a estabilidade da membrana; assim como também, aumenta a viscosidade do meio, diminui a concentração de eletrólitos durante a criopreservação, evitando riscos osmóticos (HOVATTA et al., 2005; SANTOS, 2007a; SANTOS et al., 2008; 2010).

A maioria dos protocolos de criopreservação foram realizados na presença de ACPs intracelulares como o dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2-propanodiol ou propileno glicol (PROH), etilenoglicol ou etanodiol-1,2 ou glicol (EG) e glicerol ou glicerina ou 1,2,3-Propanotriol (GLI), em concentrações variando de 0,5 a 3,0 M (humano: NEWTON et al, 1996; gato: JEWGENOW et al, 1998; cabra: RODRIGUES et al, 2004; SANTOS et al, 2006b, 2007a; 2008b; ovelhas: SANTOS et al, 2006a, 2007b; gado: CELESTINO et al., 2007), e suas massas moleculares são de 78 g/mol, 76,09 g/mol, 62,07 g/mol, 92,09 g/mol com temperatura de congelamento de 18,5°C, -60°C, -13°C, 17,8°C, respectivamente. O mecanismo de ação desses crioprotetores tem como base a ligação a estruturas que promovem pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Estas ligações mudam a orientação da molécula de água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA; GRAHAM, 1997; LIMA, 2006).

Para a maioria das células, o glicerol é o agente de escolha porque é geralmente menos tóxico do que o DMSO. Mas, DMSO é mais penetrante, e é geralmente o agente de escolha para as células maiores e mais complexas (EROGLU et al., 2000; EROGLU; TONER; TOTH, 2002). Entretanto, de acordo com FUKU et al. (1992), o DMSO, PROH e EG possuem maior capacidade de penetração à membrana celular que o GLI, o que pode levar à menores taxas de FOPAs viáveis. Adicionalmente, HOVATTA (2000) observou que o EG penetra no tecido mais rapidamente que o PROH e DMSO e que o GLI possui uma ação mais lenta e, conseqüentemente, menos eficiente. Contudo, o uso de PROH como crioprotector pode causar efeitos deletérios no tecido estromal e nos folículos. Embora a descongelação a 30°C pode reduzir este efeito, a utilização de

outros agentes crioprotectores pode ser indicada para fornecer um seguro método de preservação da fertilidade em mulheres (OSKAM; ASADI; SANTOS, 2010).

Pinto et al. (2008) mostraram ser possível manter a viabilidade folicular após criopreservação de tecido ovariano exposta a baixas concentrações de DMSO (1,0 M, durante 10 min), bem como em um curto período (5 minutos a 1,5 ou 2,0 M DMSO). No entanto, Rodrigues et al. (2006) demonstraram que a viabilidade folicular após 5 dias de cultivo de FOPAs criopreservados foi similar DMSO ou EG, tanto no fragmento do tecido ovariano quanto nos folículos isolados. Várias pesquisas mostram ambos crioprotetores sendo utilizados com sucesso para criopreservação de tecido ovariano (CECCONI et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2006; CELESTINO et al., 2007; FAUSTINO et al., 2010; JIN et al., 2010). No entanto, Santos et al. (2006b) demonstraram que a utilização de EG e sacarose parece ser importante para a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais, sendo o EG mais eficiente que o DMSO, em virtude de seu peso molecular ser mais leve (62.07 kDa) que o DMSO (78.13 kDa), facilitando com isso sua penetração no tecido ovariano.

Já os ACPs extracelulares mais utilizados na criopreservação são: sacarose, rafinose, trealose. Entretanto, além de seu efeito crioprotetor, estas substâncias também podem ser tóxicas para as células, principalmente durante o período de exposição (RODRIGUES et al, 2004; 2006; SANTOS et al, 2006a; 2007a; CELESTINO et al, 2007), e todos são amplamente usados como crioprotectores naturais e estabilizadores durante a desidratação e que, complementarmente, sua combinação com outros mais ACP intracelulares torna o processo menos tóxico e mais eficaz do que se for utilizado um único tipo de crioprotetor (EDYTA; ALI, 2011)

A sacarose é um crioprotetor bastante utilizado na criopreservação de tecido ovariano (BRITO et al., 2014; YOUM et al., 2014), e estudos de Fabbri e seus colaboradores (2014) têm mostrado que o compartimento estromal manteve características morfológicas e ultra-estruturais semelhantes ao tecido fresco, enquanto o citoplasma do oócito foi ligeiramente danificado, quando vitrificados na presença de PROH, EG, sacarose e soro humano em PBS. Todavia, quando vitrificados utilizando EG, DMSO e sacarose ou trealose, outro estudo recente mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos com os dois tipos de crioprotetores externos, quando comparados com o controle (TIAN et al., 2015). No entanto, com relação à trealose, sua utilização na criopreservação de tecido ovariano é muito rara. Pesquisas têm sido feitas sugerindo a presença da trealose em ambos os lados da

membrana celular, através da associação com lipossomas (BANERJEE, 2001). E, Motta et al. (2014) constataram que o dissacarídeo é um potente crioprotetor de células do sangue do cordão, e que a solução contendo trealose intra e extracelular melhora a criopreservação em Células-tronco hematopoiéticas.

Outras pesquisas relataram efeitos benéficos na utilização de rafinose na criopreservação de vários tecidos humanos, antes do transplante (MUHLBACHER; LANGER; MITTERMAYER, 1999; ZHENG et al., 2008). E, crescimento folicular foi observada após xenotransplante subcutâneo de tecido ovariano humano criopreservado com PrOH e rafinose, bem como antioxidantes (GOSDEN et al., 1994; SCHUBERT et al., 2008). Curiosamente, Sanfilippo et al. (2013) mostraram que, após a criopreservação, com a utilização de PROH e rafinose como ACPs, o córtex ovariano humano manteve a sua integridade, além de marcadores de funcionalidade no CIV. Entretanto, o único relato de vitrificação observado até o momento foi feito por Nagano et al. (2007), que examinaram o efeito da técnica na sobrevivência de FOPAs isolados, utilizando o EG e a rafinose como ACPs, e concluíram que a exposição a solução com rafinose causa vascularização citoplasmática nas células da granulosa.

2.2.3. Estresse osmótico, oxidativo e mecanismos homeostáticos

Apesar dos ACPs melhorarem a sobrevivência celular por evitar danos causados pela redução extrema da temperatura e desidratação e pela formação de cristais de gelo, eles também podem acarretar outras injúrias nas células, como danos a organelas celulares (SARAGUSTY et al., 2009; SPRÍCIGO et al., 2012) e o estresse osmótico, devido à alta concentração de soluto. Com isso, essa toxicidade do ACP depende do tipo, da concentração, e da temperatura de exposição (COMIZZOLI et al., 2004; PEDREIRA & MARQUES, 2008). Portanto, para evitar essa injúria, os ACPs permeável devem estar equilibrados alcançando uma desidratação e a penetração suficiente no material biológico, reduzindo danos citotóxicos (Amorim et al., 2006). Da mesma forma, o ACP não permeável em concentrações ideais de sobrevivência podem reduzir o choque osmótico e controlar a saída de água intracelular, limitando assim o risco de inchaço celular (LUVONI, 2006).

Para tanto, o período de equilíbrio, que é o tempo de exposição do tecido ovariano ao agente crioprotetor, é crucial pois permite a saída de água e a penetração do ACP de forma adequada na criopreservação (CANDY et al., 1997). Entretanto, nesse

período há um desbalanço osmótico através da membrana celular que conduz à migração da água para fora da célula. Porém, se muita água permanece dentro da célula ainda, danos devido à formação de cristais de gelo e/ou recristalização podem ocorrer (FARRANT, 1980). Essa desidratação e re-hidratação com crioprotetores ocorre através de proteínas de canais de água conhecidos como aquaporinas, que podem aumentar a permeabilidade celular para os mesmos (CAMARGO et al., 2011). Por exemplo, as aquaporinas 3 (AQP3) e 9 (AQP9), que permitem a entrada de crioprotetores, são moduladas de acordo com a composição da solução de vitrificação como uma resposta ao estresse osmótico (SALES et al., 2016).

A regulação osmótica é importante para a função ótima de macromoléculas intracelulares (YANCEY et al., 1982; CHAMBERLIN & STRANGE, 1989; PARKER, 1993; HAUSSINGER, 1996). Essa regulação normalmente ocorre naturalmente através de vários tipos de transporte de íons mono- ou divalente (HAUSSINGER, 1996). Alguns solutos orgânicos de baixo peso molecular também possuem essa atividade. Contudo, a maioria dos organismos vivos responde ao estresse osmótico produzindo osmoprotetores ou solutos compatíveis que são projetados para ajudar o citoplasma a manter uma pressão osmótica equivalente com o ambiente externo sem acumular alta concentração de sal intracelular (CSONKA & EPSTEIN, 1996). O estresse osmótico atribui diferentes mudanças fisiológicas. As células primeiro são habilitadas a aumentar a síntese de proteínas ABC relacionadas a transporte (PRASAD et al. 2003), o que permite a internalização dos solutos compatíveis (OBIS et al., 1999). Embora uma variedade de solutos compatíveis estejam disponíveis (KEMPF & BREMER, 1998), a betaína é um dos mais importantes, em termos de nível de osmoproteção em ambos sistemas procariontes e eucariontes (BAGNASCO et al., 1986; BELLINGER & LARHER, 1988; BEUMER et al., 1994).

Outro agravante é o estresse oxidativo que durante a criopreservação pode ser gerado através de diferentes mecanismos, como o aumento do metabolismo oxidativo e o próprio estresse osmótico, que podem resultar na alteração da integridade e potencial de membranas celulares. Essa toxicidade é um dos fatores fundamentais limitantes para a criopreservação de sistemas vivos tanto por congelamento quanto por vitrificação (Revisado por FAHY, 2010). O estresse oxidativo é definido como um desbalanço intracelular entre a produção de ROS (oxidante) com os mecanismos de defesa da célula (antioxidante), favorecendo a formação de peróxidos causando estresse e, conseqüentemente, seqüelas patológicas, responsáveis por diferentes tipos de danos,

incluindo a peroxidação lipídica de membranas, a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, apoptose e necrose (Fig.04) (HALLIWELL et al., 1992; LIMA-VERDE et al., 2007).

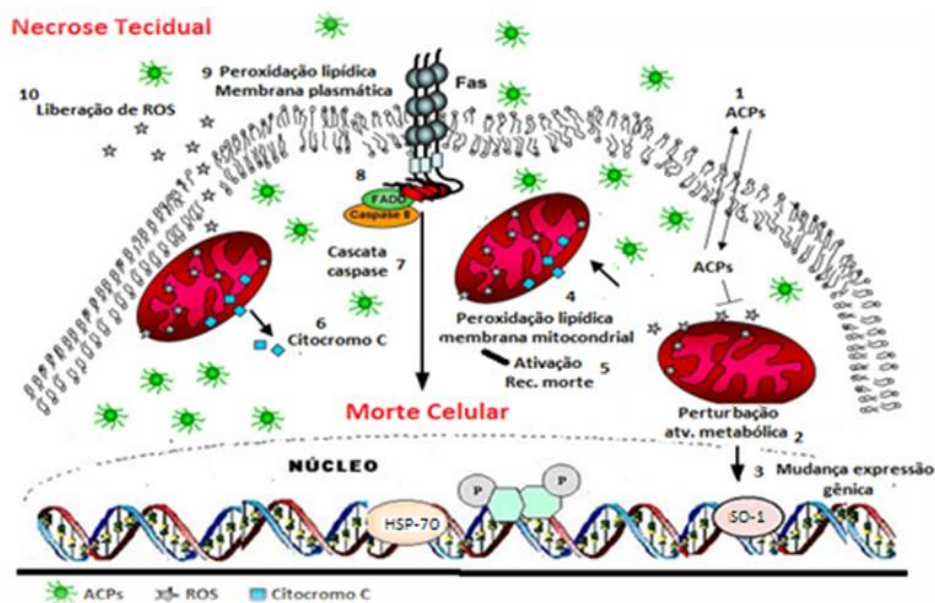


Fig 04. Desenho esquemático do possível efeito do desbalanço metabólico provocado pela (1) exposição à ACPs: (2) Perturbação da atividade metabólica, com a produção excessiva de ROS; (3) Mudança na expressão gênica, para a formação de antioxidantes; (4) peroxidação lipídica da membrana mitocondrial, por causa da elevada reatividade de ROS; (5) resultando na ativação de receptores de morte, (6) liberação de citocromo C e o (7) acionamento da cascata das caspases, levando à (8) sinais de morte celular por apoptose. O excesso de ROS intracelular pode provocar a (9) peroxidação lipídica da membrana plasmática, (10) liberação de ROS ao meio extracelular e, com isso, a necrose tecidual. Fonte modificada: Choi et al. (2007).

Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS, do termo em inglês Reactive Oxygen Species) são compostos químicos, que apresentam uma divisão: espécies radiculares (com elétrons desemparelhados – radicais livres) que provocam atração de outras moléculas, por sua elevada reatividade, e os não-radicalares (sem elétrons desemparelhados). Os ROS são produzidos como subprodutos de reações de oxidação e redução, sendo encontrados em todos os sistemas biológicos, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico (cadeia respiratória mitocondrial), formando, por exemplo, os $O_2^{\bullet-}$ (radical ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), $\bullet OH$ (radical hidroxila) (Ryter & Choi, 2005; Tatone et al., 2010). Eles são capazes de se difundir e passar através de membrana celular e alterar a maioria das moléculas celulares. As consequências são múltiplas e incluem alterações mitocondriais e apoptose (CHOI et al., 2007), e seus efeitos são dose-dependentes, em baixos níveis regulam funções celulares e agem como sinalizadoras através da ativação de fatores específicos de transcrição, mantendo o metabolismo energético. Quando em altos níveis, estas

moléculas irão exercer estresse oxidativo nas células e provocar profundas mudanças na expressão gênica (RYTER & CHOI, 2005; LIMA-VERDE et al., 2007; TATONE et al., 2010). A regulação da expressão gênica e função de proteínas por ROS são conhecidas como “reguladores de redox”, que implica na hipótese de que existe um mecanismo pelo qual uma célula “sente” as concentrações endógenas de ROS ou RNS (espécies reativas de nitrogênio) e “reage” por alterar o perfil de expressão gênica, manifestando uma adaptação ou resposta de sobrevivência (FIG 04) (RYTER & CHOI, 2005).

Quando esse equilíbrio fisiológico está perdido, danos ao DNA (p.ex., radical HO- que pode se ligar a bases do DNA ou abstrair seus átomos de hidrogênio), proteínas e lipídeos podem ocorrer. Ácidos graxos poli-insaturados são, para os oxidantes que reagem com a bicamada lipídica, alvos mais prováveis do que o DNA, alterando membranas (peroxidação lipídica) (LUZ et al, 2012), dentre elas a mitocondrial interna liberando proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo C e outros fatores apoptogênicos, ativando a morte celular programada (RYTER & CHOI, 2005; ELMORE, 2007; TATONE et al., 2010). Agarwal et al. (2003) sugerem o envolvimento dos ROS no processo de apoptose no ovário, pela associação do transporte de elétrons (mitocondrial) com a esteroidogênese, principalmente em células da teca em folículos antrais (ORTEGA-CAMARILLO et al., 2009). Adicionalmente, o estresse oxidativo induzido pela criopreservação em células da granulosa está envolvido na ativação de caspase-8, -9 e -3, com vias apoptóticas dependentes. Porém, novos estudos ainda são necessários para esclarecer o mecanismo preciso de regulação da apoptose (ZHANG et al., 2013).

A criopreservação é um processo que tornam as células mais sensíveis à produção de ROS, podendo provocar seu aumento. Entretanto, há três estratégias que evitam o estresse oxidativo, tais como: contrabalancear o dano por prevenir a formação de ROS; intercepção por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos; e o reparo celular (GUERIN et al., 2001). Rahimi et al. (2003) sugeriram que o aumento dos níveis de ROS após vitrificação pode levar significativamente a apoptose, reduzindo a qualidade do material biológico. Exatamente por isso é necessário à utilização de soluções de vitrificação suplementadas com eliminadores de radicais livres, os antioxidantes, que evitam o dano tecidual mediado por ROS, que podem ser enzimáticos e não enzimáticos.

Os antioxidantes enzimáticos são compostos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas (PRX), glutathione (GSH),

glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPX) (mais importante na remoção de peróxidos na célula). O SOD protege contra o estresse oxidativo e é importante para funções ovarianas, como desenvolvimento e sobrevivência folicular; e catalisam a dismutação do radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio (HO et al., 1998; MATSUK et al., 1998). A CAT reduz ou decompõe o H_2O_2 , convertendo-o em água e oxigênio molecular (RYTER & CHOI, 2005; LIMA-VERDE et al., 2007; TATONE et al., 2010). Esses antioxidantes são purificados e comercializados, servindo como suplemento em sistemas de criopreservação. Carvalho et al. (2014), por exemplo, avaliaram o efeito da suplementação da catalase em ambas soluções de vitrificação e de lavagem (devitrificação), sobre a produção de ROS em tecidos ovarianos de caprino, e observaram que a presença de catalase reduz os efeitos prejudiciais de vitrificação provavelmente devido à ação de quebrar H_2O_2 em água e oxigênio como citado anteriormente (CHI et al., 2008), entretanto o estudo conclui que o melhor passo é a adição da catalase apenas na solução de vitrificação. Esse raciocínio pode ser justificado visto que outros investigadores sugeriram que o excesso de antioxidantes pode resultar em toxicidade celular não apenas no tecido de ovário, mas também no espermatozoides e embriões criopreservados (DONNELLY et al., 1999; LUZ et al., 2012). A concentração da catalase (20 UI / mL) utilizada neste estudo foi baseado em Luz et al. (2012), com taxas semelhantes de folículos pré-antrais morfológicamente normais após o congelamento tecido ovariano caprinos em relação ao tecido fresco.

Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos representam um grande número de compostos de baixo peso molecular (maioria provido por meio de dietas), que incluem as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico, que participam através do bloqueio da ação dos radicais livres (LIMA-VERDE et al., 2007; TATONE et al., 2010). Outro antioxidante não enzimático é o O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil cromano-2-ácido carboxílico, posteriormente designado com o nome de Trolox (CORT et al., 1975), que é um análogo hidrossolúvel do tocoferol, que foi sintetizado por Scott e sua equipe em 1974 e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras (LIMA-VERDE et al., 2007). O mecanismo de ação do Trolox é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH fenólico (responsável por sua atividade antioxidante) e a remoção de radicais peroxil ($LOO\cdot$) (ALBERTINI & ABUJA, 1999). Sua estrutura é composta por um núcleo cromanol (com átomo de oxigênio), semelhante ao do tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (Fig.05). O OH rapidamente

reage com LOO⁻, transferindo seu átomo de H, convertendo em hidroperóxido de lipídeo (LOOH), que é um produto não radical (FERREIRA, 2008).

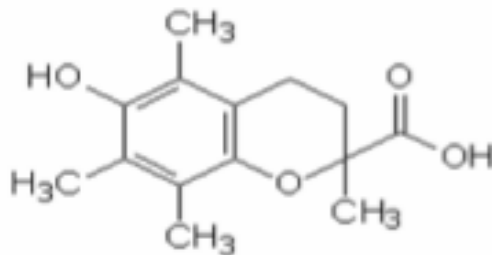


Fig. 05. Estrutura molecular do Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico). Fonte: Ferreira (2008).

Segundo Barclay et al. (1995), o Trolox tem vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E. Devido a sua estrutura cromanol, que lhe dá atividade antioxidante, e ao grupo carboxila, que tem moderado efeito hidrossolúvel, o Trolox é distribuído em ambas as fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação. Brito et al. (2013) verificaram o efeito de dois antioxidantes não-enzimáticos (selênio e trolox) em um protocolo de congelamento convencional em tecido ovariano de macaca-prego, e foi possível identificar que o selênio é tóxico dependendo da concentração usada, e que a suplementação com 50 mM de Trolox pode evitar estresse do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, proteger o tecido ovariano da vacuolização citoplasmática, que pode ser causada pela criopreservação.

2.3. UTILIZAÇÃO DO TECIDO OVARIANO VITRIFICADO EM SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO

A partir do momento que se criopreserva tecido ovariano, existem várias opções disponíveis para seu posterior uso, como o cultivo *in vitro* ou *in vivo*. Estudos têm mostrado que para a utilização após a estocagem, no caso de tecido ovariano ou de folículos isolados, pode ser feito um cultivo *in vitro* (CIV) de curto ou longo prazo, para a manutenção da sobrevivência e desenvolvimento folicular (BIRON-SHENTAL et al., 2004; KIM et al., 2004). Cecconi et al. (2004) confirmam a importância do CIV como uma ferramenta para avaliar o processo de criopreservação de folículos na fase inicial, sendo ainda uma alternativa para preservar a fertilidade e obter oócitos maduros a partir de folículos isolados. Sendo o CIV, portanto, uma importante estratégia tanto para o

aperfeiçoamento de protocolos de vitrificação, quanto para a retomada da funcionalidade reprodutiva, implicando na preservação de germoplasma de animais valiosos para a preservação da biodiversidade, e constituindo uma alternativa para jovens pacientes com câncer, que se submetem a tratamentos como quimio- e radioterapia (PARIS et al., 2004; JEWGENOW & PARIS, 2006).

Além disso, o CIV possibilita a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA). A MOIFOPA é uma técnica que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais, visando promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* dos oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, sendo de grande importância, tanto para a pesquisa fundamental ou básica (como o melhor entendimento dos mecanismos relacionados à foliculogênese na fase pré-antral), quanto para a reprodução assistida, pois folículos pré-antrais podem ser recuperados do ovário de mulheres impedidas de reproduzirem naturalmente ou mesmo de animais imediatamente após a morte ou o abate.

Para alcançar resultados bem-sucedidos durante CIV de folículos pré-antrais nas várias espécies mamíferas, foram desenvolvidos vários sistemas de cultivo, com o intuito de promover o crescimento e garantir a manutenção da viabilidade dos folículos pré-antrais *in vitro* da maneira mais apropriada possível. Nesse sentido, folículos pré-antrais podem ser cultivados *in situ* (inseridos no córtex ovariano) ou na forma isolada do estroma ovariano. Os sistemas de cultivo de folículos isolados podem ainda ser classificados como bidimensional (EPPIG & SCHROEDER 1989; CORTVRINDT et al., 1996), no qual apenas parte da superfície dos folículos entra em contato direto com a placa de cultivo (NATION & SELWOOD, 2009), ou ainda de forma tridimensional, na qual os folículos são cultivados inseridos em uma matriz como o colágeno (OKTEM & OKTAY, 2007) ou alginato (WEST et al., 2007; SONGSASEN et al., 2011). Adicionalmente, estudos têm mostrado também um cultivo de dois passos, associando o crescimento de folículos em estágios iniciais inclusos no ovário ou em fragmentos, com o posterior desenvolvimento de folículos secundários isolados, os quais podem fornecer também oócitos maduros *in vitro* (O'BRIEN et al., 2003). Usando este sistema de cultivo, Eppig e O'Brien (1996) alcançaram um desenvolvimento *in vitro* completo, começando com o oócito de folículos primordiais de ovários de camundongos recém-nascidos e culminando com o nascimento de crias viáveis após a obtenção de oócitos maduros a partir do cultivo de folículos secundários isolados. Adicionalmente, Telfer et

al. (2008) mostraram que o cultivo em duas etapas, possibilitou alcançar o desenvolvimento acelerado de folículos primordiais humanos para a fase antral.

No tocante à espécie felina, não há muitos relatos na literatura, porém já foi documentado o crescimento folicular, mas até o momento sem a formação de antro, além disso, pouco se sabe sobre a regulação da viabilidade de folículos primordiais ou a ativação em alguma espécie felina (JEWGENOW & STOLTE, 1996; ALVES et al., 2012; WONGBANDUE et al., 2013). Fujihara et al (2012) desenvolveram protocolo de recuperação de tecido ovariano fresco de gata, e que revelaram requisitos espécie-específicos para preferência de meio, pois o tecido ovariano de gata prefere *minimum essential medium* (MEM) que o α -MEM, com resultado pelo qual folículos ovarianos permaneceram viáveis por até duas semanas, contrário do α -MEM que manteve viável até apenas três dias, concluindo ainda que a diferença entre estes dois meios é a concentração de aminoácidos muito maior no α -MEM, que para o folículo do gato pode ser tóxico, por apresentar baixo metabolismo de aminoácidos (SPINDLER et al 2000; SONGSASEN et al., 2007). Adicionalmente, o fator de crescimento epidérmico (EGF) e seu receptor desempenha um papel importante na foliculogênese felina (GORITZ et al., 1996). O EGF é um conhecido polipeptídeo mitogênico envolvido na regulação da proliferação celular em mamíferos, e tem sido mostrado estimular o aumento de tamanho *in vitro* de oócitos e folículos de cabra durante a transição do folículo primordial a primário (SILVA et al., 2004). Esse fator de crescimento, na concentração de 100 ng/ml, manteve viabilidade folicular de gata, após 14 dias de cultivo, através do aumento da expressão de vias da proteína quinase de ativação mitogênica (MAPK) e a fosfoinositol 3-quinase (PI3K) (FUJIHARA et al., 2014).

No obstante, apesar de que o tecido do ovário felino tanto fresco quanto congelado é favorável para o cultivo *in vitro* e *in vivo* (BOSCH et al., 2004; WIEDEMANN et al. 2012; 2013; FUJIHARA et al., 2012; 2014), quase não há relatos de cultivo *in vitro* após a vitrificação, e os que existem apresentam uma baixa taxa de folículos morfológicamente normais (13,9%) (MOUTTHAM & COMIZZOL, 2016), tornando assim um desafio. Por esta razão, estudos futuros que envolvam estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* ou *in vivo* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano vitrificado de gata é fundamental, para obtenção de melhores taxas de sobrevivência folicular, dando possibilidade de acesso do *pool* de oócitos, após CIV de tecido ovariano, que poderiam ser maturados e fertilizados *in vitro*, para a produção de embriões *in vitro* e nascidos vivos.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- ✓ O meio-base (DMEM; MEM; TCM199; RPMI-1640) utilizado na vitrificação influencia na taxa de degradação morfológica de folículos ovarianos;
- ✓ O tipo de crioprotetor extracelular e a sua concentração influenciam na preservação do tecido ovariano durante a vitrificação;
- ✓ A combinação de dois tipos de crioprotetores intracelulares interfere na eficiência da preservação do tecido ovariano vitrificado;
- ✓ O tipo de técnica de vitrificação (SSV ou OTC), utilizada durante o processo, influencia na preservação do tecido ovariano e no desenvolvimento de folículos ovarianos após cultivo *in vitro*;

4. OBJETIVOS

4.1.OBJETIVO GERAL

- ✓ Estabelecer um protocolo eficiente de vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (*Felis catus*).

4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar o efeito de diferentes meio-base na taxa de degradação morfológica de folículos ovarianos após vitrificação;
- ✓ Avaliar diferentes concentrações de três tipos de crioprotetores extracelulares (sacarose, trealose e rafinose) na preservação do tecido ovariano de gata;
- ✓ Investigar o efeito de dois tipos de técnica de vitrificação (SSV ou OTC), na manutenção do tecido ovariano de gata;
- ✓ Analisar o efeito da combinação de dois tipos de crioprotetores intracelulares (EG e DMSO) na preservação do tecido ovariano;
- ✓ Avaliar a influência de um cultivo *in vitro* na sobrevivência folicular do tecido ovariano vitrificado de gata;

5. CAPÍTULO 1

Vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (*Felis catus*): Um modelo para a preservação da fertilidade de felinos silvestres

Periódico: Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (a ser submetido)

Vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (*Felis catus*): Um modelo para a preservação da fertilidade de felinos silvestres

D.C.Brito^{1,2*}, S.L.G. Lima², S.F.S. Domingues², A.P.R. Rodrigues³, J.R. Figueiredo³,
R.R. Santos², J.C. Pieczarka¹

¹Laboratory of Cytogenetics, Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Brazil;

²Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Brazil;

³Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Pre-Antral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary Medicine, Ceará State University, Fortaleza, CE, Brazil;

*Corresponding author: Universidade Federal do Pará (UFPA) – Faculdade de Ciências Biológicas – Programa de Pós-Graduação Biotecnologia (PPGBiotec) – Laboratório de citogenética; Rua Augusto Corrêa, 01 – Guamá; Belém – PA – Brazil. CEP: 66075-110; Caixa Postal 479. Tel UFPA.: +55 91 32017000; Tel LabCitogen +55 91 32018423.

E-mail: daniellecalado@gmail.com

RESUMO

As atividades humanas e seus efeitos têm ameaçado significativamente padrões genéticos de populações de felinos silvestres. Baseado nisso, a restauração da preservação *in situ* deve ser a prioridade para essas espécies de felídeos, e o desenvolvimento de medidas *ex situ* também é fundamental para a preservação de recursos genéticos, apoiando a reprodução de felinos. O gato doméstico (*Felis catus*) tem sido utilizado como um modelo experimental. O desenvolvimento de protocolos eficientes de vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica poderá ser uma alternativa para a preservação da fertilidade de fêmeas felinas silvestres. Vários fatores podem afetar o sucesso da técnica, tais como a tolerância ovariana à solução de vitrificação (meio-base, e crioprotetores intra- e extracelulares) e técnicas utilizadas. Estes estudos mostraram que o sucesso do protocolo de vitrificação de tecido ovariano felino depende do meio-base utilizado, pois os que apresentam vermelho fenol em sua fórmula podem provocar um efeito prejudicial na morfologia de folículos pré-antrais. Além disso, a combinação de trealose como crioprotetor extracelular, com etilenoglicol (EG) sozinho ou adicionado de dimetilsulfóxido (DMSO), juntamente com os métodos tanto de *Solid Surface Vitrification* (SSV) quanto *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC), apresentam sucesso na preservação do tecido ovariano vitrificado. Entretanto, o uso do tecido ovariano após a vitrificação ainda é considerado um desafio, por sua taxa elevada de degeneração. Por esta razão, estudos futuros que envolvam estabelecer um protocolo de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano vitrificado de gata doméstica são fundamentais para sua aplicabilidade comparativa e inclusão de espécies felinas silvestres em programas de reprodução assistida.

INTRODUÇÃO

Em virtude de inúmeros impactos ambientais provocados pela ação humana, a biodiversidade genética de felinos silvestres sofreu declínio populacional principalmente no século passado (Ceballos et al., 2002; Frankham 2003; 2005; Palomares et al., 2012; IUCN, 2016). Por conta disso, nos dias de hoje, as espécies de felídeos, com exceção ao gato doméstico, encontram-se na lista vermelha da *União Internacional para conservação da natureza* (IUCN), em algum grau preocupante nas escalas de animais em risco de extinção (Carrizo et al., 2010). Situação esta devido à caça excessiva, ao abate ilegal, à perda de habitat por degradação, desmatamento e conversão de áreas florestais em campos agrícolas e pastagens.

Dentre alguns felinos, a onça-pintada (*Panthera onca*) e o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) são espécies em declínio, que estão quase ameaçadas, e tanto o tigre (*Panthera tigris*) quanto o leopardo das neves (*Panthera uncia*) estão identificados como espécies em perigo de extinção (Ver tabela 1) (IUCN, 2016). Portanto, o futuro desses felinos depende, primeiramente, da restauração *in situ* de suas populações, assim como também do desenvolvimento de medidas *ex situ* de preservação de recursos genéticos. Desta forma, a biotecnologia de reprodução assistida tem sido sugerida como ferramenta para apoiar a reprodução de felinos em cativeiro e preservar a diversidade genética existente. Além do que, essa ferramenta auxilia na formação de bancos de recursos genéticos, que permite o planejamento e estudos experimentais no momento que se deseja utilizar o material, assegurando uma possível sobrevivência futura dessas populações (Holt et al., 1996; Wiedemann et al., 2013). Wiedemann et al. (2012) propuseram que é possível preservar células germinativas de leões mantidas em cativeiro através da maturação *in vitro* de oócitos, bem como através da criopreservação de córtex ovariano e posterior xenotransplantação.

Tabela 01. Situação populacional no século XX e XXI de algumas espécies de felinos, de acordo com a lista vermelha da IUCN.

Nome popular	Nome científico	Faixa Geográfica	Século XX				Século XXI				Tendência atual					
			MP	QA	VU	AE	CA	EN	EX	MP		QA	VU	AE	CA	EN
Onça Pintada	<i>Panthera onca</i>	América Norte/Central/Sul			X					X						Declínio
Gato Maracajá	<i>Leopardus wiedii</i>	América Central/Sul	X		X				X	X						Declínio
Gato Palheiro	<i>Leopardus colocolo</i>	América do Sul	X							X						Declínio
Gato do Mato Grande	<i>Leopardus geoffroyi</i>	América do Sul	X							X						Estável
Gato Tigrado	<i>Leopardus tigrinus</i>	América Central/Sul			X					X						Declínio
Gato Mourisco	<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	América Central/Sul	X						X							Declínio
Puma	<i>Puma concolor</i>	América Norte/Central/Sul	X						X							Declínio
Gato Andino	<i>Leopardus jacobita</i>	Argentina, Bolívia, Chile e Peru			X							X				Declínio
Leopardo das Neves	<i>Panthera uncia</i>	Ásia					X					X				Declínio
Gato Pescador	<i>Prionailurus viverrinus</i>	Ásia		X							X	X				Declínio
Gato-Vermelho-de-Bornéu	<i>Catopuma badia</i>	Ásia (Indonésia e Malásia)			X							X				Declínio
Gato de Cabeça Chata	<i>Prionailurus planiceps</i>	Ásia (Indonésia e Malásia)			X							X				Declínio
Gato de Pallas	<i>Otocolobus manul</i>	Ásia	X							X						Declínio
Gato Marmorado	<i>Pardofelis marmorata</i>	Ásia			X					X						Declínio
Leopardo Nebuloso	<i>Neofelis nebulosa</i>	Ásia			X						X					Declínio
Tigre	<i>Panthera tigris</i>	Ásia					X					X				Declínio
Lince Ibérico	<i>Lynx pardinus</i>	Espanha					X							X		Crescente
Gato Dourado Africano	<i>Caracal aurata</i>	África	X								X					Declínio
Guepardo	<i>Acinonyx jubatus</i>	África			X						X					Declínio

MP – menos preocupante; QA – quase ameaçado; VU – vulnerável; AE – ameaçado de extinção; CA – criticamente ameaçados; EX – Extinto.

Entretanto, em felinos silvestres um fator limitante para o estudo das células germinativas femininas é a disponibilidade de ovários, uma vez que se trata de animais raros, vulneráveis ou ameaçados de extinção. Em virtude disso, o gato doméstico (*Felis catus*) representa um modelo experimental amplamente utilizado, por apresentar similaridades filogenéticas, facilidade de manejo e por não está ameaçado de extinção (Stornelli, 2007; Carrijo Jr et al., 2010), além de apresentar aplicabilidade em estudos paralelos com felinos silvestres ameaçados (Wildt et al., 2010), e humanos (Comizzoli et al., 2010; Comizzoli et al., 2011).

Com isso, pesquisas em gatos têm sido desenvolvidas como, por exemplo, a maturação de oócitos *in vitro*, fertilização *in vitro*, transferência de embriões (Johnston et al., 1989; Jewgenow et al., 1997; Ringleb et al., 2004; Jewgenow & Paris, 2006), produção de embriões *in vitro* de oócitos vitrificados (Pope et al., 2012), ativação partenogenética (Rascado et al., 2010), clonagem (Shin et al., 2002), criopreservação de gametas (Luvoni, 2006) e de tecido ovariano (*congelamento*, Lima et al., 2006; *vitrificação*, Brito et al., 2016). Nascimento de gato doméstico após vitrificação de oócitos maturados *in vitro* (Galiquis et al., 2014). E, Bosch et al. (2004) demonstraram também a possibilidade da criopreservação de córtex ovariano em conjunto com o xenotransplante em camundongos.

Com relação à criopreservação de material genético, esta vem sendo uma das mais promissoras biotécnicas utilizadas, visto que objetiva a possibilidade da formação de bancos de germoplasma (Wolf et al., 2004; Domingues & Caldas-Bussiere, 2006; Santos et al., 2008). Essa crioestocagem pode ser realizada por dois métodos básicos: congelamento convencional ou lento (exposição a baixas concentrações de agente crioprotetor – ACP – e resfriamento lento controlado em freezer programável) e a vitrificação (altas concentrações de ACP e resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido) (Santos et al., 2008). Porém, apesar das duas apresentarem variável nível de sucesso, a vitrificação é o método mais rápido (Lin et al., 2008), simples e menos oneroso, não requer equipamentos especiais e pode ser realizado no campo, quando algum animal selvagem vier a óbito (Prentice & Anzar, 2011). Entretanto, vários fatores podem afetar o sucesso da vitrificação, isso inclui a tolerância à solução de vitrificação (meio-base, crioprotetores intra- e extracelulares) (Brito et al., 2016) e a técnica utilizada (Bandeira et al., 2014).

Portanto, seria fundamental o estabelecimento de um protocolo prático e viável de vitrificação de tecido ovariano de gata, assim como de tecidos de felinos silvestres

mortos, objetivando a preservação dessas espécies, através da implantação e desenvolvimento de projetos voltados à reprodução (Leon-Quinto et al., 2009; Santos et al., 2010). Esta revisão tem como objetivo explicar protocolos já utilizados na vitrificação de tecido ovariano felino, com meios-base, ACPs e técnicas específicas e adequadas, para servir de embasamento para pesquisas posteriores na preservação da fertilidade de fêmeas felinas com o foco ao resgate de populações ameaçadas de extinção.

MORFOFISIOLOGIA OVARIANA EM FELINOS

Gônada primitiva

Em mamíferos, as primeiras fases de desenvolvimento ovariano começam durante o período de pré-gastrulação do embrião, na camada de células do epiblasto (parte inferior do disco embrionário e futuro ectoderma), quando linhagens somáticas diferenciam-se em linhagens germinativas, por fatores de crescimento, tornando-se PGCs (células germinativas primordiais). As PGCs durante a migração e desenvolvimento das gônadas primitivas, se diferenciam em oogônias ainda em regiões extragonadais (Ohinata et al., 2009).

Após a colonização do ovário primitivo, PGCs e oogônias desaparecem dos ovários fetais de mamíferos quando a meiose começa, pois se diferenciam em oócitos primários, começando o processo chamado de oogênese, porém entram em uma parada no estágio de desenvolvimento (Suh et al., 2002). Essas células germinativas estão ligadas por pontes citoplasmáticas intercelulares, onde trocam livremente mitocôndrias, ribossomos e outras organelas (Zamboni & Gondos, 1968), e formam cistos ou aglomerados de células que, após o nascimento, quebram para formar folículos primordiais (Pepling & Spradling, 2001), cada um composto por um oócito, dando início a outro processo conhecido como foliculogênese (McLaren, 2000; Van den Hurk & Santos, 2009). Entretanto, é possível observar alguns folículos poliovulares, que contém dois ou mais oócitos (Lima, 2006).

Especialmente em gatas domésticas, a formação do oócito primário tem início em cerca de 40-50 dias de desenvolvimento fetal e, possivelmente, até oito dias após o nascimento, os folículos encontram-se formados, podendo também ser encontrados folículos poliovulares (Ver Fig. 01) (Shehata, 1974; Peters & McNatty, 1980; Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Lima, 2006). Esse tipo de achado é muito comum no ovário da gata jovem, porém a denominação mais apropriada é folículos multi-oocíticos, pois o

potencial desses oócitos ovular não é claro (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Além disso, Kingsbury (1913) notou que a morfologia típica do ovário de gatas, com regiões corticais e medulares primitivas, está totalmente estabelecida pelo 40º dia de desenvolvimento fetal (75 mm comprimento, cabeça-nádega).

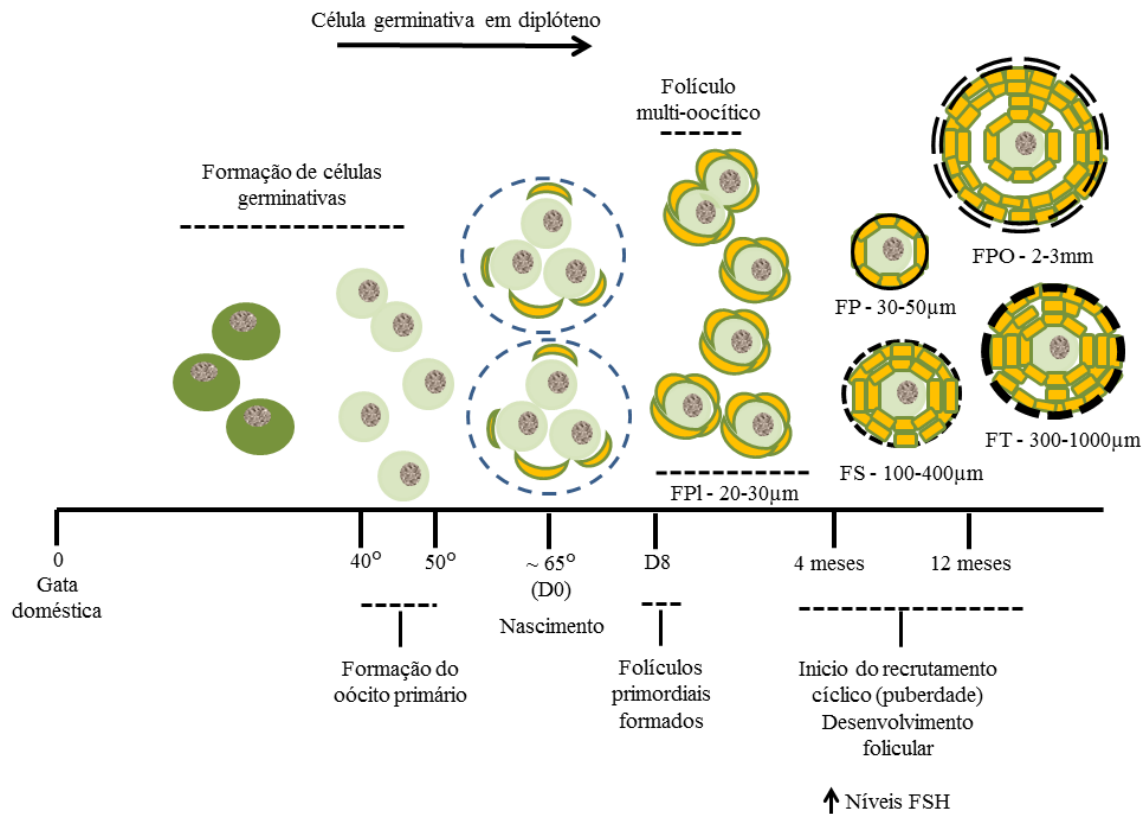


Fig.01. Linha cronológica representativa da formação, ativação e crescimento de folículos ovarianos em gata doméstica. Siglas: FPI – folículo primordial; FP – Folículo primário; FS – Folículo secundário; FT – Folículo terciário; FPO – Folículo pré-ovulatório.

No ovário embrionário, a diferenciação da *rete ovarii* (grupos de túbulos) tem sido associada a um controlo de meiose, organização inicial do folículo e foliculogênese (contribui para a população de células da granulosa) (Byskov & Lintern-Moore, 1973; Byskov, 1975; Wenzel & Odend'hal, 1985). Estes tubos são normalmente localizados no hilo do ovário, mas podem se estender através da medula ou até o córtex em algumas espécies ou podem se restringir no mesovário adjacente ao hilo (Byskov & Lintern-Moore, 1973; Wenzel & Odend'hal, 1985). O *rete ovarii* da gata doméstica aparece como uma ramificação de túbulos mesonéfricos próximo do hilo e túbulos amplamente separados e revestidos por um epitélio colunar ou cuboide na medula (Byskov & Lintern-More, 1973; Byskov, 1975; Shehata, 1974; Wilkerson, 1923). No geral, a *rete ovarii* está dividido em três secções: a *rete* extra-ovariana, no tecido periovariano,

estendendo-se para a região do ducto de Wolff; a *rete* intraovárica é uma rede ramificada de pequenos tubos localizada exclusivamente dentro do ovário; e a *rete* de conexão, que é um sistema de túbulos que une a *rete* extraovariana com a intraovárica. (Byskov & Lintern-Moore, 1973; Wenzel & Odend'hal, 1985)

A *rete* intraovariana entra em contato direto com cistos e células germinativas do córtex associando-se às conexões da medula. Em teoria, as células que englobam os cistos são originárias da *rete ovarii* (Wenzel & Odend'hal, 1985). Por outro lado, outros consideram o possível local de origem no epitélio de superfície do ovário (Juengel et al., 2002). Na gata doméstica, foi observado que a membrana que envolve a oogônia é contínua com o epitélio de superfície do ovário, sendo possível que células da pré-granulosa sejam recrutadas a partir de ambos sistemas de *rete* e o epitélio da superfície do ovário, para a formação do folículo (Byskov, 1975).

Arquitetura ovariana e seus constituintes

Em todas as espécies de mamíferos, a gônada feminina é um órgão complexo e multi-compartimentado, composto de muitos tipos de células diferenciadas, todas trabalhando em conjunto para promover diversas funções biológicas, que incluem a produção de células germinativas competentes para a fertilização (oócitos) e a produção de hormônios, como o estrogênio e progesterona, que são capazes de influenciar a função da maioria de outros órgãos e tecidos do corpo (Pereda et al., 2006; Edson et al., 2009). Em felinos domésticos, os ovários, órgãos pares, situam-se e permanecem dorsalmente na região sublombar, caudalmente aos rins, e fixam à extremidade do corno uterino pelo ligamento próprio do ovário (König & Liebich, 2011), apresentando um tamanho relativo de um centímetro de comprimento por meio centímetro de largura, e folículos em crescimento visíveis em sua superfície (Fig. 02), com dois ou mais corpos lúteos (Lima, 2006).



Fig.02. Ovário de gata doméstica (limitado por uma linha preta), no qual observa-se também folículos antrais bem visíveis (setas).

O ovário mamífero é revestido por um epitélio superficial anexado à túnica albugínea, e é formado por duas regiões: uma região mais interna chamada de medular, que é composta por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, que se ramificam para a outra região, chamada de cortical, que se encontra mais próxima ao epitélio. De modo que, é nesta região cortical que os folículos ovarianos são observados, contendo oócitos rodeados por células especializadas, denominadas de granulosa, que podem estar agrupadas ou não com as células da teca (com suas duas camadas, teca externa e interna), dependendo do estágio de desenvolvimento dos folículos, os quais fornecem o ambiente necessário para o crescimento e a maturação do oócito, tornando-se, com isso, a unidade básica estrutural e funcional do ovário mamífero (Van den Hurk & Santos, 2009).

Desta forma, o tecido conjuntivo bem vascularizado, que incorpora os folículos ovarianos é chamado de estroma (Van den Hurk & Santos, 2009). Sua matriz extracelular apresenta vários constituintes, como a elastina, a laminina, a fibronectina e o colágeno, sendo este último largamente distribuído nesse tecido. Contudo, sua morfologia varia entre o córtex e a medula. No córtex, as células do estroma são organizadas paralelamente à superfície e têm uma estrutura arredondada. Na medula, as células exibem organização aleatória e tem uma estrutura alongada, apresentando uma maior capacidade esteroidogênica; um fato que tem apoiado a hipótese de que as células do estroma são recrutadas pelo folículo e se diferenciar em células da teca (Shea et al., 2014).

Como comentado anteriormente, ainda durante a fase embrionária, o processo da oogênese começa com a formação de oócitos primários, oriundos da diferenciação de

oogônias, porém há um bloqueio no seu estágio de desenvolvimento, exatamente no diplóteno da profase I meiótica (dictióteno) (Fig.01). Nesse momento, o oócito, que particularmente em felino, apresenta um elevado teor lipídico (Luvoni et al. 1997), contém um núcleo chamado de vesícula germinativa (GV), que após o nascimento do indivíduo, é cercado por células da pré-granulosa, formando com isso folículos primordiais (Suh et al., 2002; Zuccotti et al. 2011).

Estudos em gatas domésticas têm sugerido que a transição do estágio folicular preantral para antral é crítico por permitir a GV adquirir capacidade meiótica e de desenvolvimento (Comizzoli et al. 2011). A capacidade oocitária de recomeço da meiose ocorre no início do estágio antral folicular. Enquanto que a competência de seu desenvolvimento é adquirida durante o final do crescimento do folículo antral (Zuccotti et al. 2002; Wu et al. 2006; Lodde et al. 2007). Portanto, para que a oogênese seja concluída, os oócitos primários precisam completar a sua primeira divisão meiótica, que ocorrerá apenas na puberdade (formando do primeiro corpúsculo polar), período no qual o oócito começa a crescer, e as células foliculares a se proliferar. Entretanto, assim que o folículo ovariano antral ficar maduro, oócito passará pela sua segunda parada da divisão meiótica (metáfase II), a qual só se completará quando o oócito for fecundado, liberando o segundo corpúsculo polar, e concluindo com isso a oogênese (Edson et al., 2009; Van den Hurk & Santos, 2009; Zuccotti et al. 2011).

Deste modo, após células da pré-granulosa serem recrutadas, pequenos folículos ovarianos são formados, estes são chamados de folículos primordiais e variam de 20 a 30 μm em diâmetro, apresentando oócitos ovoides ou esféricos em GV, com um citoplasma muito homogêneo e um grande núcleo excêntrico, com ausência de zona pelúcida. Estes folículos contêm de uma a oito células da pré-granulosa achatadas ou -? que cercam o oócito (Fig. 03A; B) (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Carrijo et al., 2010). Os folículos primordiais representam um estoque de células germinativas em quiescência, e podem ser considerados uma “forma de armazenamento”, o que constitui uma fonte valiosa de oócitos que podem ser utilizados para fins de fertilidade. Esses não são distribuídos uniformemente, mas encontram-se predominantemente no córtex do ovário, localizados em uma camada de 0,5 milímetros pouco vascularizada sob a túnica albugínea (Fig 03B) (Jewgenow & Paris, 2006; Lima, 2006; Van den Hurk; Santos, 2009). Apesar disso, folículos ovarianos de gata doméstica se assemelham com folículos encontrados em outras espécies de mamíferos, apresentando a principal distinção morfológica de uma enorme abundância de folículos primordiais localizados

em todo o córtex ovariano, abaixo da túnica albugínea (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Van den Hurk; Santos, 2009).

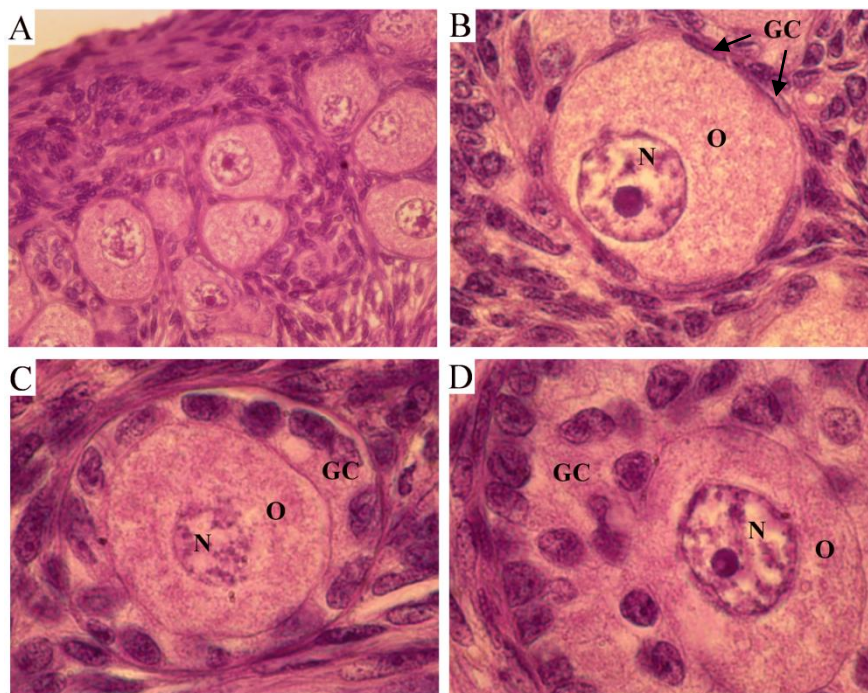


Fig 02. Cortes histológicas de tecido ovariano de gata, no qual pode-se observar os Folículos pré-antrais. (A,B) folículos primordiais; (C) Folículo primário; (D) Folículo secundário. Coloração HE.

À medida que se diferenciam, os folículos seguem em fases de ativação e desenvolvimento, podendo ser classificados adicionalmente como: Folículos de transição, primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios. O folículo de transição se diferencia do primordial, pois contém uma única camada de células da granulosa achatadas e cuboides, podendo ser evidentes duas formas celulares diferentes no folículo (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Edson et al., 2009). Quando aumentam de tamanho, afastam-se gradualmente do córtex próximo à túnica albugínea, sendo encontrados na fronteira cortico-medular, que é altamente vascularizado em mamíferos (Van Wezel & Rodgers, 1996; Jewgenow & Paris, 2006; Van den Hurk; Santos, 2009).

No tocante aos folículos primários (Fig.03C), estes são folículos em desenvolvimento, que contém oócitos variando de 30 a 50 μm em diâmetro e uma única camada de células da granulosa cuboides, associadas com o núcleo redondo e citoplasma contendo filamentos intermediários de vimentina, que são proteínas dinâmicas que compõem o citoesqueleto e que estão associadas a mudanças na forma das células da granulosa (de plana para cubóides), apresentando também uma intensa

atividade mitótica (Van den Hurk et al., 1995; 1997). Neste estágio, os oócitos são similares aos encontrados nos folículos primordiais, porém é observada em alguns folículos uma zona pelúcida bem formada, medindo 4,4 μm , em adição a uma membrana basal separando a camada de células da granulosa no estroma ovariano (Fig. 03) (Lintern-Moore, 1974; Barber et al., 2001; Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Van den Hurk; Santos, 2009; Carrijo et al., 2010).

Diferentemente, os folículos secundários (Fig.03D) variam muito em tamanho devido as suas múltiplas camadas de células da granulosa, podendo chegar de 100 a 400 μm , e geralmente possui um oócito de 40 a 75 μm de tamanho, com a zona pelúcida totalmente desenvolvida medindo 8,9 μm e diversas projeções de células da granulosa têm sido observadas invadindo a zona pelúcida, com protrusão em direção ao oócito, onde junções gap foram observadas entre membranas do oócito e células da granulosa, promovendo as trocas de nutrientes e de hormônios necessárias (Carrijo et al., 2010). Esses folículos apresentam duas ou mais camadas de células da granulosa, e o começo da formação da camada de células tecais (Fig 03D) (Barber et al., 2001; Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

Folículos terciários podem ser similares em diâmetro aos folículos secundários, porém eles aumentam de tamanho (300 a 1000 μm) com o acúmulo de fluido na cavidade folicular, o antro (Fig. 04). E, são cercados por duas a três camadas de células da teca. Os oócitos dos folículos antrais são de aproximadamente 75 a 90 μm de diâmetro (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Santos et al., 2008; Van den Hurk; Santos, 2009; Carrijo et al., 2010). Os folículos pré-ovulatórios, que corresponde ao estágio final do desenvolvimento folicular, variam de 2-3 mm de diâmetro e contém camadas de células da granulosa murais e do cumulus, várias camadas de células da teca e um grande espaço antral, com oócito que varia de 85 a 100 μm , apresentando uma zona pelúcida de 14,2 μm , que em gatas é exclusivamente produzida por células da granulosa (Barber et al., 2001; Jewgenow e Rudolph, 2001; Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Van den Hurk; Santos, 2009; Carrijo et al., 2010). Esse oócito encontra-se maturo no sentido nuclear, citoplasmática e molecular, que envolve a passagem para o estágio de metáfase II, alterações das junções cumulus-oolema, redistribuição celular de organelas, migração de mitocôndrias a um posição perinuclear, acúmulo de grânulos corticais ao longo da oolema, e pela síntese de proteínas necessárias para um futuro desenvolvimento embrionário (Ferreira et al., 2008; Santos et al., 2008; Van den Hurk; Santos, 2009).



Fig 04. Corte histológico de tecido ovariano de gata. Folículo antral. As letras significam: N- núcleo, O- oócito, ZP- zona pelúcida, CC- Células do cumulus, A- Antro, MC- células murais. Coloração PAS. Barra: 50µm

Além da classificação folicular em fases de quiescência, ativação e desenvolvimento, Figueiredo (1995) destaca que dependendo da ausência ou presença da cavidade antral os folículos podem ser divididos como: pré-antrais e antrais. Os folículos pré-antrais (Fig.02) são os primordiais, transição, primário e secundário, que representam mais 90% da população folicular presente no ovário mamífero (Saumande, 1981), e os folículos antrais (Fig.04) estão representados pelos folículos nos estágios terciários e os pré-ovulatórios. Em gatas adultas, Lima (2006) estimou a média da população de folículos ovarianos de 114.000,00 por ovário, com 85,5% de folículos primordiais, 3,5% de folículos primários, 4,0% de folículos secundários, 6,5% folículos terciários e 0,2% de folículos pré-ovulatórios. Entretanto, ao longo da vida reprodutiva de qualquer mamífero, uma pequena fração desses folículos produz oócitos maduros competentes à maturação e ovulação. O resto dos folículos (> 99,9%) se degenera por meio de um processo chamado de atresia (Jewgenow & Paris, 2006), que será discutido no próximo tópico.

Dinâmica folicular e o processo atrésico

A foliculogênese é o processo que consiste da formação, crescimento e maturação folicular, e se inicia com a formação de folículos primordiais e culmina com a ovulação por um folículo pré-ovulatório (Mclaren, 2000; Van den Hurk & Santos, 2009). Desta forma, para que haja um ponto de partida para o desenvolvimento de folículos ovarianos, os folículos primordiais precisam ser primeiramente ativados, o que vai ocorrer em pequenos grupos (Rüsse, 1983). Em princípio, a ordem de ativação dos

folículos primordiais é estabelecida de acordo com a ordem em que os mesmos foram formados (Picton et al., 2008). Após a ativação, os folículos primordiais desenvolvem-se, e junto com ele, também ocorre o crescimento e diferenciação do oócito, pelo seu aumento em tamanho, teor de proteína (Schultz & Wassarman, 1977) e transcrições essenciais para o desenvolvimento do embrião, que são acumulados para posterior maturação, tradução e clivagem de um futuro embrião (Eppig, 1994).

De modo geral, a foliculogênese ovariana é um processo sinérgico, em que a comunicação cruzada do complexo oócito-granulosa é essencial para que haja o desenvolvimento folicular em suas diferentes categorias (Santos et al., 2008; Van den Hurk & Santos, 2009). Além disso, os ovários de gata apresentam células estromais posicionadas a responder, multiplicar e crescer quando provocados por fatores de crescimento apropriados (Uchikura et al., 2010), que são responsáveis por essa dinâmica em folículos pré-antrais, apresentando um controle parácrino e autócrino, entre oócitos, células da teca, da granulosa e estromais do ovário (Buratini et al. 2007; Uchikura et al., 2010).

Desta forma, Pode-se citar alguns fatores de crescimento importantes (Ver Fig.05), como: *Fator de crescimento e diferenciação -9* (GDF-9, regula o recrutamento de folículos primordiais, a proliferação e diferenciação das células da granulosa), *Proteína morfogenética óssea -15 / -4* (BMP-15, homóloga da GDF-9; BMP-4, apresenta efeito estimulatório na transição do folículo primordial para primário), *Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1* (IGF-1, estimulador da proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento de células da granulosa), *Kit-ligante* (KL, estabelece um papel chave no crescimento oocitário e desenvolvimento estromal e folicular), *Hormônio anti-mülleriano* (AMH, inibidor da ativação e crescimento de folículos ovarianos), *Fator de crescimento epidermal* (EGF, fator mitogênico de células da granulosa), bem como citocinas e esteróides, que são compostos intrafoliculares importantes (Motta et al., 1997; McLaren, 2000; Driancourt et al, 2000; Erickson, 2001; Pereda et al., 2006; Santos et al., 2008; Edson et al., 2009; McLaughlin & McIver, 2009; Van den Hurk & Santos, 2009; Mani et al. De 2010). Adicionalmente, o desenvolvimento adequado de folículos pré-antrais dependerá também de vasos do estroma circundante, visto que esses folículos não apresentam suprimento vascular próprio (Stouffer et al., 2001).

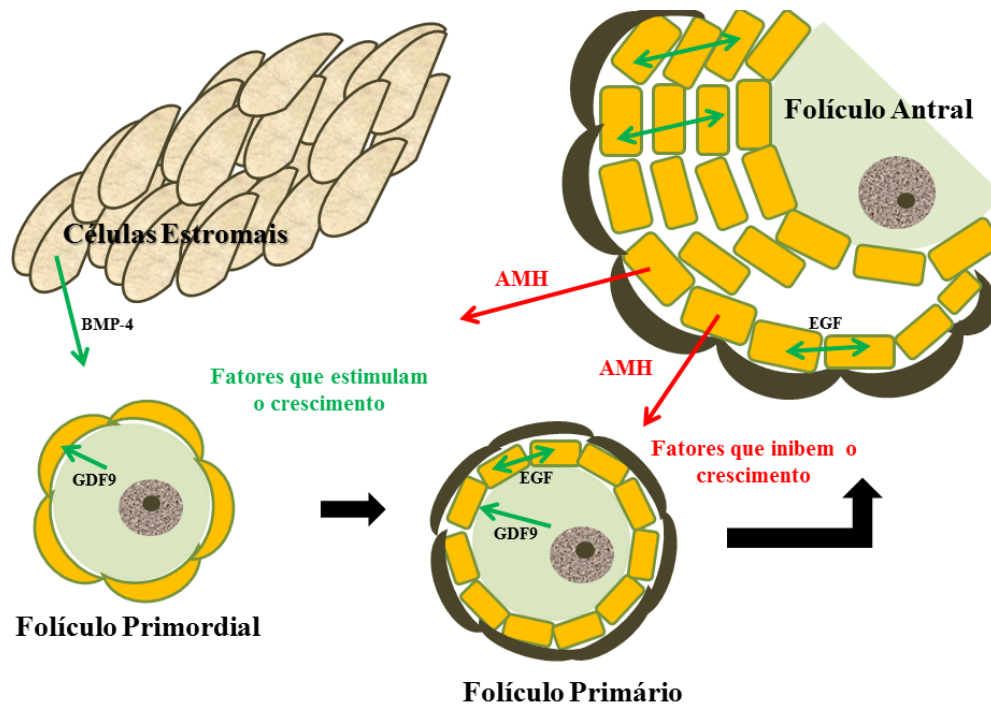


Fig 05. Figura esquemática de fatores de crescimento que estimulam e que inibem o desenvolvimento folicular. Podendo destacar: **BMP-4**, produzidas por células estromais e tecais; **GDF9**, fator abundante em folículos primordiais e primários, secretados pelo oócito; **EGF**, produzido por folículos primários, secundários e terciários; **AMH**, produzido por células da granulosa.

Por outro lado, os folículos antrais (Fig.03) são estritamente dependentes de gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), para o seu desenvolvimento e para a formação do antro. Para tanto, a camada tecal do folículo adquire uma bainha vascular, que contém redes capilares. Esses vasos proporcionam um aumento da oferta de gonadotrofinas, fatores de crescimento, oxigênio e precursores de esteróides, bem como outras substâncias, para o folículo produzir o líquido antral, e com isso, crescer (Baker & Spears, 1999).

As gonadotrofinas atuam em células foliculares com receptores de superfície da célula. Apesar do FSH se ligar exclusivamente ao receptor de FSH (FSH-R) em células da granulosa, desde os folículos secundários em diante, este hormônio pode agir indiretamente sobre os folículos primordiais, através de fatores parácrinos secretados pelos folículos maiores ou células estromais (Matos et al., 2011). A aquisição do receptor de LH (LH-R) por células da granulosa em folículos pré-ovulatórios depende da ação de FSH, o que aumenta a transcrição do gene de LH-R (Gougeon, 1996; Saraiva et al., 2008; Fabbri et al., 2012).

Esse fornecimento vascular promove o recrutamento e a seleção de folículos, tornando-se ou subordinados ou dominantes, dependendo de sua responsividade ao FSH, para os que mais apresentarem receptores para este hormônio. Entretanto, durante esse desenvolvimento folicular, a produção de estrógeno e inibina aumentam, sendo inclusive relatada uma maior concentração de estrógeno no fluido folicular de dominantes em comparação aos folículos subordinados (Badinga et al., 1992; Fortune, 1994). Provocando, com isso, um *feedback* negativo, que leva a uma queda do FSH. O folículo dominante sobrevive a essa queda, e prossegue seu desenvolvimento até o folículo pré-ovulatório. Mostrando, desta forma, que tanto a regulação endócrina como a intraovariana estão completamente envolvidas na seleção dos grupos foliculares. Contudo, a interação folículo-folículo também é essencial, por produzir moléculas sinalizadoras e inibidoras, como o AMH, que são produzidos em células da granulosa, fazendo com que alguns outros folículos comecem a retardar, tornando-se subordinados, ou levados à atresia por apoptose (Fig.05) (Baker & Spears, 1999; Axner & Holst, 2015).

O folículo pré-ovulatório pode ser caracterizado morfológicamente por várias camadas de células da granulosa, que apresentam fenótipos diferentes dependendo da sua proximidade em relação à lâmina basal folicular ou ao oócito. Essas células diferenciam-se em duas populações: as *células da granulosa murais*, que se alinham na parede folicular e estão cercadas por uma camada tecal, com parte interna bem vascularizada, com abundantes células esteroideogênicas distribuídas em um tecido conjuntivo frouxo, e outra parte externa, que consiste principalmente de tecido conjuntivo denso; e as *células da granulosa do cumulus*, que estão associados com o oócito, e que apoiam o desenvolvimento do mesmo. (Van den Hurk & Santos, 2009; Wigglesworth et al., 2015).

Contudo, essa diferenciação ocorre através do FSH, de fatores presentes no microambiente de células da granulosa, de estrógenos e de fatores parácrinos derivados de oócitos. Todavia, os folículos que atingirem tamanho suficiente apresentando receptores de LH em suas células da granulosa, podem promover destinos diferentes a essas populações após o pico pré-ovulatório do LH e a ovulação, que depende de uma impregnação suficiente de estrógeno (Malandain et al., 2011). As células murais, como permanecem dentro do ovário, participam na formação do corpo lúteo, e as do *cumulus* sofrem expansão e acompanham o oócito em metáfase II pelo oviduto, durante a ovulação (Dekel et al., 1979). As células do *cumulus* na primeira camada em torno do

oócito são chamadas de corona radiada; e tanto as células de corona quanto as do cumulus comunicam com a membrana do oócito através de extensões (Wigglesworth et al., 2014).

O corpo lúteo é uma glândula endócrina, que se desenvolve de forma temporária para a produção e secreção de progesterona. Curiosamente, a lince (*Lynx spp*) evoluiu uma fisiologia ovariana única, diferente da gata doméstica e de outros felinos, com um corpo lúteo persistente e níveis de progesterona elevada (P4, níveis basais de 5 ng/mL), durante todo o ano. O corpo lúteo permanece ativo, incluindo a secreção de P4, durante pelo menos 2 anos (Painer et al., 2014). Adicionalmente, tanto o folículo ovariano e como o corpo lúteo também podem produzir vários fatores angiogênicos. Dentre estes, acredita-se que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese no ovário (Tamanini & de Ambrogi, 2004), que parece está envolvido em diversos processos, incluindo a sobrevivência folicular e crescimento (Danforth et al 2003; Quintana et al., 2004; Roberts et al. 2007).

Com isso, independente da dinâmica observada na foliculogênese (diferenciação, ativação, desenvolvimento, sobrevivência, dominância e ovulação), este processo, que é continuado ao longo de sua vida reprodutiva, pode declinar em gatas mais velhas (após 8 anos de idade), deixando de apresentar um ciclo reprodutivo regular, o que pode levar à infertilidade ou baixa fertilidade. Esse fenômeno é natural com o avanço da idade em mamíferos no geral, pois o número de folículos primordiais degenerados aumenta (Erickson, 1966). Inclusive pode haver o esgotamento de suprimento de oócitos, ocorrendo uma senescência ovariana em algumas espécies (Asselin et al., 2000; Kim & Tilly, 2004; Krisko et al., 2008; Santos et al., 2008). Muitos estudos confirmam que esse processo, chamado de atresia ou morte folicular, é um fenômeno fisiológico e destino da maioria dos folículos, visto que, menos de 1% deles ovulam, enquanto que o resto torna-se atrésicos, por meio da degeneração celular (Saumande, 1991; Reynaud & Driancourt, 2000) ou por apoptose (morte celular programada) (Asselin et al., 2000; Santos et al., 2008; Van den Hurk & Santos, 2009).

Com o avanço da idade de mamíferos no geral, o número de folículos primordiais degenerados aumenta (Erickson, 1966) por atresia. Atresia ou morte folicular, é um fenômeno fisiológico e destino da maioria dos folículos, visto que, menos de 1% deles ovulam, enquanto que o resto torna-se atrésicos, por meio da degeneração celular (Saumande, 1991; Reynaud & Driancourt, 2000) ou por apoptose

(morte celular programada) (Asselin et al., 2000; Santos et al., 2008; Van den Hurk & Santos, 2009).

A atresia folicular em gatas é semelhante ao que ocorre em outras espécies. Porém, estudos mostram que o complexo oócito-folículo em gatas sofre um elevado índice de atresia folicular (cerca de 64%), que é independente da fase folicular ou luteal do indivíduo (Wood et al., 1997). Em folículos pré-antrais, o primeiro índice de degeneração é deteriorização oocitária. Entretanto, em antrais, o primeiro indicador são as células murais, que mudam sua estrutura organizacional, e isso é seguido por picnose nuclear (condenação apoptótica), quebra da membrana basal, encolhimento ou fragmentação de células da granulosa e corpos atrésicos na cavidade antral (Jewgenow et al., 1997).

Na maioria dos folículos antrais, a atresia no citoplasma do oócito se mostra gradual, apresentando vacúolos centralizados e um aumento de transparência do citoplasma. O oócito degenerado e a zona pelúcida (ou ambos) são as últimas estruturas que podem ser visualizadas num folículo em estágio avançado de atresia, e o último estágio é a invasão da cavidade folicular por fibroblastos e a reorganização do tecido intersticial (Wood et al., 1997, Crestana, 2006). Entretanto, esse alto índice de degeneração folicular em gatas tb está relacionado às ondas naturais de crescimento folicular que ocorre continuamente através da sua vida adulta (Wood et al., 1997). Adicionalmente, vários estudos indicam também que a atresia folicular em espécies mamíferas ocorre devido ao acúmulo de frequentes metabólitos tóxicos resultados de estresse oxidativo (Hirshfield, 1991; Nakao & Nakatsuji, 1992; Salavati et al., 2012). E, que o início da apoptose na camada interna tecal e em células da granulosa pode sugerir atresia patológica de estresse oxidativo ao invés de atresia fisiológica (Jewgenow et al., 2011)

Ciclo reprodutivo em gatas

A gata doméstica (*Felis catus*) é descrita como sendo poliéstrica sazonal, em clima temperado. Entretanto, pode se apresentar como poliéstricas contínuas em regiões tropicais, onde não há definição clara das estações do ano (Feldman & Nelson, 1996). As gatas apresentam classicamente uma ovulação induzida, que ocorre somente quando níveis adequados de LH, desencadeada pela cópula, são liberados. Para tanto mais de uma cópula é requerida (Wildt et al., 1980; Concannon et al., 1980; Johnston et al., 2001). Entretanto, a ovulação pode acontecer também de forma espontânea, na

ausência de estimulação cervical, baseada em sinais visuais e feromônios (Feldman & Nelson, 1996; Gudermuth et al., 1997; Pelican et al., 2005).

O recrutamento cíclico de mamíferos começa depois do início da puberdade, que em gatos ocorre de 4-12 meses de idade (Fig. 01), dependendo da raça, fotoperíodo e peso corporal (Scott, 1970; Jemmett & Evans, 1977; Lofstedt, 1982). E esse processo é o resultado de um aumento na circulação de FSH durante cada ciclo reprodutivo, enquanto o pico de LH induz a maturação completa folicular e a ovulação de folículos pré-ovulatórios (Yen, 1999). Sendo assim, o ciclo reprodutivo da gata geralmente consiste de um período anovulatório (proestro e estro), interestro, diestro que leva ou a pseudogravidez ou prenhez e o anestro, que é a ausência de ciclicidade (Ver Tabela 02).

Tabela 02. O ciclo estral da gata doméstica

	Período anovulatório		Retorno do ciclo	Fase Luteal	Ausência de ciclicidade
	Proestro	Estro	Interestro	Diestro	Anestro
Duração	1-2 dias	7 dias	7 dias	60 dias (gata grávida) ou 40 dias (pseudogravidez após gata ovular e não fertilizar)	Variável
Sinais	Agachamento, vocalização, rolamentos e lordoses	Receptividade acasalamento	Nenhum (gata não copulou ou copulou e não ovulou)	Nenhum	Sexualmente inativa
Atividade hormonal	FSH induzirá a recrutamento e desenvolvimento de folículos ovarianos	Pico do nível de estrógeno, sensibilizando o eixo hipotálamo-hipófise para a secreção de LH	Níveis basais de estrógeno e progesterona	Alto nível de progesterona	Níveis basais de estrógeno e progesterona
Situação folicular	3-7 folículos tornam-se dominantes	Ruptura simultânea de todos os folículos pré-ovulatórios (Ovulação)	Nova onda folicular	Formação do corpo lúteo	Sem onda folicular

O proestro é a primeira fase do ciclo durante o período sexualmente ativo, que dura de 1-2 dias, e é neste tempo que FSH induzirá a recrutamento e desenvolvimento de folículos ovarianos, portanto o animal não permitirá o acasalamento (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). Na sequência, em virtude do crescimento dos folículos ovarianos, há o aumento de secreção do estradiol pelas células da granulosa, e isso estimula o espessamento do epitélio vaginal e provoca o estro comportamental (agachamento, vocalização, rolamentos e lordoses), entrando com isso, na segunda parte da fase anovulatória (Shille et al., 1979). Com a aproximação do estro, de três a sete folículos tornam-se dominantes, enquanto outros folículos em desenvolvimento sofrem atresia, e uma única onda folicular desenvolve-se durante o cio (Feldman & Nelson, 1996; Wildt et al., 1981; Malandain et al., 2011).

O estro dura em média sete dias, e é caracterizado pela receptividade para acasalamento, pico do nível de estrógeno, sensibilizando o eixo hipotálamo-hipófise para a secreção de LH (Shille et al., 1979; Johnston et al., 2001). A liberação de LH, de ampla variação individual (Glover et al., 1985), é o fator importante no ciclo reprodutivo de todas as espécies de ovulação induzida por estímulos físicos e normalmente coito. Sua ocorrência é em cerca de 15 minutos após a cópula ou estímulo similar, com pico em duas horas e retorno aos níveis basais em oito horas (Concannon et al., 1980; Johnson & Gay, 1981). O pico de LH provocará a ovulação, que ocorre entre 24 a 54 horas após a estimulação, com ruptura simultânea de todos os folículos pré-ovulatórios (2,5 a 3,5 mm) presentes nos ovários, entre três e sete folículos naturalmente selecionados (Concannon et al., 1980; Shille et al., 1983; Rojo et al., 2015). A ocorrência da ovulação durante o estro depende de um nível adequado de LH lançado, o qual, por sua vez, depende do número de cópulas (normalmente várias são exigidas) e do intervalo de tempo entre elas (Concannon et al., 1980; Johnson & Gay, 1981).

Por outro lado, há relatos de níveis de progesterona alta no soro de gatas alojadas em colônias, e a presença de corpo lúteo em fêmeas que não tiveram contato físico com um macho (Bristol-Gould & Woodruff, 2004). Estes resultados sugerem que gatas podem ovular espontaneamente, por um estímulo diferente do coito, ou que podem ser submetidos a luteinização folicular, em vez de atresia. (Bristol-Gould & Woodruff, 2006; Carrijo., 2009). Assim como também, em contra partida, algumas fêmeas, mesmo com muitas cópulas, podem não ovular. Esse fato pode ser devido à aceitação da cópula de algumas gatas antes da maturação completa dos folículos, que reflete ao padrão de

expressão de receptores de gonadotropinas em ovário de felinos domésticos, que pode ser caracterizada por uma forte expressão LHR no tecido intersticial do ovário e uma aquisição inicial de LHR em células da granulosa de folículos em crescimento (Paape et al., 1975; Tsutsui & Stabenfeldt, 1993).

Desta forma, caso a gata não copule ou copule e não ovule, ela entra numa fase de interestro (pós cio), que dura cerca de uma semana, seguindo novamente do proestro e estro, ou seja, sucessivos ciclos estrais podem ocorrer, sem entrar no metaestro (tempo de desenvolvimento do corpo lúteo) (Shille et al., 1979). Porém, se ovular, há a formação do corpo lúteo, e com isso, a entrada na fase de diestro. Durante este período existem corpos lúteos funcionais, acompanhados por um alto nível de progesterona no soro. O diestro dura aproximadamente 60 dias na gata grávida, mas se há ovulação e a fertilização não ocorrer, uma pseudogestação com duração de aproximadamente 40 dias irá advir. Por fim, o anestro é caracterizado como a ausência de ciclicidade ovariana que ocorre em dias curtos. Os níveis de estradiol e progesterona nesta fase estão em níveis basais e a gata se encontra sexualmente inativa (Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

BIOTECNOLOGIA VOLTADA PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

O esclarecimento dos principais fatores que controlam diferentes fases da foliculogênese e do ciclo reprodutivo é importante na otimização da utilização do gameta feminino. Esse conhecimento pode ser também a chave para melhorar a eficiência de protocolos de biotécnicas voltadas à preservação da fertilidade em fêmeas. Nessa perspectiva, essas biotécnicas podem ser alternativas para a preservação de recursos genéticos, a fim tanto de restaurar populações de felinos silvestres ameaçadas de extinção ou com dificuldades reprodutivas em cativeiros. Dentro desse contexto, algumas dessas alternativas reprodutivas podem ser: a manipulação de oócitos *in situ* e *ex situ*, Cultivo *in vitro* (CIV), fertilização *in vitro* (FIV), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a criopreservação de material genético que é uma das mais utilizadas (Wolf et al., 2004; Domingues & Caldas-Bussiere, 2006; Santos et al., 2008; Arat et al., 2011; Lima et al., 2012; Brito et al., 2014).

A criopreservação é um método bastante empregado na biologia reprodutiva, e objetiva preservar tecidos animais, células germinativas (espermatozóides e oócitos) e outros tipos celulares, para formação de bancos de germoplasma, em temperatura de nitrogênio líquido (-196°C), estabilizando o material genético (Mcgee Jr & Martin, 1962). Com isso, a criopreservação possibilita o aperfeiçoamento de técnicas de

reprodução assistida, permitindo o planejamento do uso do material, podendo ser estocado por tempo indeterminado (Santos et al., 2010; Wiedermann et al., 2013; Tampradit et al., 2015). Desta forma, dentre os tipos de oócitos que podem ser criopreservados, estão os oócitos imaturos (em vesícula germinativa) inclusos em folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano (in situ) (Newton et al., 1996; Candy et al., 1997) ou isolados do próprio tecido (ex situ) (Jewgenow et al., 1998).

No tocante à criopreservação de folículos pré-antrais in situ, ela pode permitir o uso de um número muito maior de oócitos imaturos (em folículos com vários estágios de desenvolvimento), sendo com isso, uma técnica promissora, podendo ser obtidos tanto de indivíduos pré-púberes, como de adultos. Além do mais, preservação de tecido implica que, além de oócitos, células somáticas sejam preservadas, oferecendo também um adequado ambiente para o crescimento e maturação do oócito através da produção de fatores locais e esteroides (Shaw et al., 2000). Adicionalmente a isto, são mais resistentes à criolesão: por serem de menor tamanho, com células da granulosa em menor quantidade, com baixa taxa metabólica, oócito com núcleo em estágio de prófase da primeira divisão meiótica, com ausência de grânulos corticais e baixa quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos sensíveis à criopreservação (Shaw et al., 2000; Leonel, 2013). Em contrapartida, há um desafio para os profissionais de reprodução, porque tecido ovariano é composto por diferentes tipos de células, que apresentam requisitos distintos para a sobrevivência, assim como também podem apresentar uma lenta perfusão dos agentes crioprotetores (Hovatta, 2005).

Vitrificação de tecido ovariano

A criopreservação pode ser realizada por dois métodos básicos: a congelação convencional ou lenta e a vitrificação (Santos et al., 2008). O método convencional (ou lento), conhecido também como taxa controlada de congelação, requer a utilização de um equipamento de congelação programável, equipamento de alto custo, que pode garantir declínio gradual controlado da temperatura (Hredzák et al., 2005), sendo caracterizada pela exposição do material a baixas concentrações de agentes crioprotetores (Paynter, 2000; Cecconi et al., 2004; Celestino et al., 2007; Faustino et al., 2010) por um período de 20 (Rodrigues et al., 2004; Santos et al., 2006a; 2009) ou 60 minutos (Bao et al., 2010). Em felinos, estudos mostraram que protocolos de congelamento lento não afetam a sobrevivência de folículos ovarianos, podendo ser usado tanto para a espécies domésticas (Bosh et al., 2004; Lima et al., 2006), quanto

para espécies selvagens que inclusive sobrevivem até após cultivo *in vitro* (Wiedemann et al., 2013). Porém, para felinos a congelação ainda é considerada experimental, por causa de baixas taxas de sobrevivência após descongelamento, e a falta de um protocolo viável para programas de reprodução assistida, principalmente atribuído à criosensibilidade de oócitos felinos, pelo seu elevado teor lipídico, que pode afetar sua sobrevivência por mudanças em propriedades físico-químicas de lipídeos intracelulares, responsável pela formação de gelo intracelular desigual (Luvoni et al. 1997).

Entretanto, diferentemente do congelamento, a vitrificação é um método mais rápido (20.000 a 40.000°C/min) (Lin et al., 2008), simples e menos oneroso não requer equipamentos especiais e pode ser realizado no campo, após a morte de um animal selvagem. Foi idealizada por Luyet em 1937, e depois de quase 50 anos, essa técnica foi descrita pela primeira vez por Rall e Fahy (1985), como uma alternativa ao processo de congelamento lento, sendo caracterizado por um resfriamento ultra-rápido, sem formação de grandes cristais de gelo (uma das principais causas de danos celulares), ocorrendo uma subsequente formação de um estado vítreo (sólido amorfo), no qual a água é solidificada, mas não se expande, devido ao grande aumento na viscosidade da solução para um ponto onde as moléculas ficam imobilizadas e a amostra adquire as propriedades de um sólido (Hredzák et al., 2005; Santos et al., 2007; 2010). Esse método envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de crioprotetores (geralmente entre 4 a 6 mol/L), e por isso só podem ser expostas a um pequeno período de tempo e/ou um volume mínimo da solução (25 segundos a 5 minutos), seguido ao nitrogênio líquido (Arav et al., 2002). Entretanto, altas concentrações de crioprotetores podem causar toxicidade e também resultar em estresse osmótico, e conseqüente dano celular (Luvoni, 2006; Santos et al., 2008; 2010).

A vitrificação utiliza um volume mínimo de solução, como estratégia para reduzir os danos causados pelo choque osmótico, bem como efeito solução, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e conseqüente alteração na função celular (Fahy, 1980). Várias ferramentas têm sido usadas para minimizar os efeitos do volume ao submergir a amostra rapidamente no nitrogênio líquido, tais como, grades de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996; Park et al., 1999), capilares dentro de palhetas *open pulled straws* (OPS) (Vatja et al., 1998), *cryoloops* (Fuchinoue et al., 2004), *cryotops* e *cryotips* (Kuwayama et al., 2005; Kuwayama, 2007). Com a idéia de que, quanto menor o volume melhor, pois representa uma taxa de resfriamento maior evitando formações de

cristais de gelo e diminuição do efeito tóxico do crioprotetor nos materiais biológicos. Porém, a vitrificação com a ajuda de palhetas ou grades de microscopia eletrônica, não tem levado a um sucedido armazenamento de tecido ovariano. Além disso, em gatas domésticas, há poucos estudos de procedimentos de vitrificação eficientes de tecido ovariano. Embora alguns estudos pioneiros mostraram a preservação da integridade de oócito e folículo de tecido ovariano vitrificado (criotubo: Alves et al., 2012; *cryotops*: Luvoni et al., 2012), os resultados ainda estão abaixo do ideal, como observado no estudo de Tampradit et al. (2015), no qual não conseguiram bons resultados no protocolo de vitrificação, apresentando baixas taxas de folículos primordiais morfolologicamente normais (28,3%), utilizando criotubos como forma de armazenamento.

Entretanto, um trabalho recente demonstrou em um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de gata, utilizando a técnica do SSV (Brito et al., 2016). A vitrificação de superfície sólida (SSV) foi desenvolvida em tecido ovariano de cabra (Santos et al., 2007b), e é uma técnica que consiste de um cubo de alumínio aberto que é colocado em uma caixa de isopor e submerso no nitrogênio líquido, o material biológico crioprotetido é posto sobre a superfície superior fria do cubo, e instantaneamente vitrificado (revisado por Van den Hurk & Santos, 2009). No entanto, quando um sistema aberto é utilizado, o contato da amostra com o vapor de nitrogênio pode permitir a exposição a agentes patogênicos resistentes às temperaturas criogênicas (Grout & Morris, 2009). Por conseguinte, com objetivo de melhorar a técnica, foi desenvolvido um sistemas de vitrificação chamado de *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC), que é um novo método de vitrificação de tecido ovariano desenvolvido em caprinos, que manteve a morfologia e viabilidade dos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano vitrificado semelhante ao controle fresco. O OTC é uma estrutura metálica cilíndrica composta por uma base na qual as amostras são colocadas, uma inserção contendo perfurações para permitir a exposição e remoção da solução de vitrificação e uma tampa para fechar hermeticamente o dispositivo. Este dispositivo evita o contato com o nitrogênio líquido e melhora a troca de calor, sem expor o tecido do ovário aos contaminantes (Carvalho et al., 2013).

Bandeira et al. (2014) fizeram a comparação do OTC com o SSV, a fim de avaliar a influência dos métodos de vitrificação na matriz extracelular e no desenvolvimento folicular ovariano, e concluíram que o método OTC é mais eficiente que o SSV por preservar a viabilidade e morfologia folicular e permitir um melhor

desenvolvimento do folículo ovariano, além de ser capaz de manter a integridade dos componentes da matriz extracelular do ovário em ovinos. Carvalho et al. (2013) acrescentam ainda que a densidade celular de estroma não é reduzida pelo OTC e sugere que ele satisfatoriamente armazenada a população de células estromais e que nele o estresse oxidativo parece não afetá-las.

Por outro lado, assim como na vitrificação os métodos adequados são fundamentais para a manutenção da morfologia e viabilidade do tecido ovariano, a solução de vitrificação (meio-base, crioprotetores intra e extracelulares, antioxidantes e outros suplementos) é fundamental, tanto quanto o aquecimento ou devitrificação, com a remoção ou diluição do agente crioprotetor, são críticos para a preservação do tecido, mantendo-o vivo para posterior uso (Santos et al., 2008). Portanto, ao devitrificar, o crioprotetor é removido por meio de banhos sucessivos, isso permite uma saída controlada de crioprotetor através da membrana. O agente crioprotetor interno pode ser removido em um (Leibo, 1984), três (Rodrigues et al., 2004) ou mesmo seis passos (Shelton, 1992). Embora um passo de lavagem pareça ser mais prático em embriões, os resultados mais bem sucedidos com tecido ovariano foram obtidos após três etapas de lavagem (Lima et al, 2006; Santos et al, 2006b). Contudo, no tocante à solução de vitrificação, a seguir irá ser destacado componentes chaves que são cruciais para o sucesso da técnica.

1- Meio-base na vitrificação

As soluções de vitrificação para animais domésticos e silvestres, usualmente apresentam como meio-base o *Minimum Essential Medium* (MEM), *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), ou Tissue Culture Medium 199 (TCM199) (Lima et al., 2006; Santos et al., 2007; Celestino et al., 2010; Fahem et al., 2013; Brito et al., 2014), porém todos apresentam vermelho fenol na sua composição, como indicador de pH. Entretanto, estudos têm mostrado sucesso na vitrificação de tecido ovariano com meio-base livre de vermelho fenol, como no caso do meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Mayerhofer et al., 2010), tampão fosfato salina (PBS) (Fabbri et al., 2014) e o Dulbecco's PBS (Youm et al., 2014). Baseado nisso e na criosensibilidade dos oócitos felinos, recentemente foi desenvolvido um estudo mostrando que o sucesso da vitrificação de tecido ovariano de gata depende do meio-base utilizado (Brito et al., 2016). Foi descoberto através da comparação de quatro meios comercialmente usados em soluções de criopreservação (DMEM, MEM, TCM, and RPMI-1640), que o

vermelho fenol tem um efeito prejudicial na morfologia de folículos pré-antrais de tecido ovariano vitrificado de gata doméstica. E dentre estes, o RPMI-1640 é o único que não apresenta cloreto de cálcio e nem vermelho fenol, contudo foi observado que quando acrescentados, principalmente o vermelho fenol, no meio, foram responsáveis pela degeneração folicular no tecido ovariano vitrificado.

Adicionalmente, Zhu et al. (2012) relataram o vermelho fenol como o agente causador da toxicidade em células HeLa de cultura num meio isento de soro, e associaram a internalização do vermelho fenol com a interação com nanopartículas de carbono presentes no meio de cultivo. No mesmo estudo em gatas, foi avaliado também a relação de interação entre o vermelho fenol com o etilenoglicol (EG - crioprotetor intracelular) em diferentes concentrações, e foi observado que quanto maior a concentração de EG houve uma redução de vermelho fenol no meio de exposição, sugerindo com isso que o EG interagiu com vermelho fenol facilitando sua penetração no tecido, e com isso o aumento da degeneração dos folículos de tecido ovariano de gata (Brito et al., 2016).

2- Agentes crioprotetores (ACPs) intra e extracelulares

Os ACPs são agentes químicos que protegem as células contra formação de cristais de gelo, desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. No geral, esses agentes podem penetrar com facilidade as membranas das células (ACP intracelular ou permeáveis), substituindo parcialmente moléculas de água que saíram em virtude da criopreservação, formando ponte de hidrogênio com moléculas de água intracelular remanescentes, atrasando, com isso, a diminuição da temperatura da mistura resultante, prevenindo assim, a cristalização de gelo (Rall et al., 1984; Pereira & Marques, 2008). Em contrapartida, há os que não penetram, ACP extracelular ou não-permeáveis, permanecendo no meio extracelular para proteger o material biológico com a retirada de água de dentro da célula causando desidratação e aumento da concentração de ACP intracelular. Além disso, as membranas celulares são protegidas pelos ACPs extracelulares, por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos, mantendo a estabilidade da membrana; assim como também, pode aumentar a viscosidade do meio, diminuir a concentração de eletrólitos durante a criopreservação, evitando riscos osmóticos (Santos, 2007; Santos et al., 2008; 2010).

A maioria dos protocolos de criopreservação foram realizados na presença de ACPs intracelulares como o dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2-propanodiol ou propileno

glicol (PROH), etilenoglicol ou etanodiol-1,2 ou glicol (EG) e glicerol ou glicerina ou 1,2,3-Propanotriol (GLI), em concentrações variando de 0,5 a 3,0 M (Newton et al, 1996; Rodrigues et al, 2004; Santos et al, 2006a; 2006b, 2007a; 2007b; 2008b; Celestino et al., 2007), apresentando massas moleculares de 78 g/mol, 76,09 g/mol, 62,07 g/mol, 92,09 g/mol com temperatura de congelamento de 18,5°C, -60°C, 13°C, 17,8°C, respectivamente. O mecanismo de ação desses crioprotetores tem como base a ligação a estruturas que promovem pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Estas ligações mudam a orientação da molécula de água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (Dalimata & Graham, 1997; Lima, 2006).

Para a maioria das células, o glicerol é o agente de escolha porque é geralmente menos tóxico do que o DMSO. Mas, DMSO é mais penetrante, e é geralmente o agente de escolha para as células maiores e mais complexas (Eroglu et al., 2000; Eroglu et al., 2002). Entretanto, de acordo com Fuku et al. (1992), o DMSO, PROH e EG possuem maior capacidade de penetração à membrana celular que o GLI, o que pode levar à menores taxas de folículos pré-antrais viáveis. Adicionalmente, Hovatta (2000) observou que o EG penetra no tecido mais rapidamente que o PROH e DMSO e que o GLI possui uma ação mais lenta e, conseqüentemente, menos eficiente. Por sua vez, o uso de PROH como crioprotector pode causar efeitos deletérios no tecido estromal e nos folículos, com isso, a utilização de outros agentes crioprotectores pode ser indicada para fornecer um seguro método de preservação da fertilidade em fêmeas (Oskam et al., 2010).

PINTO et al. (2008) mostraram ser possível manter a viabilidade folicular após criopreservação de tecido ovariano exposta a baixas concentrações de DMSO (1,0 M, durante 10 min), bem como em um curto período (5 minutos a 1,5 ou 2,0 M DMSO). No entanto, Rodrigues et al. (2006) demonstraram que a viabilidade folicular após 5 dias de cultivo de FOPAs criopreservados foi similar DMSO ou EG, tanto no fragmento do tecido ovariano quanto nos folículos isolados. Várias pesquisas mostram ambos crioprotetores sendo utilizados com sucesso para criopreservação de tecido ovariano (CECCONI et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2006; CELESTINO et al., 2007; FAUSTINO et al., 2010; JIN et al., 2010). No entanto, Santos et al. (2006b) demonstraram que a utilização de EG e sacarose parece ser importante para a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais, sendo o EG mais eficiente que o DMSO, em virtude de seu peso molecular ser mais leve (62.07 kDa) que o DMSO (78.13 kDa), facilitando com isso sua penetração no tecido ovariano.

Em gatas, o EG sozinho tem sido o crioprotetor intracelular de escolha. Lima et al. (2006) comparou o uso de 1,5M glicerol e EG na criopreservação de tecido ovariano, e observaram que a percentagem de folículos pré-antrais apresentou maior taxa de normalidade morfológica na presença de EG. Da mesma forma, Wiedermann et al. (2013) utilizaram em seu protocolo de criopreservação de tecido ovariano 1,5M de EG. Na vitrificação, Alves et al. (2012) e Luvoni et al. (2012) utilizaram o mesmo protocolo, associando 2M DMSO, 1M acetamida e 3M propileno glicol (DAP 213), e tiveram folículos ovarianos preservados após vitrificação. Entretanto, Tanpradit et al. (2015) compararam a congelação lenta com a vitrificação de tecido ovariano de gata, utilizando 1,5M DMSO e a associação em duas etapas de DMSO (1° etapa: 0,96M e 2° etapa: 1,92M) com EG (1° etapa: 1,21M e 2° etapa: 2,42M), respectivamente, e concluíram que a congelação lenta é melhor que a vitrificação, pois apresentou maiores taxas de sobrevivência folicular, porém ambos apresentaram diferença estatística com o grupo controle.

No tocante aos ACPs extracelulares, os mais utilizados na criopreservação são: sacarose, rafinose, trealose e proteínas (soro fetal bovino), todos em várias concentrações. Entretanto, além de seu efeito crioprotetor, estas substâncias também podem ser tóxicas para as células, principalmente durante o período de exposição (Rodrigues et al, 2004; 2006; Santos et al, 2006a; 2007a; Celestino et al, 2007). Assim como também podem conter agentes infecciosos ou prions, que não são destruídas pelo processo de criopreservação, como no caso das proteínas animais (soro fetal, gema de ovo), que são particularmente preocupantes em todo o processo, pois podem transferir doenças, por isso, a eliminação desses aditivos de origem animal continua a ser a melhor abordagem (revisado por Van den Hurk & Santos, 2009; Santana et al., 2012). Entretanto, todos os açúcares são amplamente usados como crioprotectores naturais, e sua combinação com outros mais ACP intracelulares torna a criopreservação menos tóxica e mais eficaz do que se for utilizado um único tipo (Edyta & Ali, 2011).

Todos os açúcares citados acima são usados devido sua capacidade de conter o choque osmótico durante a vitrificação, proteger e estabilizar proteínas e outras bioestruturas na membrana celular, e melhora a habilidade dos crioprotetores intracelulares de alcançar um estado vítreo (Crowe et al., 1998; Crowe et al., 1996; Courbière et al., 2009). Entretanto, as diferenças básicas entre esses açúcares estão na sua estrutura química, peso molecular e sua dinâmica e afinidade química, e esse entendimento é fundamental para a formulação de soluções eficazes de vitrificação. A

sacarose é um dissacarídeo de glicose e frutose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), com peso molecular de 342.30 g/mol, e é um crioprotetor extracelular que tem sido bastante aplicada na criopreservação (Marsella et al., 2008; Herraiz et al., 2014; Youm et al., 2014). Tanpradit et al. (2015) verificaram que a morfologia de tecido ovariano de gata doméstica congelado em 1,5M DMSO com 0,1M sacarose tende a proteger células foliculares e estromais ligeiramente melhor que na concentração de 0,3M do açúcar, porém no mesmo estudo quando o material foi vitrificado em 20% FCS, 1,92M DMSO, 2,42M etileno glicol e 0,5M de sacarose mostrou resultados inferiores que o congelado.

Mouttham et al. (2015) relataram que a presença ou ausência de 0,5M sacarose na solução de vitrificação não afeta a morfologia folicular de tecido ovariano fetal de bovino. Da mesma forma, em um estudo recente em gatas domésticas, foi mostrado o efeito da solução de vitrificação suplementada com sacarose (0 ou 0,5 M) e da temperatura na exposição à solução (temperatura ambiente ou 4°C) na preservação e no funcionamento dos folículos pré-antrais em tecido ovariano vitrificado, após cultivo *in vitro* por 7 dias, e foi observado que a manutenção do funcionamento do tecido ovariano depende mais da temperatura de exposição, com 4°C, apresentando melhores resultados, do que da presença da sacarose. (Mouttham & Comizzoli, 2016)

Contudo, distinta da sacarose, a trealose é um dissacarídeo de glicose ($C_{12}H_{22}O_{11}.2H_2O$), que quando dihidratada apresenta um peso molecular de 378.33 g/mol. Além de suas capacidades básicas já citadas acima, a trealose estabelece uma variedade de funções, como fonte de carbono e energia (Jain and Roy, 2009), Osmorregulação (Kempf and Bremer, 1998), proteção à dessecação (Leslie et al., 1995). Além disso, existem hipóteses de que a trealose é mais efetiva em estabilização de biomoléculas e suas funções, e algumas delas enquadram-se por apresentar uma elevada temperatura de transição vítrea e pela teoria da exclusão preferencial de moléculas de açúcar em superfícies proteicas, levando a uma preservação da primeira camada da superfície com baixo teor de água, e como a trealose apresenta um volume hidratado significativamente maior que outros dissacarídeos, suas ligações retardam a dinâmica das proteínas de forma mais eficiente (Sola-Penna and Meyer-Fernandes, 1998; Bolen and Baskakov, 2001). Estudos experimentais e computacionais confirmam que a trealose não apenas afeta a estrutura da água, mas também sua dinâmica, devido à sua camada de hidratação (Bordat et al., 2004; Magno and Gallo, 2011; Lupi et al., 2012). Contudo, Tian et al. (2015) mostraram que dos protocolos de vitrificação em três etapas (0; 0,1; 0,2 mol/l de sacarose ou trealose) utilizados, a trealose apresentou uma

tendência para uma maior taxa de preservação morfológica de folículos primordiais de tecido ovariano humano, mesmo não apresentando diferença significativa com a sacarose.

No tocante à rafinose, é um trissacarídeo de galactose, frutose e glicose ($C_{18}H_{32}O_{16}$), com peso molecular de 504.42 g/mol. Estudos propõem que açúcares de elevado pesos moleculares proporcionam uma melhor proteção às células durante a criopreservação (Nagase and Graham, 1964). Esse açúcar é componente da solução da universidade de Wisconsin, conhecida pelo seu uso em perfusão e preservação de alguns órgãos para transplantação (Muhlbacher et al., 1999; Zheng et al., 2008). Na criopreservação, estudos têm mostrado sucesso na utilização da rafinose, sendo usada como crioprotetor extracelular com a proposta de aumentar a retirada de água das células e com isso diminuir o tempo de exposição (Courbière et al., 2009). De la Peña et al. (2002) vitrificaram folículos pré-antrais de camundongo com sucesso utilizando soluções de vitrificação com 6M etileno glycol e 0,3M rafinose. Em um estudo mais recente, a rafinose foi eficientemente utilizada na vitrificação de tecido ovariano humano, com protocolo de três etapas (0,37;0,75;1,5M propanodiol e etileno glycol), sendo a última composta adicionalmente por 0,5M rafinose (Sanfilippo et al., 2015).

3- Estresse osmótico, oxidativo e mecanismos homeostáticos

Apesar dos ACPs melhorarem a sobrevivência celular por evitar danos causados pela redução extrema da temperatura e desidratação e pela formação de cristais de gelo, eles também podem acarretar outras injúrias nas células, como danos a organelas celulares (Saragusty et al., 2009; Sprícigo et al., 2012) e o estresse osmótico, devido à alta concentração de soluto. Com isso, essa toxicidade do ACP depende do tipo, da concentração, e da temperatura de exposição (Comizzoli et al., 2004; Pedreira & Marques, 2008). Portanto, para evitar essa injúria, os ACPs permeável devem estar equilibrados alcançando uma desidratação e a penetração suficiente no material biológico, reduzindo danos citotóxicos (Amorim et al., 2006). Da mesma forma, o ACP não permeável em concentrações ideais de sobrevivência podem reduzir o choque osmótico e controlar a saída de água intracelular, limitando assim o risco de inchaço celular (Luvoni, 2006).

Para tanto, o período de equilíbrio, que é o tempo de exposição do tecido ovariano ao agente crioprotetor, é crucial, pois permiti a saída de água e a penetração do ACP de forma adequada na crioconservação (Candy et al., 1997). Entretanto, nesse

período há um desbalanço osmótico através da membrana celular que conduz à migração da água para fora da célula. Porém, se muita água permanece dentro da célula ainda, danos devido à formação de cristais de gelo e/ou recristalização podem ocorrer (Farrant, 1980). Essa desidratação e re-hidratação com crioprotetores ocorre através de proteínas de canais de água conhecidos como aquaporinas, que podem aumentar a permeabilidade celular para os mesmos (Camargo et al., 2011). Por exemplo, as aquaporinas 3 (AQP3) e 9 (AQP9), que permitem a entrada de crioprotetores, são moduladas de acordo com a composição da solução de vitrificação como uma resposta ao estresse osmótico (Sales et al., 2016).

A regulação osmótica é importante para a função ótima de macromoléculas intracelulares (Yancey et al., 1982; Chamberlin and Strange, 1989; Parker, 1993; Haussinger, 1996). E essa regulação normalmente ocorre naturalmente através de vários tipos transporte de íons mono- ou divalente (Haussinger, 1996). Alguns solutos orgânicos de baixo peso molecular também possuem essa atividade. Contudo, a maioria dos organismos vivos responde ao estresse osmótico produzindo osmoprotetores ou solutos compatíveis que são projetados para ajudar o citoplasma celular a manter uma pressão osmótica equivalente com o ambiente externo sem acumular alta concentração de sal intracelular (Csonka & Epstein, 1996). O estresse osmótico atribui diferentes mudanças fisiológicas. As células primeiro são habilitadas a aumentar a síntese de proteínas ABC relacionadas a transporte (Prasad et al. 2003), o que permite a internalização dos solutos compatíveis (Obis et al., 1999). Embora uma variedade de solutos compatíveis estejam disponíveis (Kempf & Bremer, 1998), a betaína é um dos mais importantes, em termos de nível de osmoproteção em ambos sistemas procariotas e eucariotas (Bagnasco et al., 1986; Bellinger & Larher, 1988; Beumer et al., 1994).

CONCLUSÃO

O futuro de felinos silvestres depende a primeira instância da restauração *in situ* de suas populações. Entretanto, o desenvolvimento de medidas *ex situ* da preservação de recursos genéticos, através de biotécnicas da reprodução, é também de fundamental importância como ferramenta para apoiar a reprodução de felinos em cativeiro e os que se encontram em algum grau preocupante na escala de animais ameaçados de extinção. Uma dessas biotécnicas é a vitrificação de tecido ovariano, que é uma forma prática de criopreservar uma fonte valiosa de oócitos, inclusos em folículos ovarianos, que podem ser utilizados para fins de fertilidade. Com base nisso, a manutenção da preservação do

tecido ovariano de gata é necessário, e estudos com progressos significativos já estão sendo realizados. Além do mais, o sucesso da técnica pode dar embasamento para novas pesquisas em prol de fornecer maiores taxas de sobrevivência de folículos pré-antrais em tecido ovariano vitrificado, implicando mostrar a resposta do tecido ovariano de gata a diferentes crioprotetores e técnicas de vitrificação, contribuindo para melhorar a eficiência de protocolos. Outra área que merece atenção é o mecanismo de desenvolvimento folicular em gatas após vitrificação, que é um foco interessante para trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A.; Saleh, R. & Bedaiwy, M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility And Sterility*, Birmingham. 79: 829-843.
- Albertini, R. & Abuja, P.M. 1999. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*. 30(3): 181-188.
- Alirezaei, M.; Jelodar, G.; Niknam, P.; Ghayemi, Z. & Nazifi, S. 2011. Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum. *J Physiol Biochem* 67(4):605–612.
- Alves, A.E.; Kozel, A.C. & Luvoni, G.C. 2012. Vitrification with DAP 213 and Cryotop of Ex Situ and In Situ Feline Cumulus–Oocyte Complexes. *Reprod Dom Anim* 47, 1003–1008.
- Alves, E.A.; Padilha, L.; Savi, P.A.; Apparicio, M.F.; Mostachio, G.Q.; Motheo, T.F.; Pires-Buttler, E.A.; Vicente, W.R. & Luvoni, G.C. 2012. In vitro Survival of Follicles Collected from Domestic Cats' Ovaries at Different Stages of Oestrous Cycle and Cultured with IGF-1. *Reprod Dom Anim*. 47 (6): 109–112.
- Amorim, C.A.; Rondina, D.; Lucci, C.M.; Gonçalves, P.B.; Figueiredo, J.R. & Giorgetti, A. 2006. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. *Fertil. Steril*. 85, 1077–1081.
- Andersen, C.Y.; Rosendahl, M.; Byskov, A.G.; Loft, A.; Ottosen, C.; Dueholm, M.; Schmidt, K.L.; Andersen, A.N. & Ernst, E. 2008. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*. 23(10): 2266–2272.

- Arat, S.; Caputcu, A.T.; Akkoc, T.; Pabuccuoglu, S.; Sagirkaya, H.; Cirit, U.; Nak, Y.; Koban, E.; Bagis, H.; Demir, K.; Nak, D.; Senunver, A.; Kilicaslan, R.; Tuna, B.; Cetinkaya, G.; Denizci, M. & Aslan, O. 2011. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(8): 1012-1023.
- Araújo, G.T.; Domenici, F.; Elias, J. Jr. & Vannucchi, H. 2014. Betaine: a potential agent for the treatment of hepatopathy associated with short bowel syndrome. *Nutr Hosp*. 1;29(6):1366-71.
- Arav, A.; Yavin, S.; Zeron, Y.; Natan, D.; Dekel, I. & Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187.
- Asselin, E.; Xiao, C.W.; Wang, Y.F. & Tsang, B.K. 2000. Mammalian Follicular Development and Atresia: Role of Apoptosis. *Biological Signals and Receptors*. 9: 87–95.
- Aubard, Y.; Piver, P.; Cogni, Y.; Fermeaux, V.; Poulin, N. & Driancourt, M.A. 1999. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen–thawed ovarian cortex in sheep. *Human Reproduction*. 14: 2149–2154.
- Axnér, E. 2008. Updates on Reproductive Physiology, Genital Diseases and Artificial Insemination in the Domestic Cat. *Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 2), 144–149;
- Axnér, E. & Ström Holst, S. 2015. Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. *Theriogenology*. 83(5):817-21.
- Badinga, L.; Driancourt, M.A.; Savio, J.D.; Wolfenson, D.; Drost, M.; De La Sota, R.L. & Thatcher, W.W. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 47: 871–83.
- Bagnasco, S.; Balaban, R.; Fales, H.M.; Yang, Y.M. & Burg, M. 1986. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J. Biol. Chem*. 261, 5872^5877.
- Baker, S.J. & Spears, N. 1999. The role intra-ovarian interactions in the regulation of follicles dominance. *Human Reprod Update*. 5 (2): 153-165.
- Bandeira, F.; Carvalho, A.A.; Castro, S.V.; Lima, L.F.; Viana, D.A.; Evangelista, J.S.; Pereira, M.J.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R. & Rodrigues AP.2014. Two Methods of Vitrification Followed by In Vitro Culture of the Ovine Ovary: Evaluation of the Follicular Development and Ovarian Extracellular Matrix. *Reprod Domest Anim*, 26.

- Bao, R.-M.; Yamasaka, E.; Moniruzzaman, M.; Hamawaki, A.; Yoshikawa, M. & Miyano, T. 2010. Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenografts, *Theriogenology*. 74. 817–827.
- Barber, M.R.; Lee, S.M.; Steffens, W.L.; Ard, M. & Fayrer-Hosken, R.A. 2001. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*, 55:1705–1717.
- Barclay, L.R.C.; Artz, J.D. & Mowat, J.J. 1995. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1237: 77-85.
- Beaumont, H.M. & Mandl, A.M. 1961. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the fetal and neonatal rat. *Proc R Soc London*. 155: 557-579.
- Bellinger, Y. & Larher, F. 1988. A ¹³C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeasts *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media. *Can. J. Microbiol.* 35, 605^612.
- Beumer, R.R.; Te Gijel, M.C.; Cox, L.J.; Rombouts, F.M. & Abee, T. 1994. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1359-1363
- Bhowmick, P.; Eroglu, A.; Wright, D.L.; Toner, M. & Toth, T.L 2002. Osmometric Behavior of Mouse Oocytes in the Presence of Different Intracellular Sugars. *Cryobiology*, 45:183–187.
- Biron-Shental, T.; Fisch, B.; Van Den Hurk, R.; Felz, C.; Feldberg, D. & Abir, R. 2004. Survival of frozen–thawed human ovarian fetal follicles in long-term organ culture. *Fertil Steril*. 81:716–9.
- Bolen, D.W. & Baskakov, I.V. 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol.* 310(5):955-63.
- Bordat, P.; Affouard, F.; Descamps, M. & Ngai, K.L. 2004. Does the interaction potential determine both the fragility of a liquid and the vibrational properties of its glassy state? *Phys Rev Lett*. 93(10):105502.
- Bordes, A.; Lornage, J.; Demirci, B.; Franck, M.; Courbiere, B.; Guerin, J.F. & Salle, B. 2005. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum. Reprod.* 20, 2745–2748.
- Bosch, P.; Hernandez-Fonseca, H.J.; Miller, D.M.; Winger, J.D.; Massey, J.B.; Lamb, S.V. & Brackett, B.G. 2004. Development of antral follicles in cryopreserved cat

ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*. 61(2–3): 581–594.

Brasileiro Filho, G. 1993. *Bogliolo patologia geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 220 p.

Bristol-Gould, S. & Woodruff, T.K. 2006. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*. 66: 5–13.

Brito, D.C. 2016. *Vitrificação de Tecido Ovariano de Gata Doméstica (Felis catus): Perspectivas de Preservação da Fertilidade em Felinos Silvestres*. 2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém – Pará. Brasil.

Brito, D.C.; Brito, A.B.; Scalercio, S.R.; Percário, S.; Miranda, M.S.; Rocha, R.M.; Diniz, J.A.; Oskam, I.C.; Van den Hurk, R.; Paris, M.C.; Domingues, S.F. & Santos, R.R. 2014. Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Res*. 355(2): 471-80.

Brito, D.C.; Brito, A.B.; Scalercio, S.R.; Percário, S.; Miranda, M.S.; Rocha, R.M.; Diniz, J.A.; Oskam, I.C.; Van den Hurk, R.; Paris, M.C.; Domingues, S.F. & Santos, R.R. 2014. Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchinmonkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Res*. 355(2):471-80.

Bukovsky, A.; Caudle, M.R.; Svetlikova, M. & Upadhyaya, N.B. 2004. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:20.

Buratini, J. Jr.; Pinto, M.G.; Castilho, A.C.; Amorim, R.L.; Giometti, I.C.; Portela, V.M.; Nicola, E.S. & Price, C.A. 2007. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol Reprod*. 77(4): 743-50.

Byskov, A.G. & Lintern-Moore, S. 1973. Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. *J Anat*. 116: 207–17.

Byskov, A.G. 1975. The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J Reprod Fertil*. 45: 201–9.

Callejo, J.; Salvador, C.; Miralles, A.; Vilaseca, S.; Lailla, J.M. & Balasch, J. 2001. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarin tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Baltimore, Md., US, v. 86, p. 4489-94.

- Camargo, L.S.A.; Boite, M.C.; Wohlfres-Viana, S.; Mota, G.B.; Serapiao, R.V.; Sa, W.F.; Viana, J.H. & Nogueira, L.A. 2001. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology*. 63: 256–262.
- Campbell, B. K.; Telfer, E.E.; Webb, R. & Baird, D.T. 2000. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163:137–139.
- Candy, C.J.; Wood, M.J. & Whittingham, D.G. 1997. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*. 110: 11-19.
- Candy, C.J.; Wood, M.J. & Whittingham, D.G. 1995. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reproduction*. 9: 2334–2338.
- Carrijo Jr, O.A.; Marinho, A.P.; Campos, A.A.; Amorim, C.A.; Bão, S.N. & Lucci, C.M. 2010. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*. 191: 152-160.
- Carvalho, A.A.; Faustino, L.R.; Silva, C.M.; Castro, S.V.; Lobo, C.H.; Santos, F.W.; Santos, R.R.; Campello, C.C.; Bordignon, V.; Figueiredo, J.R. & Rodrigues, A.P. 2014. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. *Res Vet Sci*. 97(1):140-7.
- Carvalho, A.A.; Faustino, L.R.; Silva, C.M.; Castro, S.V.; Lopes, C.A.; Santos, R.R.; Bão, S.N.; Figueiredo, J.R. & Rodrigues, A.P. 2013. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science*. 138: 220227.
- Ceballos, G.; Chávez, C.; Rivera, A. & Manterola, C. (2002) Tamano poblacional y conservaci3n del jaguar (*Panthera onca*) en la Reserva de la Biosfera Calakmul, Campeche, México. Medellin RA, Chetkiewicz C, Rabinowitz A, Redford KH, Robinson JG, E. Sanderson yA Taber (eds) en: *Jaguars en el nuevo milenio: Una evaluaci3n de su estado, detecc3n de prioridades y recomendaciones para la conservaci3n de los jaguares en América*. Universidad Nacional Aut3noma de México/Wildlife Conservation Society, México, pp 403–481.
- Cecconi, S.; Capacchietti, G.; Russo, V.; Berardinelli, P.; Mattioli, M. & Barboni, B. 2004. In Vitro Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian Tissue. *Biology of Reproduction*. 70: 12–17.

- Celestino, J.J.; Santos, R.R.; Melo, M.A.; Rodrigues, A.P. & Figueiredo, J.R.. 2010. Vitrification of bovine ovarian tissue by solid-surface vitrification method. *Biopreserv Biobank*. 8:219–221.
- Celestino, J.J.H.; Santos, R.R.; Lopes, C.A.; Martins, F.S.; Matos, M.H.; Melo, M.A.; Bão, S.N.; Rodrigues, A.P.; Silva, J.R.. & Figueiredo JR.. 2007. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*. 108: 309–318.
- Chamberlin, M.E. & Strange, K. 1989. Anisotonic cell volume regulation: a comparative view. *Am. J. Physiol*. 257, C159C173.
- Chetty, S.; Pagliuca, F.W.; Honore, C.; Kweudjeu, A.; Rezanian, A. & Melton, D.A. 2013. A Simple Tool to Improve Pluripotent Stem Cell Differentiation. *Nat Methods*. 10:553–556.
- Chi, H.J.; Kim, J.H.; Ryu, C.S.; Lee, J.Y.; Park, J.S.; Chung, D.Y.; Choi, S.Y.; Kim, M.H.; Chun, E.K. & Roh, S.I. 2008. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 23:1023–1028.
- Choi, J.; Lee, J.Y.; Lee, E.; Yoon, B.K.; Bae, D. & Choi D. 2007. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology*. 54:55-62.
- Cleland, D.; Krader, P.; McCree, C.; Tang, J. & Emerson, D. 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiol Methods*. Jul;58(1):31-8.
- Comizzoli, P. & Wildt, D.E. 2012. On the horizon for fertility preservation in domestic and wild carnivores. *Reprod Domest Anim*. 47(Suppl 6):261–5.
- Comizzoli, P., Songsasen, N. & Wildt, D.E. 2010. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Cancer Treat Res*; 156:87–100.
- Comizzoli, P.; Pukazhenthii, B.S. & Wildt, D.E. 2011. The competence of germinal vesicle oocytes is unrelated to nuclear chromatin configuration and strictly depends on cytoplasmic quantity and quality in the cat model. *Hum Reprod*; 26:2165–2177.
- Comizzoli, P.; Wildt, D.E. & Pukazhenthii, B.S. 2004. Effect of 1,2-Propanediol Versus 1,2-Ethandiol on Subsequent Oocyte Maturation, Spindle Integrity, Fertilization, and Embryo Development In Vitro in the Domestic Cat. *Biology of Reproduction*. 71: 598–604.
- Concannon, P.; Hodgson, B. & Lein, D. 1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biol Reprod*. 23: 111–7.

- Cort, W.M.; Scott, J.W.; Araujo, M.; Mergens, W.J.; Cannalunga, M.A.; Osadca, M.; Harley, H.; Parrish, D.R. & Pool, W.R. 1975. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 52(6): 174-178.
- Cortvrindt, R.; Smits, J. & Van Steirteghem, A.C. 1996. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod*. 11(12):2656-66.
- Courbiere, B.; Caquant, L.; Mazoyer, C.; Franck, M.; Lornage, J. & Salle, B. 2009. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril*. 91(6):2697-706.
- Crestana, F. M.; Jacomini, J.O.; Beletti, M.E.; Silva, J.M.; Lima, C.A.P. & Silva, S.V.S. 2006. Autotransplantação de Ovário no Subcutâneo e Consumo Folicular em Gatas Domésticas (*Felis catus*). *Veterinary Notice*, v.12, p.131-140.
- Crowe, D.M.; Hurley, J.V.; Mitchell, G.M.; Niazi, Z. & Morrison, W.A. 1998. Long-term studies of cold-stored rabbit femoral artery and vein autografts. *Br J Plast Surg*. 51(4):291-9.
- Crowe, L.M.; Reid, D.S. & Crowe, J.H. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials?. *Biophys J*. 71(4):2087-93.
- Csonka, L. N. & Epstein, W. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Osmoregulation, p. 1210-1223. In F. C. Neidhardt (ed.) ASM Press, Washington, D.C.
- Dalimata, A.M. & Graham, J.K. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*. 48: 831-841.
- Danforth, D. R.; Arbogast, L.K.; Ghosh, S.; Dickerman, A.; Rofagha, R. & Friedman, C.I. 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol. Reprod*. 68: 1736–1741.
- Davis, J.M.; Rowley, S.D.; Braine, H.G.; Piantadosi, S. & Santos, G.W. 1990. Clinical Toxicity of Cryopreserved Bone Marrow Graft Infusion. *Blood*. 75:781–786.
- Dawson, K.M. & Baltz, J.M. 1997. Organic osmolytes and embryos: substrates of the Glyandbeta transport systems protect mouse zygote against the effects of raised osmolarity. *Biol. Reprod*. 56, 15501558.

- De La Pena, E.C.; Takahashi, Y.; Katagiri, S.; Atabay, E.C. & Nagano, M. 2002. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*. 123:593– 600.
- De Oliveira, A. G. & Andre Filho, N. 1999. Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de Fármacos. *Infarma*. 9, 18-19.
- Dekel, N.; Hillensjo, T. & Kraicer, P.F. 1979. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biol Reprod*. 20: 191-197.
- Demeestere, I.; Simon, P.; Buxant, F.; Robin, V.; Fernandez, S.A.; Centner, J.; Delbaere, A. & Englert, Y. 2006. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: Case Report. *Human Reproduction*. 21(8): 2010–2014.
- Domingues, S.F.S. & Caldas-Bussiere, M.C. 2006. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 30:1/2, p. 57-71.
- Domingues, S.F.S.; Diniz, L.V.; Furtado, S.H.C.; Ohashi, O.M.; Rondina, D. & Silva, L.D.M. 2004. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amazonica*. 34 (3): 495 – 501.
- Donnelly, E.T.; McClure, N. & Lewis, S.E. 1999. The effect of ascorbate and alphatocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*. 14: 505–512.
- Donnez, J. & Dolmans, M. 2014. Transplantation of ovarian tissue. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 28: 1188-1197.
- Donnez, J.; Dolmans, M.M.; Demylle, D.; Jadoul, P.; Pirard, C.; Squifflet, J.; Martinez-Madrid, B. & van Langendonck, A. 2004. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 364: 1405-1410.
- Driancourt, M.A.; Reynaud, K.; Cortvrindt, R. & Smits, J. Role of KIT and KIT ligand in ovary function. *Ver Reprov*. 5: 143-52, 2000.
- Dunn, R. L. 1991. Polymeric Matrices. In Dunn, R, L.; Ottembrite, R.M.; *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, Washington, DC, Amer Chem. Soc. 10-23.
- Edson, M. A.; Nagaraja, A.K. & Matuzk, M. M. 2009. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews*, v.30, p. 624–712.
- Edyta, A. & Ali, E. 2011. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One*. 6: e27604.

- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35(4): 495–516.
- Eppig, J.J. & O'Brien, M. 1996. Development In Vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, v.54, p.197-207.
- Eppig, J.J. 1994. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes in vitro. *Hum Reprod*, 9:969-976.
- Eppig, J.J. & Schroeder, A.C. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 41(2):268-76.
- Eppig, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122(6):829-38.
- Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal Animal Science*. 25: 800-805.
- Erman, F.; Balkan, J.; Cevikbaş, U.; Koçak-Toker, N. & Uysal, M. 2004. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication. *Amino Acids*. 27(2):199-205.
- Eroglu, A.; Elliott, G.; Wright, D.L; Toner, M. & Toth, T.L. 2005. Progressive Elimination of Microinjected Trehalose During Mouse Embryonic Development. *Reprod BioMed Online*. 10:503–510.
- Eroglu, A.; Lawitts, J.A.; Toner, M. & Toth, T.L. 2003. Quantitative Microinjection of Trehalose into Mouse Oocytes and Zygotes, and Its Effect on Development. *Cryobiology*. 46:121–134.
- Eroglu, A.; Russo, M.J.; Bieganski, R.; Fowler, A.; Cheley, S.; Bayley, H. & Toner, M. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 18:163–7.
- Eroglu, A.; Toner, M. & Toth, T.L. 2002. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility*. 77(1).
- EWGENOW, K. & STOLTE, M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. *Reproduction Domestic Animals*, v. 44, p. 183-193.
- Fabbri, R.; Pasquinelli, G.; Parazza, I.; Macciocca, M.; Magnani, V.; Battaglia, C.; Paradisi, R. & Venturoli, S. 2012. Effects of Cyclic Increase in Gonadotropins on the In Vitro Development of Primordial Follicles to Antral Stage. *Ultrastructural Pathology*. 36(5); 356–361.

- Fabbri, R.; Vicenti, R.; Macciocca, M.; Vicenti, R.; Macciocca, M.; Pasquinelli, G.; Paradisi, R.; Battaglia, C.; Martino, N.A. & Venturoli, S. 2014. Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification. *Biomed Res Int* 2014. 673537.
- Faheem, M.S.; Carvalhais, I.; Baron, E. & Silva, F.M. 2013. Effect of bovine ovarian tissue vitrification on the structural preservation of antral follicles. *Reprod Dom Anim* 48:774–780.
- Fahy, G.M. 1980. Analysis of “solution effects” injury: rabbit renal cortex frozen in the presence of dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 17(4): 371–388.
- Fahy, G.M. 2010. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. 60: 45-53.
- Frankham, R. 2003 Genetics and conservation biology. *CR Biol* 326:S22–S29.
- Frankham, R. 2005 Genetics and extinction. *Conserv Biol* 126:131–140.
- Farrant, J. 1980. General observations on cell preservation. In: M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical Limited, Kent, England, p. 1-18.
- Fassbender, M.; Hildebrandt, T.B.; Paris, M.C.; Colenbrander, B. & Jewgenow, K. 2007. High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. *J Reprod Dev*. 53:1023-1034.
- Faustino, L.R. et al. 2010. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Animal Reproduction Science*. 122: 90–97.
- Feldman, E.C. & Nelson, K.W. 1996. *Canine and feline endocrinology and reproduction* Philadelphia, PA: WB Saunders Co. p. 741– 68.
- Ferreira, E.M.; Vireque, A.A; Adona, P.R.; Meirelles, F.V.; Ferriani, R.A. & Navarro, P.A.A.S. 2008. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. 32 (3); 172-181.
- Ferreira, H. S. & Rangel, M. C. 2009. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Quim. Nova*, v. 32, n. 7, p. 1860-70.
- Ferreira, R.M. 2008. Efeito da adição de antioxidante (trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos in vivo e ao meio de transporte de oócitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Figueiredo Jr. 1995. Isolement, caractérisation et culture de follicules préantaux chez les bovins. 113f. Thesis (Doctorat) - Université de Liège, Liège, Belgique.

- Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50:225–32.
- Fuchinoue, K.; Fukunaga, N.; Chiba, S.; Nakajo, Y.; Yagi, A. & Kyono, K. 2004. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with taxol in the vitrification solution. *J. Assist. Reprod. Genet.* 21: 307–309.
- Fujihara, M.; Comizzoli, P.; Wildt, D.E. & Songsasen, N. 2012. Cat and dog primordial follicles enclosed in ovarian cortex sustain viability after in vitro culture on agarose gel in a protein-free medium. *Reprod Domest Anim.* 47 Suppl 6:102-8.
- Fujihara, M.; Comizzoli, P.; Keefer, C.L.; Wildt, D.E. & Songsasen, N. 2014. Epidermal growth factor (EGF) sustains in vitro primordial follicle viability by enhancing stromal cell proliferation via MAPK and PI3K pathways in the prepubertal, but not adult, cat ovary. *Biol Reprod.* 25;90(4):86.
- Fuku, E. et al. 1992. In vitro fertilization and development of frozen thawed bovine oocytes. *Cryobiology.* 29: 485-92.
- Galiguis, J.; Gómez, M.C.; Leibo, S.P. & Pope, C.E. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. *Cryobiology.* 2014 Jun;68(3):459-66. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.012. Epub 2014 Mar 11.
- Galinski, E.A. & Truper, H.G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15: 95-108. *FEMS microbiology reviews* 15(s 2–3):95–108 • September.
- Garay, I.; Pocheville, A. & Madariaga, L. 2010. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. *Powder Technology* v.197, p. 211-217.
- Glover, T.E.; Watson, P.F. & Bonney, R.C. 1985. Observations on variability in LH release and fertility during oestrus in the domestic cat (*Felis catus*). *J Reprod Fertil.*
- Goritz, F.; Jewgenow, K. & Meyer, H.H. 1996. Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*). *J Reprod Fertil.* 106:117–24.
- Gosden, R.G. 2000. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular Cell Endocrinology.* 63: 125–129.
- Gougeon, A. & Lefevre, B. 1983. Evolution of the diameters of the largest health and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil.* 69: 497-502.
- Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17: 121–155.

- Grout, B.W.W. & Morris, G. J. 2009. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology*. 71: 1079-1082.
- Gudermuth, D.F.; Newton, L.; Daels, P. & Concannon, P. 1997. Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *J Reprod Fertil Suppl*. 51:177–84.
- Guerin, P. F.; Mouatassim, S. & Menezo, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*. 7(2):175-189.
- Gunasena, K.T.; Lakey, J.R.; Villines, P.M.; Bush, M.; Raath, C.; Critser, E.S; McGann L.E. & Critser, J.K. 1998. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant *Loxodonta africana* ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*. 53: 265–275.
- Gwinn, M. R. & Vallyathan, V. 2006. Nanoparticles: health effects-pros and Cons. *Environ. Health Perspect*. v. 114, n. 12, p. 1818-25.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. & Cross, C.E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med*. 119: 598-620.
- Harisa, G.I. 2013. Oxidative Stress and Paraoxonase Activity in Experimental Selenosis: Effects of Betaine Administration. *Biol Trace Elem Res*. 152:258–266.
- Haussinger, D. 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J*. 313, 697710.
- Herraiz, S.; Novella-Maestre, E.; Rodríguez, B.; Díaz, C.; Sánchez-Serrano, M.; Mirabet, V. & Pellicer, A. 2014. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*. 101(3):775-84.
- Hirshfield, A.N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 124:43–101.
- Ho, Y.S.; Gargano, M.; Cao, J.; Bronson, R.T.; Heimler, I. & Hutz, R.J. 1998. Reduced fertility in female mice lacking copper–zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 273:7765–9.
- Holt, W.V.; Bennett, P.M.; Volobouev, V. & Watwon, P.F. 1996. Genetic resource banks in wildlife conservation. *J Zool*, 238:531– 544.

- Hovatta, O. 2005. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *RBM Online*. 10: 729-734.
- Hovatta, O. Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles. 2000. *Mol Cell Endocrinol*. 27;169(1-2):95-7.
- Hredzak, R.; Ostró, A.; Maraňek, I.; Kaámárik, J.; Ídilová, V. & Veselá, J. 2005. Influence of Slow-rate Freezing and Vitrification on Mouse Embryos. *Acta Veterinária Brno*. 74: 23–27.
- Ireland, J.J. 1987. Controlo f follicular growth and development. *J Reprod Fertil*. 34: 3954.
- Isachenko, V.; Soler, C.; Isachenko, E.; Perez- Sanchez, F. & Grishchenko, V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36, 250–253.
- IUCN, International Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/amazing-species>>. Acesso em: Dez. 2016.
- Jain, N.K. & Roy, I. 2009. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci*. 18(1):24-36.
- Jemmett, J. E. & Evans, J.M. 1977. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *Journal of Small Animal Practice*. 18(1), 31–37.
- Jewgenow Inoue, N.; Matsuda, F.; Goto, Y. & Manabe N. 2011. Role of cell-death ligand–receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *J Reprod Dev*. 57:169–75.
- Jewgenow, K. & Paris, M. 2006. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*. 66: 93-100.
- Jewgenow, K. & Rudolph, M. 2001. Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats – an ultrastructural immunohistological investigation. *J. Reprod. & Fert.*, 57 (Suppl):23-9.
- Jewgenow, K.; Blottner, S.; Lengwinat, T. & Meyer, H.H. 1997. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 51: 33–39.
- Jewgenow, K.; Wood, T.C. & Wildt, D.E. 1997. DNA degradation in mural granulosa cells of non- and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev*. 48:350–5.

- Jin, S.; Lei, L.; Shea, L.D.; Zelinski, M.B.; Stouffer, R.L. & Woodruff, T.K. 2010. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. *Fertility and Sterility*. p. 1-6.
- Johnson, J.; Canning, J.; Kaneko, T.; Pru. J.K. & Tilly, J.L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428:145–50.
- Johnson, L.M. & Gay, V.L. 1981. Luteinizing hormone in the cat. I. Tonic secretion. *Endocrinology*. 109: 240-252.
- Johnston, L.A.; O'Brien, S.J. & Wildt, D.E. 1989. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Research*. 24: 343–356.
- Johnston, S.D.; Kustritz, M.V.R. & Olson, P.N.S. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B.Saunders. 592p.
- Juengel, J.L.; Sawyer, H.R.; Smith, P.R.; Quirke, L.D.; Heath, D.A.; Lun, S.; Wakefield, S.J. & McNatty, K.P. 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*. 191:1–10.
- Kempf, B. & Bremer, E. 1998. Uptake and synthesis of compatible. FEMSRE 731 1-5-02 Cyaan Magenta Geel Zwart.
- Kerr, J.F.; Wyllie, A.H. & Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239–57.
- Kharbanda, K.K. 2013. Methionine metabolic pathway in alcoholic liver injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16:89–95.
- Kim, M. & Tilly, J.L. 2004. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1644: p. 205– 210.
- Kingsbury, B.F. 1913. The morphogenesis of the mammalian ovary: *Felis domestica*. *Am J Anat*. 15:345–87.
- Kissel, T.; Maretschek, S.; Packhauser, C.; Schnieders, J. & Seidel, N. 2006. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. (ed.). *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. Boca Raton: Taylor & Francis Group v. 158, p. 99-122.
- König, H.E. & Liebich, H. 2011. *Anatomia dos animais domésticos: Texto e Atlas colorido*. Artemed. 4ª Edição.
- Kreeger, P.K.; Fernandes, N.N.; Woodruff, T.K. & Shea, L.D. 2005. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod*. 73(5):942-50.

- Krysko, D.V.; Diez-Fraile, A.; Criel, G.; Svistunov, A.A.; Vandenabeele, P. & D'Herde, K. 2008. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*. 13: 1065–108.
- Kuwayama, M. 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 67: 73-80.
- Kuwayama, M.; Vajta, G.; Kato, O. & Leibo, S.P. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*. 11: 300–308.
- La Marca, A.; Argento, C.; Sighinolfi, G.; Grisendi, V.; Carbone, M.; D'Ippolito, G.; Arsenio, A.C.; Stabile, G. & Volpe, A. 2012. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13: 398-408.
- Lagos Ind. Química LTDA. 2013. Boletim Técnico do Nano-aditivo 602. São Paulo (SP).
- Lamark, T., Styrvold, O.B. & Ström, A.R. 1992. Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 96, 149^154.
- Lamark, T.; Kassen, I.; Eshoo, M.W.; Falkenberg, P.; McDougall, J. & Ström, A.R. 1991. DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline^glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 1049^1064.
- Landfald, B. & Ström, A.R. 1986. Choline^glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165, 849^855.
- Leibo, S.P. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozenthawed bovine embryos. *Theriogenology* 21:767–790.
- Leonel, E.C.R. 2013. Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas. 2013. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. Brasil.
- Leon-Quinto, T.; Simon, M.A.; Cadena, R.; Jones, J.; Martinez- Hernandez, F.J.; Moreno, J.M.; Vargas, A.; Martinez, F. & Soria, B. 2009. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation. The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Anim Reprod Sci.* 112:347–61.
- Leslie, S.B.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J.H. & Crowe, L.M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol.* 61(10):3592-7.

- Li, L. & Clevers, H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 327: 542–545.
- Lima, A.K.F. 2006. Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. 2006. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará. Brasil.
- Lima, A.K.F.; Silva, A.R.; Santos, R.R.; Sales, D.M.; Evangelista, A.F.; Figueiredo, J.R. & Silva, L.D. 2006. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*. 66: 1664–1666.
- Lima, J.S.; Leão, D.L.; Sampaio, R.V.; Brito, A.B.; Santos, R.R.; Miranda, M.S.; Ohashi, O.M. & Domingues, S.F. 2012. Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. *Zygote*, p. 1-5.
- Lima-Verde, I.B.; Bruno, J.B.; Matos, M.H.T.; Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R.; Oliveira, M.A.L. & Lima, P.F. 2007. Implicações do estresse oxidativo no ovário e ao embrião mamífero. *Medicine Veterinaria Recife*. 1(1): 81-88.
- Lin, T.C.; Yen, J.M.; Kuo, T.C.; Gong, K.B.; Hsu, K.H. & Hsu, T.T. 2008. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnol*. 8: 38.
- Lintern-Moore, S.; Peters, H.; Moore, G.P.M. & Faber, M. 1974. Follicular development in the infant human ovary. *Journal Reproduction and Fertility*. 20: 773-778.
- Little, S. 2005. Feline Reproduction in Breeding Management. *Journal of American Board of Veterinary Practitioner*, p.1-5.
- Liu, J.; Van der Elst, J.; Van den Broecke, R. & Dhont, M. 2001. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*. 64:171-178.
- Lodde, V.; Modina, S.; Galbusera, C.; Franciosi, F. & Luciano, A.M. 2007. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol Reprod Dev*. 74:740–749.

- Lofstedt, R.M. 1982. The estrous cycle of the domestic cat. *Comp Cont Educ Pract Vet.* 4:52–8.
- Lucci, C. M.; Amorim, C.A.; Bao, S.N.; Figueiredo, J.R.; Rodrigues, A.P.; Silva, J.R. & Gonçalves, P.B. 1999. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science.* 56 (1):39-49.
- Lupi, L.; Comez, L.; Paolantoni, M.; Fioretto, D. & Ladanyi, B.M. 2012. Dynamics of biological water: insights from molecular modeling of light scattering in aqueous trehalose solutions. *J Phys Chem B.* 28;116(25):7499-508.
- Luvoni, G.C. 2006. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology.* 66: 101–111.
- Luvoni, G.C.; Tessaro, I.; Aparıcio, M.; Ruggeri, E.; Luciano, A.M. & Modina, S.C. 2012. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reproduction in Domestic Animals.* 47: 385–391.
- Luvoni, G.C.; Pellizzari, P. & Battocchio, M. 1997. Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. *Jornal of Reproduction and Fertility supplement.* 51; 93-98.
- Luyet, B.J. 1937. The ultrarapid freezing of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica.* 1:1-14.
- Luz, H.K.M.; Santos, R.R.; Wanderley L.S.; Faustino L.R.; Silva C.M.G.; Carvalho A.A.; Campello, C.C.; Santos F.W.; Figueiredo, J.R. & Rodrigues, A.P.R. 2012. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediolfreezing medıum. *Biopreservation and biobanking.* 10(4): 338-342.
- Luzzi, L. & Palmiere, A. 1985. An Overview of pharmaceutical Applications. In: Lim, F. *Biomedical Applications of Microencapsulation.* Boca Raton, CRC, 2-14.
- Magill, M. 1990. Microencapsulation for the personal care industry. *Cosmetics & Toiletries.* 105. 59-62.
- Magno, A. & Gallo, P. 2011. Understanding the mechanisms of bioprotection: A comparative study of aqueous solutions of trehalose and maltose upon supercooling. *J. Phys. Chem. Lett.* 977–982.
- Mainardes, M. M. Desenvolvimento de nanoparticulas de PLA e PLAPEG para administraao intranasal de zidovudina. 133 p. Doutorado em Ciências Farmaceuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

- Malandain, E.; Rault, D.; Froment, E.; Baudon, S.; Desquilbet, L.; Begon, D. & Chastant-Maillard, S. 2011. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. *Theriogenology*. 76(7):1337-46.
- Mani, A.M.; Fenwick, M.A.; Cheng, Z.; Sharma, M.K.; Singh, D. & Wathes, D.C. 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*. 139; 139–151.
- Marsella, T.; Sena, P.; Xella, S.; La Marca, A.; Giulini, S.; De Pol, A.; Volpe, A. & Marzona, L. 2008. Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing. *Reprod Biomed Online*. 16(2):257-67.
- Martino, A.; Songsasen, N. & Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*. 54 1059–1069.
- Matos, M.H.; Bruno, J.B.; Rocha, R.M.; Lima-Verde, I.B.; Santos, K.D.; Saraiva, M.V.; Silva, J.R.; Martins, F.S.; Chaves, R.N.; Bão, S.N. & Figueiredo, J.R. 2011. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res Vet Sci*. 90: 404–411.
- Matsuda, F.; Inoue, N.; Manabe, N. & Ohkura, S. 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*. 58:44–50.
- Matzuk, M.M.; Dionne, L.; Guo, Q.; Kumar, R. & Lebovitz, R.M. 1998. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*. 139:4008–11.
- Mayerhofer, K.; Ott, J.; Nouri, K.; Stoegbauer, L.; Fischer, E.M.; Lipovac, M.; Promberger, R. & Huber, J.C. 2010. Laparoscopic ovarian tissue harvesting for cryopreservation: an effective and safe procedure for fertility preservation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 152:68–72.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*. 247: C125-142.
- McGee Jr, H.A. & Martin, W.J. 1962. Cryochemistry. *Cryogenics NASA Center*. 2: 1-11.
- McLaren, A. 2000. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.163, p. 3–9.
- McLaughlin, E.A. & McLver, S.C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*. 137; 1–11, 2009.

- McNatty, K.P.; Smith, P.; Hudson, N.L.; Heath, D.A.; Tisdall, D.J.; O, W.S. & Braw-Tal, R. 1995. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal Of Reproduction And Fertility Supplement*. 49:123–35.
- Meirow, D.; Levron, J.; Eldar-Geva, T.; Hardan, I.; Fridman, E.; Zalel, Y.; Schiff, E. & Dor, J. 2005. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*. 353:318– 321.
- Moeckel, G.W. & Lien, Y.H. 1997. Distribution of de novo synthesized betaine in rat kidney: role of renal synthesis of medullary betaine accumulation. *Am. J. Physiol*. 272, F94F99.
- Mohamed Hamouda, I. 2012. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J. Biomed. Res.* v. 26, n. 3, p. 143-51.
- Motta, P.M.; Makabe, S. & Nottola, S.A. 1997. The Ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*. 3(3): 281-295.
- Mouttham, L.; Fortune, J.E. & Comizzoli, P. 2015. Damage to fetal bovine ovarian tissue caused by cryoprotectant exposure and vitrification is mitigated during tissue culture. *J Assist Reprod Genet*. 32(8):1239-50.
- Muhlbacher, F.; Langer, F. & Mittermayer, C. 1999. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc* . 31(5): 2069–2070.
- Nagase, H. & Graham, E.F. 1964. Pelleted semen: comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa. In: *Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Trento 4*, pp. 387–389.
- Nakanishi, T.R.; Turner, J. & Burg, M.B. 1990. Osmoregulation of betaine transport in mammalian medullary cells. *Am. J. Physiol*. 258, F1061F1067.
- Nakao, H. & Nakatsuji, N. 1992. Effect of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. *J Reprod Dev*. 38:11–3.
- Nation, A. & Selwood, L. 2009. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction*. 138(2):247-55.
- Newton, H. 1998. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Hum Reprod Update*. 4: 237–247.

- Newton, H. et al. 1996. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 11: 1487-1491.
- O'Brien, M.J.; Pendola, J.K. & Eppig, J.J. 2003. A revised protocol for development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, v.68, p.1682-1686.
- Obis, D.; Guillot, A.; Gripon, J.C.; Renault, P.; Bolotin, A. & Mistou, M.Y. 1999. Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol* 181, 6238–6246.
- Ohinata, Y.; Ohta, H.; Shigeta, M.; Yamanaka, K.; Wakayama, T. & Saitou, M. 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*. 137:571–584.
- Oktay, K. & Karlikaya, G. 2000. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med*. 342, 1919.
- Oktay, K.; Economos, K.; Kan, M.; Rucinski, J.; Veeck, L. & Rosenwaks, Z. 2001. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA: The journal of the American Medical Association, United States*, v. 286, n. 12, p. 1490–3.
- Oktem, O. & Oktay, K. 2007. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res.* 67:10159–62.
- Ortega-Camarilo, C.; González-González, A.; Vergara-Onofre, M.; González-Padilla, E.; Avalos-Rodríguez, A.; Gutiérrez-Rodríguez, M.E.; Arriaga-Pizano, L.; Cruz, M.; Baiza-Gutman, L.A. & Díaz-Flores, M. 2009. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. *Reproduction*. 137: 979–986.
- Oskam, I.C.; Asadi, B.A. & Santos, R.R. 2010. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. *Fertil Steril*. 93:2764–6.
- Paape, S. R.; SHILLE, V.M.; SETO H. & STABENFELDT, G.U. 1975. Luteal activity in the pseudopregnant cat. *Biol. Reprod.* 13: 470-474.
- Painer, J.; Jewgenow, K.; Dehnhard, M.; Arnemo, J.M.; Linnell, J.D.C.; Odden, J.; Thomas, B.; Hildebrandt & Goeritz F. 2014. Physiologically persistent corpora lutea in

Eurasian lynx (*Lynx lynx*): longitudinal ultrasound and endocrine examinations intravivam. PLoS One.

Palomares, F.; Godoy, J.A.; López-Bao, J.V.; Rodríguez, A.; Roques, S.; Casas-Marce, M.; Revilla, E. & Delibes, M. (2012) Possible extinction vortex for a population of iberian lynx on the verge of extirpation. *Conserv Biol* 26:689–697.

Pamplona, R. & Costantini, D. 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301: R843–63.

Paris, M.C.J. et al. 2004. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? *Theriogenology*. 61: 277–291.

Parker, J.C. 1993. In defence of cell volume? *Am. J. Physiol*. 265, C1191C1200.

Parte, S.; Bhartiya, D.; Telang, J.; Daithankar, V.; Salvi, V.; Zaveri, K. & Hinduja, I. 2011. Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cells and Development*. 20(8): 1451–1464.

Parte, S.; Patel, H.; Sriraman, K. & Bhartiya, D. 2015. Isolation and characterization of stem cells in the adult mammalian ovary. *Methods Mol Biol*. 1235: 203-29.

Paynter, S.J. 2000. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Update*. 6: 449–456.

Pelican, K.M.; Brown, J.L.; Wildt, D.E. & Ottinger, M.A. 2005. Howard JG. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *Gen Comp Endocrinol*. 144:110–21.

Pepling, M.E. & Spradling, A.C. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol*. 234:339–51.

Pereda, J.; Zorn, T. & Soto-Suazo, M. 2006. Migration of Human and Mouse Primordial Germ Cells and Colonization of the Developing Ovary: An Ultrastructural and Cytochemical Study. *Microscopy Research and Technique*, v.69, p. 386–395.

Pereira, R.M. & Marques, C.C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*. 9: 267-277.

Pereira, R.M. & Marques, C.C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, 9:267-277.

- Peters, H. & McNatty, K.P. 1980. *The ovary* Berkeley and Los Angeles, CA: University of California Press.
- Picton, H.M.; Harris, S.E.; Muruvi, W. & Chambers, E.L. 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136; 703-715.
- Pinto, L.C.; Santos, R.R.; Faustino, L.R.; da Silva, C.M.; Luz, V.B.; Maia Jr, J.E.; Soares, A.A.; Celestino, J.J.; Mafezoli, J.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R. & Rodrigues, A.P. 2008. Quantification of Dimethyl Sulfoxide Perfusion in Sheep Ovarian Tissue: A Predictive Parameter for Follicular Survival to Cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*. 6:269–276.
- Pope, C.E.; Gómez, M.C.; Kagawa, N.; Kuwayama, M.; Leibo, S.P. & Dresser, B.L. 2012. In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Theriogenology* 77: 531–538.
- Prasad, J.; McJarrow, P. & Gopal, P. 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol* 69, 917–925.
- Prentice, J.R. & Anzar, M. 2011. "Cryopreservation of Mammalian oocyte for conservation of animal genetics.", *Veterinary Medicine International*, 2011(Article ID 146405).
- Qian, K.; Shi, T.; Tangt Zhanh, S.; Liu, X. & Cao, Y. 2011. Preparation and characterization of nano-sized calcium carbonate as controlled release pesticide carrier for validamycin against *Rhizoctonia solani*. *Microchimica Acta*. 173:51-57.
- Qiu, N.; Yin, H.; Ji, B.; Klauke, N.; Glidle, A.; Zhang, Y.; Song, H.; Cai, L.; Ma, L.; Wang, G.; Chen, L. & Wang, W. 2012. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin. *32*, 8(1), 2634-40.
- Quintana, R.; Kopcow, L.; Sueldo, C.; Marconi, G.; Rueda, N.G. & Barañao, R.I. 2004. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil.Steril*. 82; 1101–1105.
- Rahimi, G.; Isachenko, E.; Sauer, H.; Isachenko, V.; Wartenberg, M.; Hescheler, J.; Mallmann, P. & Nawroth, F. 2003. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reproduction, Fertility and Development*. 15; 343-349.

- Rall, W.; Reid, D. & Polge, C. 1984. Analyses of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology*. 21: 106-121.
- Rall, W.F. & Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. *Nature*. 313:573–5.
- Rao, W.; Huang, H.; Wang, H.; Shuting Zhao, S.; Dumbleton, J.; Zhao, G. & HE, X. 2015. Nanoparticle-Mediated Intracellular Delivery Enables Cryopreservation of Human Adipose-Derived Stem Cells Using Trehalose as the Sole Cryoprotectant. *ACS Appl Mater Interfaces*. 4; 7(8): 5017–5028.
- Rascado, T.S.; Rascado, T.S.; Martins, L. R.; Minto, B. W.; Lorena, S. E. R. S. & Landim-Alvarenga F.C. 2010. Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. *Theriogenology*. 74: 596– 601.
- Reynaud, K. & Driancourt, M.A. 2000. Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol*. 163:101–108.
- Rhodes, D. & Hanson, A.D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 44:357–384.
- Ringleb, J., Rohleder, M. & Jewgenow, K. 2004. Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on in vitro fertilization of cat oocytes. *Reproduction* 127 179–186.
- Robert, H.; Le Marrec, C.; Blanco, C. & Jebbar, M. 2000. Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 509-517.
- Roberts, A. E.; Arbogast, L.K.; Friedman, C.I.; Cohn, D.E.; Kaumaya, P.T. & Danforth, D.R. 2007. Neutralization of endogenous vascular endothelial growth factor depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol. Reprod*. 76; 218–223.
- Rodrigues, A.P.R.; Amorim, C.A.; Costa, S.H.; Matos, M.H.; Santos, R.R.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Ohashi, O.M. & Figueiredo, J.R. 2004. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*. 84:211–227.
- Rodrigues, P.; Rodrigues, A.P.R.; Costa, S.H.F.; Santos, R.R.; Amorim, C.A.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Nunes, J.F.; Rondina, D. & Figueiredo, J.R. 2006. In Vitro Culture of Cryopreserved Caprine Ovarian Tissue Pieces and Isolated Follicles. *Cell Preservation Technology*. 4(4).

- Rosu, R.; Iwasaki, Y.; Shimizu, N.; Doisaki, N. & Yamane, T. 1998. Intesification of Lipase Performance in a Transesterification Reaction by Immobilization on CaCO₃ Powder. *J. Biotechnol.* 66, 51–59.
- Root, M.V.; Johnston, S.D.; Olson, P.N. 1995. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *Journal of American Animal Hospital Association*, v.31, p. 429-433.
- Rüsse, I. 1983. Oogenesis in caule and sheep. *Bibliotheca Anatômica.* 24; 77-92.
- Ryter, S.W. & Choi, A.M.K. 2005. Heme Oxygenase-1: Redox Regulation of a Stress Protein in Lung and Cell Culture Models. *Antioxidants & Redox Signaling.* 7(1): 2.
- Salavati, M.; Ghafari, F.; Zhang, T. & Foladi-Nashta, A.A. 2012. Effects of oxygen concentration on in vitro maturation of canine oocytes in a chemically defined serum-free medium. *Reproduction.* 144:547–56.
- Sales, A.D.; Duarte, A.B.; Santos, R.R.; Alves, KA.; Lima, L.F.; Rodrigues, G.Q.; Brito, I.R.; Lobo, C.H.; Bruno, J.B.; Locatelli, Y.; Figueiredo, J.R. & Rodrigues, A.P. 2016. Modulation of aquaporins 3 and 9 after exposure of ovine ovarian tissue to cryoprotectants followed by in vitro culture. *Cell Tissue Res.* 365(2):415-24.
- Sanfilippo, S.; Canis, M.; Smitz, J.; Sion, B.; Darcha, C.; Janny, L. & Brugnon F. 2015. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod Biol Endocrinol.* 25;13:67.
- Santana, L.N.; Van Den Hurk, R.; Oskam, I.C.; Brito A.B.; Brito D.C.; Domingues S.F.S. & Santos, R.R. 2012. Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview. *Biopreserv Biobank.* 10 (3): 288-94.
- Santos, R.R. 2007a. Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation. 2007. 144f. Tese (Doutorado) - Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
- Santos, R.R.; Celestino, J.J.H.; Lopes, C.A.P.; Melo M.A.P.; Rodrigues A.P.R. & Figueiredo J.R. 2008. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 32(1): 9-15.
- Santos, R.R.; Knijn H.M.; Vos, P.L.A.M.; Oe C.H.Y.; Van Loon, T.; Colenbrander, B.; Gadella, B.M.; Van Den Hurk, B. & Roelen, B.A.J. 2009. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility.* 91(4): 1455-1458.
- Santos, R.R.; Rodrigues, A.P.; Costa, S.H.; Silva, J.R.; Matos, M.H.; Lucci, C.M.; Bão, S.N.; Van Den Hurk, R. & Figueiredo, J.R. 2006a. Histological and ultrastructural

- analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 91: 249–263.
- Santos, R.R.; Tharasanit, T.; Figueiredo, J.R.; Van Haefen, T. & Van Den Hurk, R. 2006b. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue and Research*. 325: 523–53.
- Santos, R.R.; Van Den Hurk, R.; Rodrigues, A.P.; Costa, S.H.; Martins, F.S.; Matos, M.H.; Celestino, J.J. & Figueiredo, J.R. 2007b. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Animal Reproduction Science*. 99: 53–64.
- Santos, R.R.; Amorim, C.; Cecconi, S.; Fassbender, M.; Imhof, M.; Lornage, J.; Paris, M.; Schoenfeldt, V. & Martinez-Madrid, B. 2010. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*. 122(3-4): 151-163.
- Saragusty, J.; Gacitua, H.; Rozenboim, I. & Arav, A. 2009. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnologia e Bioengenharia*. 104: 719-728.
- Saraiva, M.V.A.; Celestino, J.J.H.; Chaves, R.N.; Martins, F.S.; Bruno, J.B.; Lima-Verde, I.B.; Matos, M.H.T.; Silva, G.M.; Porfirio, E.P.; Bão, S.N.; Campello, C.C.; Silva, J.R.V. & Figueiredo, J.R. 2008. Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial follicle development. *Small Rum Res*. 78: 87–95.
- Saumande, J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec Med Vet*. 167:205-218, 1991.
- Schultz, R.M. & Wassarman, P.M. 1977. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci*. 24:167-194.
- Scott, P.P. 1970. Cats. In: Hafez ESE, editor. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Philadelphia, PA: Lea and Febiger. p. 192–208.
- Selmer-Olsen, E.; Birkeland, S. & Sorhaug, T. 1999. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized lactobacillus subjected to drying, storage and rehydration. *J Appl Microbiol*. 87(3):429-37.
- Shan, D.; Zhu, M.; Han, E.; Xue, H. & Cosnier, S. 2007. Calcium carbonate nanoparticles: A host matrix for the construction of highly sensitive amperometric phenol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 23. 648–654.
- Shaw, J.M.; Cox, S.L.; Trounson, A.O. & Jenkin, G. 2000. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Molecular Cell Endocrinology*. 161: 103–110.

- Shea, L.D.; Woodruff, T.K. & Shikanov, A. 2014. Bioengineering the Ovarian Follicle Microenvironment. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16:29–52.
- Shehata R. 1974. Mesonephric remnants in the female genital system of the domestic cat. *Felis domestica*. *Acta Anat (Basel)*. 87: 301–10.
- Shelton, J.N. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demiembryos. *Theriogenology*. 37: 713-721.
- Shille, V.M.; Lundstrom, K.E. & Stabenfeldt, G.H. 1979. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol Reprod*. 21:953–63.
- Shille, V.M; Munro, C.; Farmer, S.W.; Papkoff, H. & Stabenfeldt, G.H. 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 68; 29-39.
- Shin, T.; Kraemer, D.; Pryor, J.; Liu, L.; Rugila, J.; Howe, L.; Buck, S.; Murphy, K.; Lyons, L. & Mark Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 415.
- Silva, J.R.; Van Den Hurk, R.; de Matos, M.H.; dos Santos R.R.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O. & de Figueiredo, J.R. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. 61:1691–1704.
- Sinha, V.R.; Singla, A.K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K. & Dhawan, S. 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm*. 15;274(1-2):1-33.
- Sola-Penna, M. & Meyer-Fernandes, J.R. 1998. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch Biochem Biophys*. 360(1):10-4.
- Songsasen, N.; Spindler, R.E. & Wildt, D.E. 2007. Requirement for, and patterns of, pyruvate and glutamine metabolism in the domestic dog oocyte in vitro. *Mol Reprod Dev*. 74(7):870-7.
- Songsasen, N.; Woodruff, T.K. & Wildt, D.E. 2011. In vitro growth and steroidogenesis of dog follicles are influenced by the physical and hormonal microenvironment. *Reproduction*. 142(1):113-22.

- Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R. & Rudzinski, W.E. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. Jan 29;70(1-2):1-20.
- Spindler, R.E.; Pukazhenti, B.S. & Wildt, D.E. 2000. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. *Mol Reprod Dev*. 56(2):163-71.
- Sprícigo, J.F.W.; Morais, K.S.; Yang, B.S. & Dode, M.A. 2012. Effect of the exposure to methyl- β -cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. *Cryobiology*. 65; 319–325.
- Stornelli, M.A. 2007. Evaluación de semen en el gato doméstico: análisis de rutina y metodologías especiales felino. *Rev Bras Reprod Anim*. 31(1): 135-140.
- Stouffer, R.L.; Martínez-Chequer, J.C.; Molskness, T.A.; Xu, F. & Hazzard, T.M. 2001. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res*. 32; 567-575.
- Suh, C.S.; Sonntag, B. & Erickson, G.F. 2002. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord*. 3:5–12.
- Tamanini, C. & De Ambrogi, M. 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim*. 39; 206–216.
- Tanpradit, N.; Comizzoli, P.; Srisuwatanasagul, S. & hatdarong, K. 2015. Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. *Theriogenology*. 83(9):1553-61.
- Tatone, C.; Di Emidio, G.; Vento, M.; Ciriminna, R. & Artini, P.G. 2010. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological Endocrinology*, 26(8): 563–567.
- Telfer, E.E.; McLaughlin, M.; Ding, C. & Thong, K.J. 2008. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*. 23(5):1151-8.
- Tewes, F.; Gobbo, O.L.; Ehrhardt, C. & Healy, A.M. 2015. Amorphous Calcium Carbonate Based-Microparticles for Peptide Pulmonary Delivery. American Chemical Society.
- Tian, T.; Zhao, G.; Han, D.; Zhu, K.; Chen, D.; Zhang, Z.; Wei, Z.; Cao, Y. & Zhou, P. 2015. Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviors of human ovarian tissues: sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. *Hum Reprod*, 5.

- Tilly, J.L. & Tilly, K.I. 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 136:242–52.
- Tran, V.T.; Benoit, J.P. & Venier-Julienne, M.C. 2011. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? *Int J Pharm*.407:1–11.
- Tsutsui, T. & Stabenfeldt. 1993. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *J. Reproduction Fert. Suppl.* 47: 29-35.
- Turathum, B.; Saikhun, K.; Sangsuwan, P. & Kitiyanant, Y. 2010. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 70.
- Uchikura, K.; Nagano, M. & Hishinuma, M. 2010. Evaluation of follicular development and oocyte quality in pre-pubertal cats. *Reprod Domest Anim.* 45:e405–e411.
- Uskokovic, V. 2007. Nanotechnologies: what we do not know. *Technol Soc.* v. 29, n. 1, p. 43-61.
- Vajta, G.; Holm, P.; Kuwayama, M.; Booth, P.J.; Jacobsen, H.; Greve, T. & Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development.* 51: 53–58.
- Van den Hurk, R.; Dijkstra, G.; Van Mil, F.N.; Hulshof, S.C. & Van den Ingh, T.S. 1995. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev*, 41:459-467.
- Van den Hurk, R.; Bevers, M.M. & Beckers, J.F. 1997. In vivo and in-vitro development of pre-antral follicles. *Theriogenology*, 47:73-82.
- Van Den Hurk, R. & Santos, R. 2009. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. *Anim. Reprod.*, v.6, n.1, p.72-95.
- Van Wezel, I.L. & Rodgers, R.J. 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod.* 55:1003–11.
- Virant-Klun, I.; Skutella, T.; Stimpfel, M. & Sinkovec, J. 2011. Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells, *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 12.
- Virant-Klun, I.; Zech, N.; Rozman, P.; Vogler, A.; Cvjeticanin, B.; Klemenc, P.; Malicev, E. & Meden-Vrtovec, H. 2008. Putative stem cells with anembryonic

character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*. 76: 843–856.

Volodkin, D.V.; Larionova, N.I. & Sukhorukov, G.B. 2004. *Biomacromolecules*. 5, 1962–1972.

Wang, C.; He, C.; Tong, Z.; Liu, X.; Ren, B. & Zeng F. 2006. Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *Int J Pharm*. 308:160-167.

Warskulat, U.; Wettstein, M. & Haussinger, D. 1995. Betaine is an osmolyte in RAW 264.7 mouse macrophages. *FEBS Lett* 377, 4750.

Wenzel, J.G. & Odenk'dhal, S. 1985. The mammalian rete ovarii: a literature review. *Cornell Vet*. 75:411–25.

West, E.R.; Xu, M.; Woodruff, T.K. & Shea, L.D. 2007. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials*. 28(30):4439-48.

Wiedemann, C.; Hribal, R.; Ringleb, J.; Bertelsen, M.F.; Rasmusen, K.; Andersen, C.Y.; Kristensen, S.G. & Jewgenow, K. 2012. Preservation of Primordial Follicles from Lions by Slow Freezing and Xenotransplantation of Ovarian Cortex into an Immunodeficient Mouse. *Reprod Dom Anim*. 47 (6): 300–304.

Wiedemann, C.; Zahmel, J. & Jewgenow, K. 2013. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Veterinary Research*. 9:37.

Wigglesworth, K.; Lee, K.B.; Emori, C.; Sugiura, K.; Eppig, J.J. 2015. Transcriptomic Diversification of Developing Cumulus and Mural Granulosa Cells in Mouse Ovarian Follicles. *Biol Reprod*. 92(1); 23.

Wildt D.E.; Seager, S. W. & Chakraborty, P.K. 1980. Effect of copulatory stimulation incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*. 107:1212–7.

Wildt, D.E.; Swanson, W.; Brown, J.; Sliwa, A. & Vargas, A. 2010. Felids ex situ: managed programmes, research and species recovery. In: MacDonald DW, Loveridge AJ (eds.), *Biology and Conservation of Wild Felids*. New York: Oxford University Press; 2010:217–236.

Wilkerson, W.V. 1923. The rete ovarii as a normal structure of the adult mammalian ovary. *Anat Rec*. 26:75–7.

- Windrum P.; Morris, T.C.; Drake, M.B.; Niederwieser, D. & Ruutu, T. 2005. Variation in Dimethyl Sulfoxide Use in Stem Cell Transplantation: A Survey of Ebmt Centres. *Bone Marrow Transplant.* 36:601–603.
- Wolf, D.P.; Thormahlen, S.; Ramsey, C.; Yeoman, R.R.; Fanton, J. & Mitalipov, S. 2004. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. *Biology of Reproduction.* 71: 486–493.
- Wongbandue, G.; Jewgenow, K. & Chatdarong, K. 2013. Effects of thyroxin (T4) and activin A on in vitro growth of preantral follicles in domestic cats. *Theriogenology.* 15;79(5):824-32.
- Wood, T.C.; Montali, R.J. & Wildt, D.E. 1997. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Molecular Reproduction and Development.* 46; 190-200.
- Wright, S.H.; Wunz, T.M. & Silva, A.L., 1992. Betaine transport in the gill of a marine mussel, *Mytilus californianus*. *Am. J. Physiol.* 263, R226R232
- Wu, C.; Rui, R.; Dai, J.; Zhang, C.; Ju, S.; Xie, B.; Lu, X. & Zheng, X. 2006. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure, and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 73:1454–1462.
- Yancey, P.H.; Clark, M.E. & Hand, S.C. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 12141222.
- Yen, S.S.C. 1999. The human menstrual cycle. In: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL, eds. *Reprod Endoc Physil Patho Clinical Man.* Philadelphia. Saunders; 200–236.
- Youm H.W.; Lee J.R.; Lee, J.; Jee, B.C.; Suh, C.S. & Kim, S.H. 2014. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Hum Reprod.* 29:720–730.
- Zamboni, L. & Gondos, B. 1968. Intercellular bridges and synchronization of germ cell differentiation during oogenesis in the rabbit. *J Cell Biol.* 36:276–82.
- Zhang, F.; Warskulat, U.; Wettstein, M. & Haussinger, D. 1996. Identification of betaine as an osmolyte in Ž. rat liver macrophages Kupffer cells. *Gastroenterology* 110, 15431552.
- Zhang, J.M.; Wang, H.C.; Wang, H.X.; Ruan, L.H.; Zhang, Y.M.; Li, J.T.; Tian, S. & Zhang, Y.C. 2013. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 166(1): 52-5.

- Zhang, W.; Rong, J.; Wang, Q. & He, X. 2009. The Encapsulation and Intracellular Delivery of Trehalose Using a Thermally Responsive Nanocapsule. *Nanotechnology*. 20:275101.
- Zhang, Y.; Ma, P.; Wang, Y.; Du, J.; Zhou, Q.; Zhu, Z.; Yang, X. & Yuan, J. 2012. Biocompatibility of porous spherical calcium carbonate microparticles on hela cells. *World J Nano Sci Eng*. 2:25.
- Zheng, J.H.; Min, Z.L.; Li, Y.L.; Zhu, Y.H.; Ye, T.J.; Li, J.Q.; Pan, T.W.; Ding, G.S. & Wang, M.L. 2008. A modified CZ-1 preserving solution for organ transplantation: comparative study with UW preserving solution. *Chin Med J*. 121(10): 904–909.
- Zhu, Y.; Zhang, X.; Zhu, J.; Zhao, Q.; Li, Y.; Li, W.; Fan, C. & Huang, Q. 2012. Cytotoxicity of phenol red in toxicity assays for carbon nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 26;13(10):12336-48.
- Zuccotti, M.; Merico, V.; Cecconi, S.; Redi, C.A. & Garagna, S. 2011. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum Reprod Update*. 17:525–540.
- Zuccotti, M.; Ponce, R.H.; Boiani, M.; Guizzardi, S.; Govoni, P.; Scandroglio, R.; Garagna, S. & Redi, C.A. 2002. The analysis of chromatin organization allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote*. 10:73–78.

6. CAPÍTULO 2

**Efeitos Prejudiciais do Vermelho Fenol na Vitificação de tecido ovariano de gata
(*Felis catus*)**

**Detrimental Effect of Phenol Red on the Vitification of Cat (*Felis catus*) Ovarian
Tissue**

Periódico: Biopreservation and Biobanking, (Publicado) Volume 14 (1), 2016 - DOI:
10.1089/bio.2015.0025

Detrimental Effect of Phenol Red on the Vitification of Cat (*Felis catus*) Ovarian Tissue

Danielle C. Brito,^{1,2} Sheyla F.S. Domingues,² Joyce K. Silva,³ Xueqing Wu,⁴
Regiane R. Santos,^{2,4} and Julio C. Pieczarka¹

1 Laboratory of cytogenetics, Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Brazil

2 Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Brazil

3 Laboratory Engineering of Natural Products, Federal University of Pará, Brazil

4 Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

*Corresponding author: Universidade Federal do Pará (UFPA) – Faculdade de Ciências Biológicas – Programa de Pós-Graduação Biotecnologia (PPGBiotec) – Laboratório de citogenética; Rua Augusto Corrêa, 01 – Guamá; Belém – PA – Brazil. CEP: 66075-110; Caixa Postal 479. Tel UFPA.: +55 91 32017000; Tel LabCitogen +55 91 32018423.

E-mail: daniellecalado@ymail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of different media with or without phenol red or the antioxidant trolox on the successful vitrification of feline ovarian tissue. In a first experiment, ovarian cortical pieces from three cats were vitrified in solutions of Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium, Minimum Essential Medium, Dulbecco's modified Eagle's medium, or Tissue Culture Medium 199 as basic medium, supplemented or not with 50mM of trolox, all containing 40% ethylene glycol (EG) and 1M of sucrose. RPMI-1640 (phenol red-free) without trolox was the only medium that preserved the percentage of morphologically normal preantral follicles similar to control (80%). The main difference between RPMI-1640 and the other media was the absence of phenol red and CaCl₂. In a second experiment, ovarian cortical pieces from three cats were vitrified in a solution containing RPMI-1640 as basic medium, 40%EG, 1M of sucrose, supplemented or not with phenol red or CaCl₂ alone, or in combination. It was observed that phenol red supplementation led to follicular degeneration. Finally, to evaluate the interaction between phenol red and the cryoprotectant agent (i.e., EG), ovarian tissue was exposed to RPMI-1640 supplemented with phenol red and EG at different concentrations (10%, 20%, or 40%). There was no inverse relationship between EG concentration and free phenol red in the medium after exposure. It is suggested that vitrification of feline ovarian tissue should be performed in a phenol red-free medium. Medium supplementation with 50mM of trolox was deleterious for follicular morphology.

INTRODUCTION

Ovarian tissue cryopreservation is a tool for preservation of human gametes. Such a technique can also be applied to preserve genetic material from endangered animal breeds and species.¹ Vitrification has been proven to be a valuable method to preserve ovarian tissue structure when compared with conventional freezing, especially when considering the preservation of the ovarian stroma,² which plays an important role in the survival of cryopreserved ovarian follicles after culture.³ Furthermore, vitrification facilitates the process of cryopreservation when wild animals are found dead in zoos, or in their habitats far from specialized laboratories.

Cryopreservation protocols developed for domestic cats have been applied in wild felines with promising outcomes.⁴ Luvoni et al.⁵ showed that it is possible to preserve the morphology of feline ovarian follicles at different developmental stages after vitrification of the ovarian cortex. However, the success of this procedure remains limited. For instance, Bosch et al.⁶ observed that only 10% of ovarian follicles survived after xenografting of frozen–thawed feline ovarian cortex. When preparing cryopreservation solutions for domestic animals, usually the basic media are Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM), or Tissue Culture Medium 199 (TCM199),^{7–11} all of which contain the pH indicator phenol red. On the other hand, successful vitrification of human and murine ovarian tissue is performed in phenol red–free media [Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640),¹² phosphate buffered saline (PBS),¹³ Dulbecco’s PBS¹⁴]. Hence, aside from the intrinsic characteristics involving feline gamete sensitivity to chilling,¹⁵ it was hypothesized herein that success of vitrification may also be dependent on the composition of the medium used to prepare the cryopreservation solution.

It has been reported that medium supplementation with antioxidants supports the maintenance of follicular viability and morphology^{16,17} during cryopreservation of ovarian tissue. In a recent study, the authors showed that 50mM of trolox not only protected ovarian follicles from freezing damage, but also avoided vacuolization of oocytes and stromal tissue from non-human primates submitted to cryopreservation¹¹ or ischemic stress.¹⁸ Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) is hydro- and liposoluble due to a carboxyl group, and acts as a hydroxyl and alkoxyl radical scavenger independently of the solution type (aqueous or lipid).¹⁹ Therefore,

medium supplementation was tested with 50mM of trolox based on the success of the vitrification of feline ovarian tissue.

The present study aimed to investigate the effect of the basic medium with (DMEM, MEM, or TCM199) or without (RPMI 1640) phenol red on the vitrification of ovarian tissue from domestic cats (*Felis catus*). The possible interaction of this compound with an intracellular cryoprotectant [ethylene glycol (EG)] was also evaluated. Furthermore, medium supplementation with the antioxidant trolox was tested.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Unless stated otherwise, chemicals and media used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). For all of the media, the pH was adjusted to 7.4 at room temperature (~25°C).

Source of ovaries

Nine adult queen cats were subjected to ovariohysterectomy at the Veterinary Hospital of the Federal University of Pará, Brazil. Collected ovaries were allocated to three experiments. For all experiments (Supplementary Fig. S1; Supplementary materials are available online at www.liebertpub.com/), immediately after collection, each ovarian pair derived from the same queen was sliced into 2mm³ pieces and distributed in treatments according to each experiment as follows.

Experiment 1

Each ovarian pair from 3 queens was divided into 9 fragments (2mm³). One fragment was randomly selected as the fresh control and was fixed in Davidson solution for routine histological evaluation. The remaining eight fragments were exposed to the vitrification solution for 5min at 20°C. The vitrification solution consisted of 40% EG and 1M of sucrose in MEM, DMEM, TCM199, or RPMI-1640, either supplemented or not with 50mM of trolox. After exposure, samples were vitrified.

Experiment 2

Each ovarian pair from 3 queens was divided into 5 fragments (2mm³). One fragment was randomly selected as the fresh control and fixed in Davidson solution for

routine histological evaluation. The remaining 4 fragments were exposed to the vitrification solutions for 5min at 20°C. Based on experiment 1, vitrification solution consisted of EG +1M of sucrose in RPMI-1640 medium with or without 0.04mM of phenol red, 1.8mM of CaCl₂, or both. The choice of adding phenol red or CaCl₂ to the medium was based on the main differences in the composition of RPMI1640 and the other media (ST1 c Supplementary Table S1) tested herewith in experiment 1.

Experiment 3

Each ovarian pair from 3 queens was divided into 11 fragments (2mm³). One fragment was randomly selected as the fresh control and fixed in Davidson solution for routine histological evaluation. The remaining 10 fragments were exposed to RPMI-1640 alone or with 1M of sucrose and EG (0%, 10%, 20%, or 40%) added. Each solution was either supplemented or not with phenol red. After exposure, ovarian fragments were processed for histological analysis, and free phenol red in the exposure medium was measured.

Vitrification

The solid-surface vitrification procedure as well as the protocol for incubating tissue in vitrification solutions for 5min at 20°C, the dilution regimen to remove the cryoprotectants after warming, and the time and temperature of exposure were chosen based on studies previously described.^{8,9} In brief, vitrification solutions were prepared just prior to use. Each fragment was initially kept for 5min at 20°C in 1mL of the vitrification solution, after which fragments were placed on a cold surface consisting of a hollow cube of aluminum foil partially immersed in liquid nitrogen. The vitrified fragments were transferred into cryovials using nitrogen-cooled forceps, and stored in the liquid phase of a liquid nitrogen tank. Vitrified ovarian fragments were maintained in cryostorage for 1 week. For warming, cryovials were exposed to room temperature (~25C) for 1min, and fragments were separately submitted to cryoprotectant removal. For this step, fragments were immersed in each respective test medium (TM) at 37°C as follows: (1) TM +0.25M of sucrose (3min), (2) TM +0.125M of sucrose (5min), and (3) TM (7min). After removal of cryoprotectant, ovarian fragments were fixed for histological analysis.

Histological analysis

After fixation in Davidson solution, ovarian fragments were dehydrated in ethanol, clarified with xylene, and embedded in paraffin wax. Serial sections (5 μ m) of ovarian tissue were cut, and every fifth section was mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin. All sections were examined using a light microscope (Leica) at a magnification of 200x. Preantral follicles were defined as follicles with an oocyte surrounded by either one flattened and/or cuboidal layer or several layers of only cuboidal granulosa cells. To avoid counting a follicle more than once, preantral follicles were counted only in the sections where their oocyte nucleus was observed. Follicular quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte, the granulosa cells, and the basement membrane.⁷ In brief, preantral follicles are classified as (1) histologically/morphologically normal when they contain an intact oocyte and intact granulosa cells; (2) degenerated grade 1 when their oocyte nucleus has become pyknotic; and (3) degenerated grade 2 when the oocyte is shrunken and its nucleus pyknotic, and when granulosa cells may have detached from the basement membrane and have become enlarged in volume.

Determination of free phenol red in the medium and its cytotoxicity

For a standard curve, serial 2-fold dilutions of phenol red in RPMI-1640 in final concentrations of 0.8, 0.4, 0.16, 0.08, and 0.04 mg/mL were prepared. RPMI-1640 alone was used as blank. Phenol red adsorption was detected using a UV/Vis spectrophotometer (TU-1800SPC, China) at 560nm wave length, as reported in a previous study.²⁰ Samples exposed to vitrification solutions as stated in experiment 3 were fixed for histological analysis to determine cell quality via morphology. After exposure, tissues were submitted to cryoprotectant removal as described above, and the exposure medium was evaluated for freephenolred inthe solution. For this, exposure solutions were separately centrifuged (AU4 c 1,200rpm for 10min), and supernatants were submitted to phenol red measurement using the UV/Vis spectrophotometer at 560nm wavelength. The amounts of freephenol red inthe médium were calculated according to the equation:

$$Q = (C_o - C_e)/C_{eg}$$

where Co and Ce are the phenol red concentrations ($\mu\text{g/mL}$) contained in the original tissue exposure medium and in the supernatants, respectively, and Ceg is the concentration of EG in the exposure medium (mg/mL).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), and comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test using Prism v6.04. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Experiment 1: medium composition affects feline follicular survival after vitrification

A total of 2,768 preantral follicles were evaluated. The rates of morphologically normal preantral follicles were similar to the control (80%–12%) only when ovarian tissue was vitrified in RPMI-1640 without trolox (50%–38%). The highest degeneration rates were observed in feline ovarian tissue vitrified in a medium composed of DMEM, where only 5.6%–5.6% of the follicles appeared morphologically normal. Trolox did not improve the rates of morphologically normal preantral follicles, and even significantly decreased the percentages (25%–19%) of normal follicles vitrified in a RPMI-1640-based medium (Fig.1)

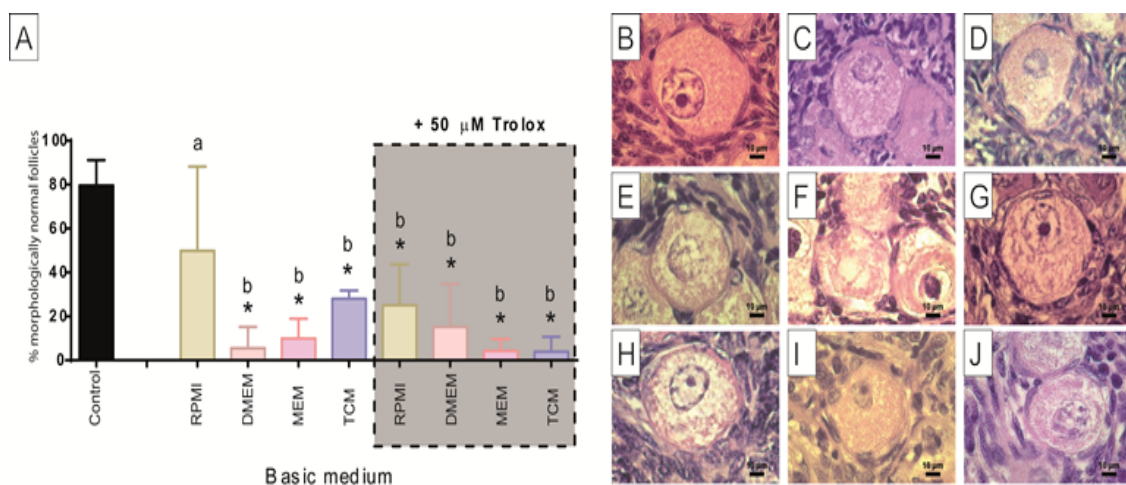


Fig. 1. (A) Percentages [mean – standard deviation (SD)] of morphologically normal preantral follicles in control and in vitrified ovarian fragments. Representative histological sections of feline preantral ovarian follicles from (B) control, or from vitrified tissue in (C) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM),

(D) DMEM + trolox, (E) Minimum Essential Medium (MEM), (F) MEM + trolox, (G) Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium, (H) RPMI-1640 + trolox, (I) Tissue Culture Medium 199 (TCM199), or (J) TCM199 + trolox as basic medium. To each basic medium, 40% ethylene glycol (EG) and 1M of sucrose were added to obtain the vitrification solution. *Differs from control; a,b differences when comparing treatments ($P < 0.05$).

Experiment 2: phenol red and not calcium impairs follicular survival to vitrification

A total of 988 preantral follicles were evaluated. The rates of morphologically normal preantral follicles were similar to the control (67%–8%) only when ovarian tissue was vitrified in RPMI-1640 without (42%–26%), or supplemented with calcium chloride (52%–12%). Phenol red led to a significant increase in the degeneration rates of the preantral follicles from vitrified ovarian tissue (17%–5%), regardless of whether it was combined with calcium chloride (10%–9%; Fig.2).

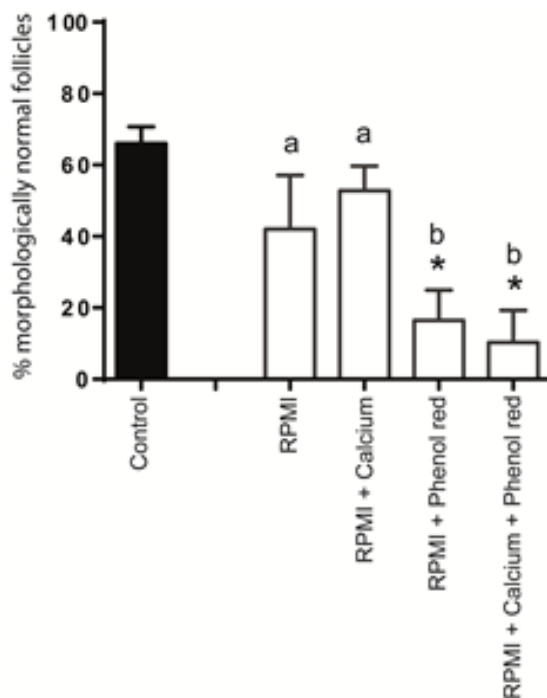


Fig. 2. Percentages (mean – SD) of morphologically normal follicles in control and in vitrified ovarian fragments. Effect of RPMI-1640 supplementation with 1.8mM of calcium, 0.04mM of phenol red, or both. Vitrification was performed in the presence of 40% EG and 1M of sucrose. *Differs from control; a,b differences when comparing treatments ($P < 0.05$).

Experiment 3: damage driven by exposure to phenol red is intensified in the presence of 20% and 40% EG

A total of 2,842 preantral follicles were evaluated immediately after exposure to different solutions with or without phenol red in their composition. The rates of morphologically normal preantral follicles were similar to the control (89%–4%) in all

treatments. However, when ovarian tissue was exposed to a vitrification solution where RPMI-1640 was supplemented with phenol red and contained 20% (25%–10%) or 40% EG (16%–10%), a significant decrease in the percentage of normal follicles was detected (Fig. 3A).

To verify experimentally the speculation that the toxic effect of phenol red was increased in interaction with EG, the concentration of phenol red free in the medium after ovarian tissue exposure was evaluated. It was observed that an EG concentration dependent effect occurred, where increases in EG concentration from 10% to 20% and from 20% to 40% resulted in a significant decrease in the levels of phenol red free in the medium (Fig. 3B).

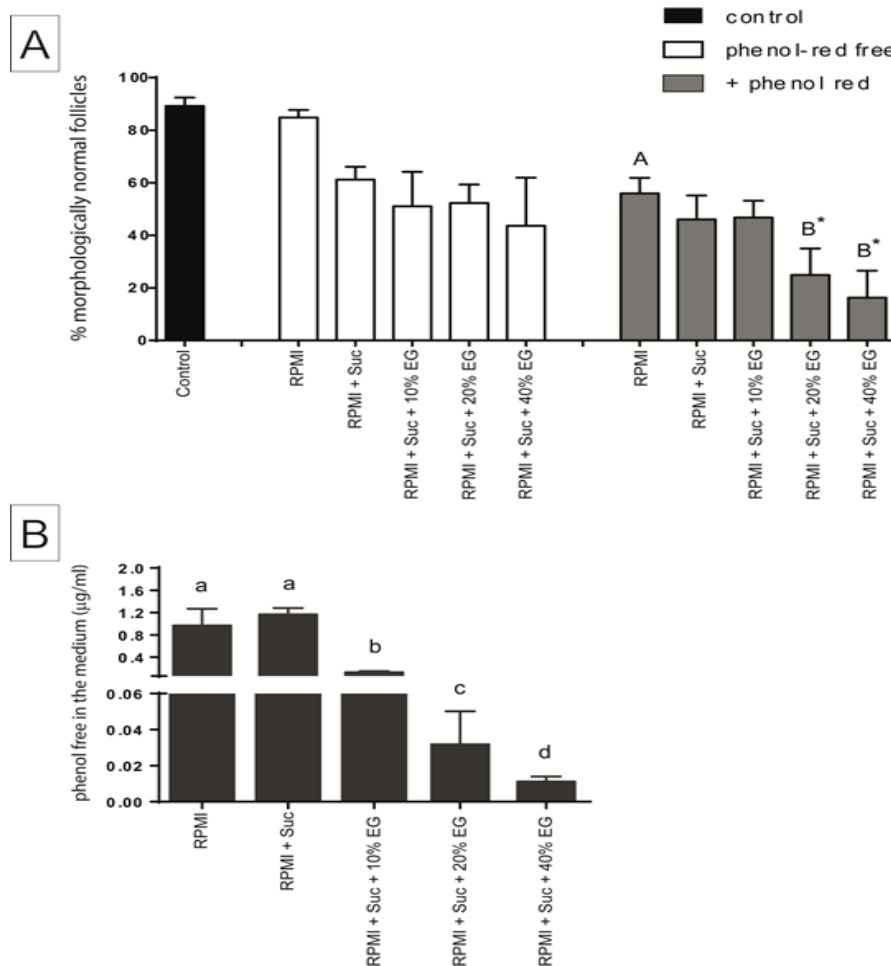


Fig. 3. (A) Percentages (mean – SD) of morphologically normal follicles in control and ovarian fragments exposed to RPMI-1640, supplemented or not with 1M of sucrose, EG (10%, 20%, or 40%), 0.04mM of phenol red, or various combinations thereof. (B) Mean– SD concentration of phenol red free in the medium after ovarian tissue exposure to different solutions, as measured by spectrophotometry. *Differs from control; a,b differences when comparing treatments ($P < 0.05$).

DISCUSSION

The present study showed the detrimental effect of phenol red on the morphology of vitrified feline preantral follicles. Four commercial media used for the preparation of cryopreservation solutions (DMEM, MEM, TCM, and RPMI-1640) were tested. Among these, RPMI-1640 is commonly used without phenol red or calcium chloride supplementation. Also, based on previous studies in nonhuman primates,^{11,12} 50mM of trolox was added to the vitrification solution as a strategy to counteract follicular loss due to oxidative stress. Inconsistent with observations in non-human primates, 50mM of trolox in the medium led to a significant increase in follicular loss. It has been shown that the antioxidant trolox may act as a pro-oxidant, depending on the environment, but such a mechanism is still not completely clarified.²¹ It is likely that for feline ovarian tissue, this concentration is already giving rise to the Ushaped biphasic effect, or this effect is simply caused by the vitrification process, different from what was observed in frozen–thawed non-human primate ovarian tissue.¹¹ Degenerated preantral follicles presented ooplasm vacuolization as reported before in cryopreserved ovarian tissue from other species,^{11,13,22,23} and might be related to inappropriate dehydration of the tissue, perhaps together with osmotic stress.²⁴ In the present study, degeneration was not only related to osmotic stress caused by vitrification solution, but also by the medium used as the basis.

The main difference between RPMI-1640 and the other tested media was the absence of calcium chloride and phenol red. Therefore, extra experiments were performed adding these compounds to RPMI-1640, followed by ovarian tissue vitrification. The phenol red but not calcium was responsible for the follicular degeneration. The use of calcium-free cryopreservation solutions containing EG have been indicated for the preservation of oocytes, mostly mature ones or those harvested from antral follicles, since a rise in calcium may lead to zona pellucida hardening.²⁵ However, this is not a challenge for immature oocytes from preantral follicles, which are not yet provided with cortical granules. Although RPMI-1640 has no calcium chloride in its composition, calcium nitrate is present.

Although phenol red in cell culture media is well accepted, many commercial vitrification media used in clinics are phenol red–free, since this pH indicator is unnecessary in such a process. For instance, successful recent studies with human and mouse cells used phenol red–free media.^{13,26,27} However, these authors did not

evaluate or considered to discuss the absence of phenol red in the basis medium. Zhu et al.²⁰ reported phenol red as the causative agent of toxicity in HeLa cells culture in a serum-free medium. The present study also performed all vitrification processes in a serumfree system, and a decrease in cell survival in medium supplemented with phenol red was observed. In the study by Zhu et al.,²⁰ the internalization of phenol red in HeLa cells was related to its interaction with carbon nanoparticles present in the culture medium. The present study evaluated the relationship of phenol red and EG at different concentrations in the exposure medium to evaluate such an interaction. Interestingly, there was an inverse relationship of free phenol red with the concentration of EG in the exposure medium. For instance, with the increase of EG concentration from 10% to 40%, there was a decrease of free phenol red in the exposure medium. Although the scientific nature behind this phenomenon is unclear, it is suggested that the intracellular cryoprotectant EG interacted with phenol red facilitating its permeation into the tissue, similar to the findings with carbon nanoparticles,²⁰ hence explaining the decrease in free phenol red in the exposure medium and the increase in ovarian follicles degeneration.

In conclusion, feline ovarian tissue can be best vitrified in a phenol red-free solution, and the use of 50mM of trolox does not improve follicular survival. Vitrification is still under improvement, and the susceptibility of feline ovarian follicles to degeneration must be considered. For instance, the use of high concentrations of cryoprotectants plays an important role in follicular loss due to osmotic shock. Therefore, the combination of cryoprotectants with intracellular solutions, for example HypoThermosol,²⁸ might appear as an alternative to protect the ovarian follicles against stress and cryoprotectants toxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CNPq, Brazil. D.C.B. was supported by a grant from CAPES.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No conflicting financial interests exist.

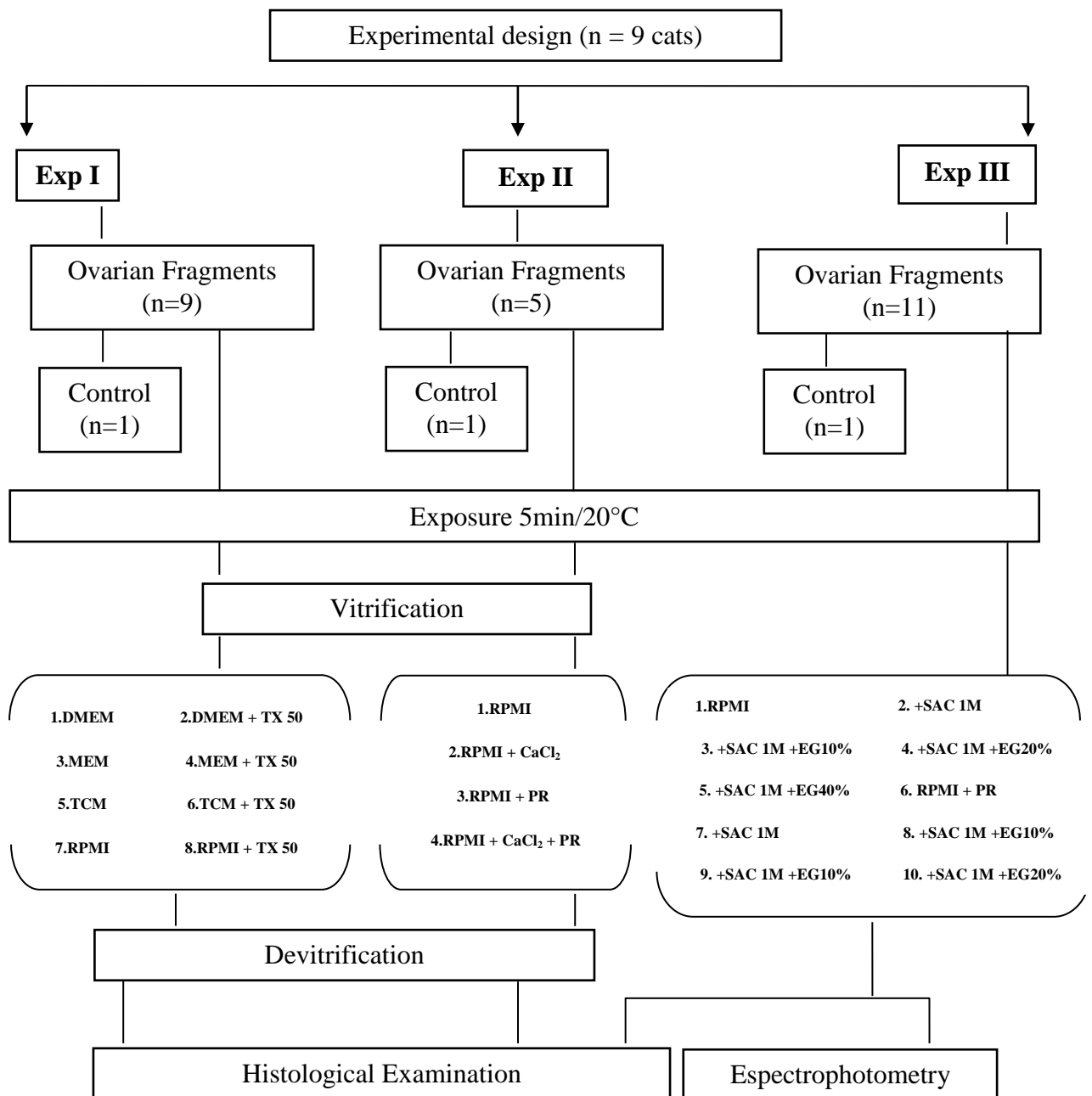
REFERENCES

1. Santos RR, Amorim C, Cecconi S, et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci* 2010;122:151–163.
2. Keros V, Xella S, Hultenby K, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670–1683.
3. Faustino LR, Santos RR, Silva CM, et al. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Anim Reprod Sci* 2010;122:90–97.
4. 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.
5. Luvoni GC, Tessaro I, Apparicio M, et al. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reprod Domest Anim* 2012;47:385–391.
6. Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology* 2004;61:581–594.
7. Lima AK, Silva AR, Santos RR, et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology* 2006;66:1664–1666.
8. Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res* 2007;327:167–176.
9. Celestino JJ, Santos RR, Melo MA, et al. Vitrification of bovine ovarian tissue by solid-surface vitrification method. *Biopreserv Biobank* 2010;8:219–221.
10. Faheem MS, Carvalhais I, Baron E, et al. Effect of bovine ovarian tissue vitrification on the structural preservation of antral follicles. *Reprod Dom Anim* 2013;48:774–780.
11. Brito DC, Brito AB, Scalercio SR, et al. Vitamin E-analog trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen–thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Res* 2014;355:471–480.
12. Mayerhofer K, Ott J, Nouri K, et al. Laparoscopic ovarian tissue harvesting for cryopreservation: an effective and safe procedure for fertility preservation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;152:68–72.

13. Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, et al. Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification. *Biomed Res Int* 2014;2014:673537.
14. Youm HW, Lee JR, Lee J, et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Hum Reprod* 2014;29:720–730.
15. Luvoni GC. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006;66:101–111.
16. Melo MAP, Oskam IC, Celestino JJH, et al. Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. *Reprod Dom Anim* 2011;46:742–745.
17. Luz KMH, Santos RR, Wanderley LS, et al. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol freezing medium. *Biopreserv Biobank* 2012;10:338–342.
18. Scalercio SR, Amorim CA, Brito DC, et al. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reprod Fertil Dev* 2015 May 21. DOI: 10.1071/RD14454. [Epub ahead of print].
19. Alberto ME, Russo N, Grand A, et al. A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment. *Phys Chem Chem Phys* 2013;15:4642–4650.
20. Zhu Y, Zhang X, Zhu J, et al. Cytotoxicity of phenol red in toxicity assays for carbon nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2012; 13:12336–12348.
21. Wattamwar PP, Hardas SS, Butterfield DA, et al. Tuning of the pro-oxidant and antioxidant activity of trolox through the controlled release from biodegradable poly(trolox ester) polymers. *J Biomed Mater Res A* 2011;99: 184–191.
22. Oskam IC, Asadi BA, Santos RR. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. *Fertil Steril* 2010;93:2764–2766.
23. Oskam IC, Lund T, Santos RR. Irreversible damage in ovine ovarian tissue after cryopreservation in propanediol: analyses after in vitro culture and xenotransplantation. *Reprod Domest Anim* 2011;46:793–799.
24. Camboni A, Martinez-Madrid B, Dolmans MM, et al. Preservation of fertility in young cancer patients: contribution of transmission electron microscopy. *Reprod Biomed Online* 2008;17:136–150.

25. Kohaya N, Fujiwara K, Ito J, et al. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol: the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. *J Reprod Dev* 2011;57:675–680.
26. Sanfilippo S, Canis M, Smitz J, et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:67.
27. Lee J, Kim SK, Youm HW, et al. Effects of three different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *PLoS One* 2015;105: e0126252.
28. Baust JM, Van Buskirk R, Baust JG. Modulation of the cryopreservation capacity: elevated survival with reduced dimethyl sulfoxide concentration. *Cryobiology* 2002;45:97–108.

Supplementary Figure 1.



Supplementary Table 1. Composition of the media used in the present study.

	RPMI-1640 (R8755)	DMEM (31600)	MEM (42360-024)	TCM 199 (M2520)
Amino acids				
Glycine	+	+		+
L-alanine			+	+
L-aspartic acid	+			+
L-Cysteine hydrochloride- H2O				+
L-Glutamic Acid	+			+
L-Glutamine	+	+		+
L-Hydroxyproline	+			+
L-Proline	+			+
L-Serine	+	+		+
L-Asparagine	+			
Vitamins				
Tocopherol phosphate•2Na				+
L-Ascorbic Acid•Na				+
D-Biotin				+
D-calcium pantothenate		+	+	
Menadione (Vit K3)				+
Nicotinic acid (Niacin)				+
p-Aminobenzoic Acid	+			+
Retinol Acetate (Vit A)				+
Ergocalciferol				+
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	+			+
Vit B12	+			
Inorganic salts				
Calcium chloride		+	+	+
Ferric nitrate		+		+
Sodium bicarbonate	+	+	+	
Calcium nitrate	+			
Other components				
2-Deoxy-ribose				+
Adenine Hemisulfate				+
Adenosine 5'-phosphate				+
Adenosine 5'-triphosphate				+
Cholesterol				+
Glutathione (reduced)	+			+
Guanine hydrochloride				+
HEPES			+	+
Hypoxanthine				+
Phenol Red•Na		+	+	+
Ribose				+
Sodium Acetate (anhydrous)				+
Thymine				+
Polyoxyethylenesorbitan Monooleate Tween 80®				+
Uracil				+
Xanthine-Na				+
Sodium piruvate		+		+

7. CAPÍTULO 3

Improved vitrification of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue using trehalose as an extracellular cryoprotectant and the effect of open and closed methods on the modulation of aquaporin 3 and ABCB1 mRNA expression

Vitrificação de tecido ovariano de gatao doméstica (*Felis catus*) usando trealose como crioprotector extracelular e o efeito de métodos aberto e fechado sobre a modulação da expressão de mRNA da aquaporin 3 e ABCB1

Improved vitrification of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue using trehalose as an extracellular cryoprotectant and the effect of open and closed methods on the modulation of aquaporin 3 and ABCB1 mRNA expression

Running title: Vitrification of cat ovarian tissue

D.C. Brito^{1,2*}, A.P.R. Rodrigues³, C. Maside³, F.O. Lunardi³, X. Wu⁴, J.R. Figueiredo³,
S.F.S. Domingues², J.C. Pieczarka¹, R.R. Santos²

¹ Laboratory of Cytogenetics, Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Brazil;

² Laboratory of Wild Animal Biology and Medicine, Federal University of Pará, Brazil;

³ Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Pre-Antral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary Medicine, Ceará State University, Fortaleza, CE, Brazil;

⁴ Hubert Department of Global Health, Rollins School of Public Health, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America.

*Corresponding author: Universidade Federal do Pará (UFPA) – Faculdade de Ciências Biológicas – Programa de Pós-Graduação Biotecnologia (PPGBiotec) – Laboratório de citogenética; Rua Augusto Corrêa, 01 – Guamá; Belém – PA – Brazil. CEP: 66075-110; Caixa Postal 479. Tel UFPA.: +55 91 32017000; Tel LabCitogen +55 91 32018423.

E-mail: daniellecalado@gmail.com

ABSTRACT

In a first experiment, feline preantral follicles within ovarian fragments collected from five domestic adult cats were vitrified in the presence of the extracellular cryoprotectants sucrose, trehalose, or raffinose. Histological analysis showed that the percentages of normal follicles in ovarian fragments vitrified in trehalose combined with EG were similar to those of controls (ovarian fragments fixed without previous vitrification), preserving the morphology of not only primordial follicles, but also from secondary ones. None of the treatments caused ovarian tissue fibrosis. Based on this, a second experiment consisted in the vitrification of feline ovarian tissue from other five adult domestic cats applying trehalose as extracellular cryoprotectant, as well as ethylene glycol (EG) alone or combined with dimethyl sulfoxide (DMSO), using two systems: the open system solid-surface vitrification (SSV) or the closed system ovarian tissue cryosystem (OTC). Histological analysis of follicle integrity showed that the percentages of normal follicles in ovarian fragments previously vitrified, independently on the protocol used, were decreased after *in vitro* culture for seven days, together with an increase in tissue fibrosis. Although follicular activation was not observed by morphological analysis, Ki67 and AgNOR labeling showed primordial follicle activation especially when OTC was used, while proliferation of granulosa cells from primary follicles in tissue previously vitrified was similar for both SSV and OTC methods. However, when ovarian tissue was vitrified with the SSV method and using EG only as intracellular cryoprotectant, it was observed a down-regulation of the mRNA expression of the water channel protein aquaporin 9.

Keywords: Preantral follicles . Feline . Functionality . Cryopreservation . Sugars

INTRODUCTION

Ovarian tissue vitrification is a suitable method to be applied in field conditions for preserving ovarian tissue from wild mammals, especially from those threatened species (Santos et al., 2010). The domestic cat, *Felis catus*, is commonly used as an animal model for wild feline species (Wiedemann et al. 2013). However, there is a paucity of efficient vitrification procedures for feline ovarian tissue. Although some pioneer studies have shown the preservation of oocyte (Alves et al., 2012) and follicle (Luvoni et al., 2012) integrity after feline ovarian tissue vitrification, results are still suboptimal. Furthermore, the feline ovary is characterized by a typical high incidence of follicular atresia (Wood et al., 1997) and this might influence the sensitivity of the follicles to the vitrification process. For instance, recently we have shown that vitrification of cat ovarian tissue can be detrimental if performed in a medium containing phenol-red (Brito et al., 2016). Besides this, the choice of intra- and extracellular cryoprotectants plays a role in the proper preservation of the ovarian tissue.

Usually, vitrification is performed with a single (Brito et al., 2016) or a combination of two or more (Alves et al., 2012; Luvoni et al., 2012) intracellular cryoprotectants. In most of the vitrification studies on mammalian ovary, from human to mouse, it is routinely used sucrose as extracellular cryoprotectant (Fabbri et al., 2014; Youm et al., 2014). However, prominent results were obtained when human ovarian tissue was cryopreserved in the presence of the extra-cellular cryoprotectants trehalose or raffinose (Sanfilippo et al., 2015; Tian et al., 2015). All these cited sugars are used due their capacity to counteract osmotic shock during vitrification, to protect and stabilize cell membrane proteins, and to improve the ability of intracellular cryoprotectants to reach a vitreous state (Crowe et al., 1998; Crowe et al., 1996; Courbière et al., 2009; Vanderzwalmen et al., 2013), but not always sugars present equivalent success on the preservation of cell survival. Hence, determining a proper vitrification solution to be applied for feline ovarian tissue might improve the quality of the vitrified follicles after warming.

Tissue fibrosis is one of the signs of damage caused by hypoxia/oxidative stress (Scalercio et al., 2015), exposure to chemicals (Meirow et al., 2007), and by the cryopreservation process itself (Nisolle et al., 2000). To evaluate tissue fibrosis, a specific and simple collagen labelling using Picrosirius red staining can be applied

(Scalercio et al., 2015), where collagen at different thickness degrees are measured as means to detect a possible increase in tissue fibrosity (Lattouf et al., 2014).

During tissue exposure or vitrification, modulation of gene expression is often observed. For instance, membrane water channels proteins such as aquaporins 3 (AQP3) and 9 (AQP9) are modulated according to the composition of the vitrification solution as a response to osmotic stress (Sales et al., 2016). Therefore, it is expected that transporters will be also affected by vitrification procedures. Additionally, it is known that expression of multidrug resistance P-glycoprotein (Pgp), which gene is coded as multidrug resistance type I (MDR1/ABCB1) is modulated during folliculogenesis (Yokota et al., 2011). Similarly, the ABC transporter ABCG2, which encodes the protein BCRP1 (breast cancer resistance protein), is another multidrug resistance protein that prevents chemicals/drugs from penetrating tissues. This protein plays a major role protecting cells against toxins (Leslie et al., 2005). Maybe their expression could be affected during vitrification due to cryoprotectant exposure, being observed after warming during tissue culture. In previous studies, we have shown the deleterious effects of cooling and conventional cryopreservation on endoplasmic reticulum (ER) integrity (Silva et al., 2000; Oskam et al., 2010), as confirmed by ultrastructural analysis and up-regulation of the gene for the ER protein 29 (ERp29) (Brito et al., 2014). A marker for apoptoxis BAX was also added in this study due to the controversial findings indicating that vitrification either leads to apoptosis (Jafarabadi et al., 2005) or not (Abdollahi et al., 2013).

There are available different vitrification systems, which can be simply divided into open and closed systems. The solid-surface vitrification (SSV) method is an open system that allows the preservation of a high percentage of follicles (Santos et al., 2007), but allows the direct contact of the ovarian tissue with liquid nitrogen. The Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) is a closed-system, with promising results on the preservation of ovarian tissue from domestic animals (Carvalho et al., 2013). Although controversial, contamination of liquid nitrogen with microorganisms might be an issue. Hence, systems that avoid this direct contact may be useful.

Based on this, we aimed to evaluate the effect of different sugars (sucrose, trehalose and raffinose), intracellular cryoprotectants (ethylene glycol – EG, dimethyl sulfoxide - DMSO or EG + DMSO), and vitrification method (SSV vs OTC) on the follicular morphology, development (morphological and imunohistochemical analysis) and mRNA expression of markers for apoptosis, endoplasmic reticulum stress, as well as

water membrane- and ABC-transporters. Markers for cell proliferation were used to evaluate follicular development during culture.

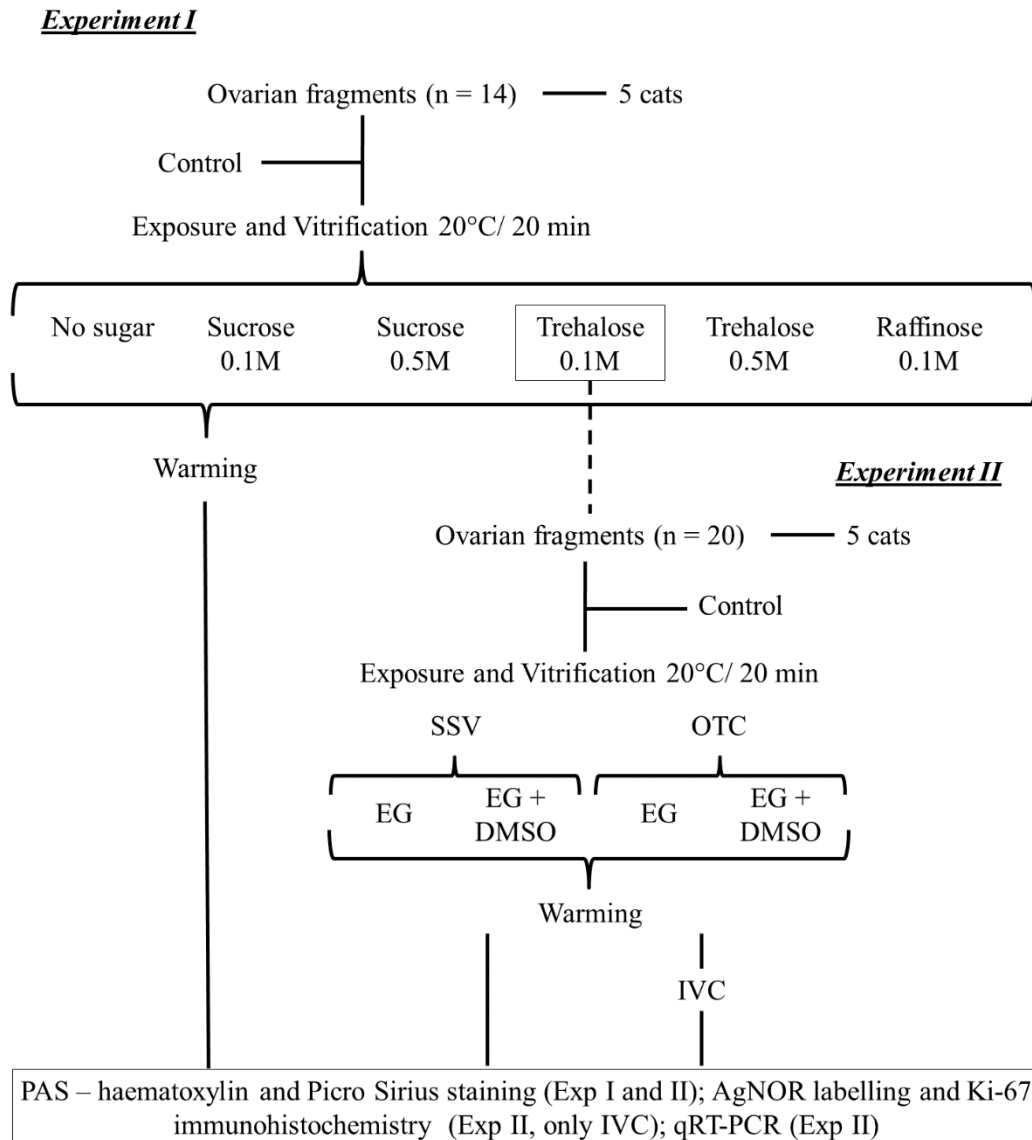
MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Unless stated otherwise, chemicals and media used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). For all of the media, the pH was adjusted to 7.4, at room temperature (~ 25 °C).

Source of ovaries

Ten adult queens, from 9 months - 3 years of age at random stages of the oestrus cycle, were subjected to ovariectomy (routine castration) at the Veterinary Hospital of the Federal University of Pará. None of the animals presented reproductive pathologies. The use of the removed ovaries and animal handling procedures during the surgical procedure were allowed by the owners of the animals. Collected ovaries were allocated into two experiments. For both experiments (Supplementary Figure 1), immediately after collection, each ovarian pair derived from the same queen was sliced into 2 mm³ pieces and randomly distributed in treatments according to each experiment as follows.



Supplementary Figure 1. Experimental design from experiments I and II.

Experiment I: Effect of sucrose, thehalose and raffinose on ovary vitrification

In experiment I, sugars were tested as extracellular cryoprotectants: sucrose (0.1 or 0.5 M), trehalose (0.1 or 0.5 M) and raffinose (0.1 M); raffinose was not tested at 0.5 M due to saturation in the medium. For this, each ovarian pair from five queens was divided into 14 fragments (2 mm³) and randomly distributed within the treatments. Two fragments were randomly selected as the fresh control and were fixed in Davidson solution for routine histology (PAS-haematoxylin) and tissue fibrosis (Picrosirius red staining) evaluation. The remaining fragments were exposed for 5 min at 20 °C to the different vitrification solutions prepared in phenol red-free RPMI-1640 as basis

medium, as follows: T1: 40% EG; T2: 40% EG + 0.1M sucrose; T3: 40% EG + 0.5M sucrose; T4: 40% EG + 0.1M trehalose; T5: 40% EG + 0.5M trehalose; T6: 40% EG + 0.1M raffinose; two fragments per treatment. None of the vitrification solutions were added with serum. After exposure, samples were vitrified applying the SSV method (Santos et al., 2007) and stored in liquid nitrogen for at least one week, after which samples were warmed up and prepared for routine histology and for fibrosis analysis.

Experiment II: Comparison between two vitrification solutions and methods – open and closed systems

In experiment II, two vitrification solutions (EG alone or combined with DMSO) and two methods were compared: solid-surface vitrification (SSV – open system) and ovarian tissue cryosystem (OTC – closed system). Each ovarian pair from five queens was divided into 20 fragments (2 mm³) and randomly distributed within the treatments. As controls (fresh and cultured *in vitro*), four fragments were randomly selected: one fragment was immediately fixed for routine histology (PAS-haematoxylin), fibrosis analysis, AgNOR labelling and for immunohistochemistry (Ki-67), and a second one was snap frozen and stored at - 80 °C for qRT-PCR. The other two fragments were cultured *in vitro* for seven days. The remaining 16 fragments were submitted to different vitrification protocols (SSV or OTC) following a two-step concept where the first exposure was performed for 4 min in a vitrification solution 1 (VS1) and the second one for 1 min in a VS2, as follows: T1 in SSV: VS1 (20% EG + 0.1 M trehalose) and VS2 (40% EG + 0.1 M trehalose); T2 in SSV: VS1 (10% EG + 10% DMSO + 0.1 M trehalose) and VS2 (20% EG + 20% DMSO + 0.1 M trehalose); T3 in OTC: VS1 (20% EG + 0.1 M trehalose) and VS2 (40% EG + 0.1 M trehalose); T4 in OTC: VS1 (10% EG + 10% DMSO + 0.1 M trehalose) and VS2 (20% EG + 20% DMSO + 0.1 M trehalose). Vitrification solutions were prepared in phenol red-free RPMI-1640 as basis medium and no serum was added to it. For each treatment, four ovarian fragments were vitrified. After warming, two fragments were immediately processed for routine histology (PAS-haematoxylin) and fibrosis analysis, as well as for qRT-PCR, while other two were cultured *in vitro* for seven days and subsequently processed for routine histology (PAS-haematoxylin), AgNOR labelling, Ki-67 and qRT-PCR.

Vitrification

Solid-surface vitrification (SSV)

Solid-surface vitrification as well as the protocol for incubating tissue in vitrification solutions, the dilution regimen to remove the cryoprotectants after warming, and the time and temperature of exposure were chosen based on studies previously described (Santos et al., 2007; Brito et al., 2016). In brief, vitrification solutions were prepared just prior to use. Each fragment was initially kept for 5 min at 20 °C in 1 mL of the vitrification solution (exp I), or submitted to a two-step (exp II) procedure (step 1 with 4 min and step 2 with 1 min exposure), after which fragments were placed on a cold surface consisting of a hollow cube of aluminium foil partially immersed in liquid nitrogen. The vitrified fragments were transferred into cryovials, by using nitrogen-cooled forceps, and stored in the liquid phase of a liquid nitrogen tank. Vitrified ovarian fragments were stored for one week in liquid nitrogen (- 196 °C). For warming, cryovials were exposed to room temperature (~ 25 °C) for 1 min and fragments separately submitted to cryoprotectant removal, followed by immersion in a water bath (37° C) for 30 sec. After warming, the cryoprotectants were removed by three-step washing solutions. For this, fragments were immersed in RPMI + 0.25 M tested sugar (3 min), (ii) RPMI + 0.125 M tested sugar (5 min), and (iii) RPMI (7 min).

Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)

The Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) is a closed system and it was used as previously described (Carvalho et al., 2013). Briefly, the fragments were exposed to two vitrification solutions as described in experiment II section. Both exposures were performed using the OTC. The vitrification solution was then removed and the OTC containing the ovarian tissue was closed and immediately immersed vertically into liquid nitrogen. After storage in liquid nitrogen (- 196 °C) for up to one week, OTCs containing the vitrified ovarian fragments were warmed in air at room temperature (RT ~25°C) for 1 min, followed by immersion in a water bath (37°C) for 30 sec. Similar to SSV procedure, after warming the cryoprotectants were removed by three-step washing solutions: RPMI + 0.25 M tested sugar (3 min), (ii) RPMI + 0.125 M tested sugar (5 min), and (iii) RPMI (7 min).

In vitro culture

Ovarian tissue was cultured *in vitro* in seven days, as previously described (Faustino et al., 2010). Briefly, ovarian fragments were separately transferred to a 24-well culture dish (Corning, NY, USA) containing 1 ml of culture medium. The culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2–7.4) supplemented with 1.25 mg/ml bovine serum albumin (MP Biomedicals, São Paulo, SP, Brazil), 10 ng/ml insulin; 2.5 μ g/ml transferrin and 4 ng/ml selenium, 100 μ g/ml penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 50 ng/ml bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) recombinant (NANOCORE Biotecnologia SA, Campinas, SP, Brazil), and 50 μ g/ml ascorbic acid. Fresh medium was prepared two hours before use and the culture medium was replaced every day. Ovarian tissues were cultured at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. The percentages of morphologically normal follicles was analysed. Furthermore, the development of ovarian preantral follicles, i.e. follicles that had no antrum, was evaluated based on the increase in the percentages of activated (a follicle containing an oocyte surrounded by one layer of flattened/cuboidal granulosa cells), primary (a follicle containing an oocyte surrounded by one layer cuboidal granulosa cells) and secondary (a follicle containing an oocyte surrounded by two or more cuboidal granulosa cells).

Histological analysis

After fixation in Davidson solution (routine histology) or formalin (immunohistochemistry), ovarian fragments were dehydrated in ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. Serial sections (5 μ m) of ovarian tissue were cut and every fifth section was mounted on glass slides and stained with haematoxylin-eosin. All sections were examined using a light microscope (Leica) at magnification of 200 \times . Preantral follicles were defined as follicles with an oocyte surrounded either by one flattened and/or cuboidal layer or several layers of only cuboidal granulosa cells. To avoid counting a follicle more than once, preantral follicles were counted only in the sections where their oocyte nucleolus was observed. Follicular quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte, the granulosa cells and the basement membrane (Lima et al. 2006). In brief, preantral follicles were classified as (i) histologically/morphologically normal when they contain an intact oocyte and intact granulosa cells, (ii) degenerated grade 1 when their oocyte nucleus has become pyknotic, and (iii) degenerated grade 2 when the oocyte is shrunken and its nucleus

pyknotic and, when possibly granulosa cells have detached from the basement membrane and have enlarged in volume.

Tissue fibrosis

To investigate the structure of ovarian tissue, relative areas of fibrosis were evaluated by Picrosirius red staining plus polarization microscopy. Fibrotic areas were characterized by rich collagen deposits. Picrosirius red is a strong anionic dye that attaches to collagen fibres and turns the tissue green, yellow, orange or red according to the thickness of the fibres (colors of collagen fibers in order of increasing thickness) (Rich and Whittaker, 2005). This classification was applied based on a recent study on Picrosirius analysis (Lattouf et al., 2014). When evaluated by light microscopy, collagen is stained red, while cytoplasm is stained in yellow. Under polarized light microscopy, it is possible to differentiate collagen fibers by different birefringent colors (Scalerio et al., 2015). In brief, collagen fibres were calculated as a percentage of the area of each image (expressed in pixels) and divided by colors: green, yellow, orange, or red. Collagen area calculation was performed automatically with the help of the image processing and analysis software Image J (National Institutes of Health, USA).

Ag-NOR labelling

To estimate the granulosa cell proliferation index, Ag-NOR staining was performed to quantify the number of argyrophilic nucleolar organizer regions (NOR), which present silver (Ag) affinity, per granulosa cell nuclei. For this purpose, ovarian tissue sections were reduced with 1% potassium iodide, and stained with 50% silver nitrate solution in a colloid solution (2:1) in a darkroom and counterstained with 0.1% safranin (Castro et al., 2014). For quantification, at least 300 granulosa cells from primary follicles and 600 granulosa cells from secondary follicles were evaluated in each treatment; at least 20 follicles were evaluated per treatment. Samples were visualized under a light microscope (x 1000), and the NOR of all the nuclei of visible granulosa cells were counted.

Immunohistochemistry

Samples were fixed in formalin as described above, and paraffin sections (5µm) were deparaffinised and rehydrated in alcohol series and processed for immunohistochemistry. After blocking endogenous peroxidase activity with 3%

H₂O₂ diluted in deionized water, a demasking step was performed for 5 min at 98°C with citrate buffer (pH 6.0), and the sections were subjected to an antigen retrieval step. Antigen retrieval steps, antibody dilutions and incubation conditions were performed as previously described (Scalercio et al. 2015). In brief, the slides were incubated overnight with mouse monoclonal Ki67 primary antibody (1:4000) at 4°C, and for 60 minutes at room temperature with goat anti-mouse secondary antibodies (1:500). Diaminobenzidine was used as a chromogen (SK4100; Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom). Haematoxylin was used for counterstaining, and rapid mounting medium (Entellan new; Merck) was applied to mount the slides. Negative controls consisted of the dilution solution without any primary antibody, while mice proliferative spleen cells were used as positive controls. Ki67 staining was used to verify the proliferating status of follicles and to ensure that follicles classified as primordial were indeed at resting stage. The total and Ki67 labelled percentages of primordial follicles and the total and labelled percentages of granulosa cells per developing follicles were counted in each study group.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) followed by PureLink™ RNA Mini Kit (Anbion®), according to instructions of the manufacturer. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (NanoDrop® 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). For each sample, the RNA concentrations were adjusted to 30 ng/ml and used to synthesize cDNA. The reverse transcription was performed with the SuperScript III RT-PCR kit (Invitrogen). The mixture was incubated at 42 °C for 1 h, subsequently at 80 °C for 5 min, and finally stored at -20 °C. The negative control was prepared under the same conditions, but without addition of the nucleic acid.

qRT-PCR was performed using a thermocycler (iQ5, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Primers (Table 1) derived from the *Felis catus* gene were designed using the Pick Primers designing tool from the National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI). A NCBI basic local alignment search tool (BLAST) ensured the specificity of primer sequences for sheep. The primers were tested on the efficiency by qPCR analysis of a dilution series of pooled cDNA at a temperature gradient (55–65°C) for primer-annealing and subsequent melting curve analysis. The reaction mixture for

the qPCR contained 0.5 μg cDNA in sterile water (7.4 μL), 10 μL iQSYBR Green Supermix (Bio Rad Laboratories Inc.), forward (0.8 μL) and reverse (0.8 μL) primers (final concentration of 0.4 pmol/ μL for each primer), and according to the manufacturer's instructions.

Data were analysed using the efficiency corrected Delta-Delta-Ct method (Pfaffl, 2001). The fold-change values of the target genes were normalized using the geometric average of the fold-change values of one reference gene: PGK1. Reactions of PCR amplification consisted of initial denaturation and polymerase activation for 15 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, 45 s at 72 °C, 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The extension was held for 10 min at 72 °C.

Statistical analysis

Percentages of morphologically normal follicles were compared among all study groups with Prism 4 software (GraphPad 6.04), using one-way ANOVA with Tukey as *post-hoc* test. Likewise, differences in mRNA expression (fold-change) and Picrosirius red staining intensity were compared by applying one-way ANOVA and Tukey as *post-hoc* test. To evaluate Ki67 immunostaining, the total and labelled numbers of primordial follicles and the total and labelled numbers of granulosa cells per primary and secondary follicles were counted in each study group. Similarly, percentage of AgNOR positive granulosa cells per follicular class were calculated in each study group and compared by applying one-way ANOVA and Tukey as *post-hoc* test. Data are presented as mean \pm standard error of means (SEM), and significant differences are indicated by *P* values (**P* < 0.05; ** *P* < 0.01; *** *P* < 0.001).

Table 1. Primers used for the quantification of genes of interest and housekeeping gene expression.

<i>Genes</i>	<i>Accession n^o.</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Product size (bp)</i>
PGK1	XM_004000665.3	AATCTGCCACAGAAGGCTGG	GTCTGCAACTTTAGCTCCGC	130
Bax	NM_001009282.1	AGCAGATCATGAAGACAGGGG	CTCAGCTTCTTGGTGGACGC	130
ERP29	XM_003994679.3	CCTAGGTATGCCTGGTTGCC	TTGCGAGATTGTCCTGTCCC	116
AQP3	XM_011288588.1	ATGAGCTTGTAAGTCTCGGGC	AGGGATGCTGTGCCAATGAA	115
AQP9	XM_003987104.3	AGCCTGGGAAAGGACGAAAG	GCCACATCCAAGGACGATCA	122
ABCG2	XM_006930975.2	ACTGTTAGCGCTCCTCCTCT	GGAGAGTTTCTGCCTTTTCGG	94
ABCB1	NM_001171064.2	AATGGCAAGGTCAAGGAGCA	CACAGTTCAGTAGCGCTTTGC	108

RESULTS

Experiment I

Trehalose improves survival rates of vitrified feline preantral follicles

A total of 1,299 preantral follicles were evaluated. Cryopreservation resulted in percentages of morphologically normal preantral follicles similar to control (62.9 ± 4.1) only when the vitrification medium was supplemented with 0.1 M (35.8 ± 8.3) or 0.5 M (33.4 ± 5.4) trehalose (Fig. 1).

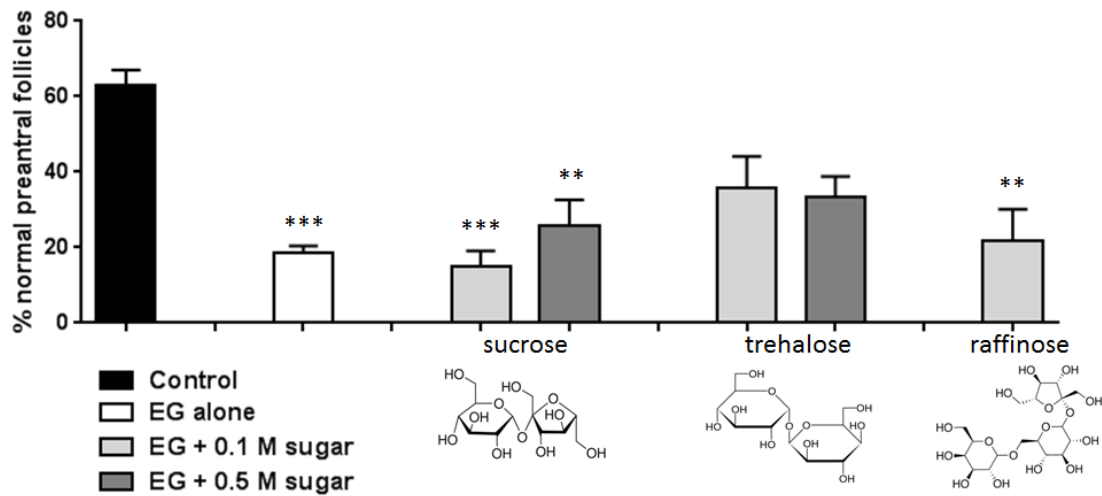


Fig 1. Mean (\pm SEM) percentages of morphologically normal preantral follicles after vitrification in the absence or presence of different extracellular cryoprotectants (sucrose, trehalose or raffinose). Significant differences from control are indicated as ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$. No differences were observed among the different sugars ($P > 0.05$).

Vitrification of tissue with EG alone or combined with sucrose or raffinose did not improve follicular survival, resulting in a significant decrease in the percentage of morphologically normal follicles when compared to control (Fig. 1). It is important to note that not only primordial follicles were well preserved, but also secondary ones, especially, when ovarian tissue was vitrified-warmed in the presence of trehalose (Fig. 2).

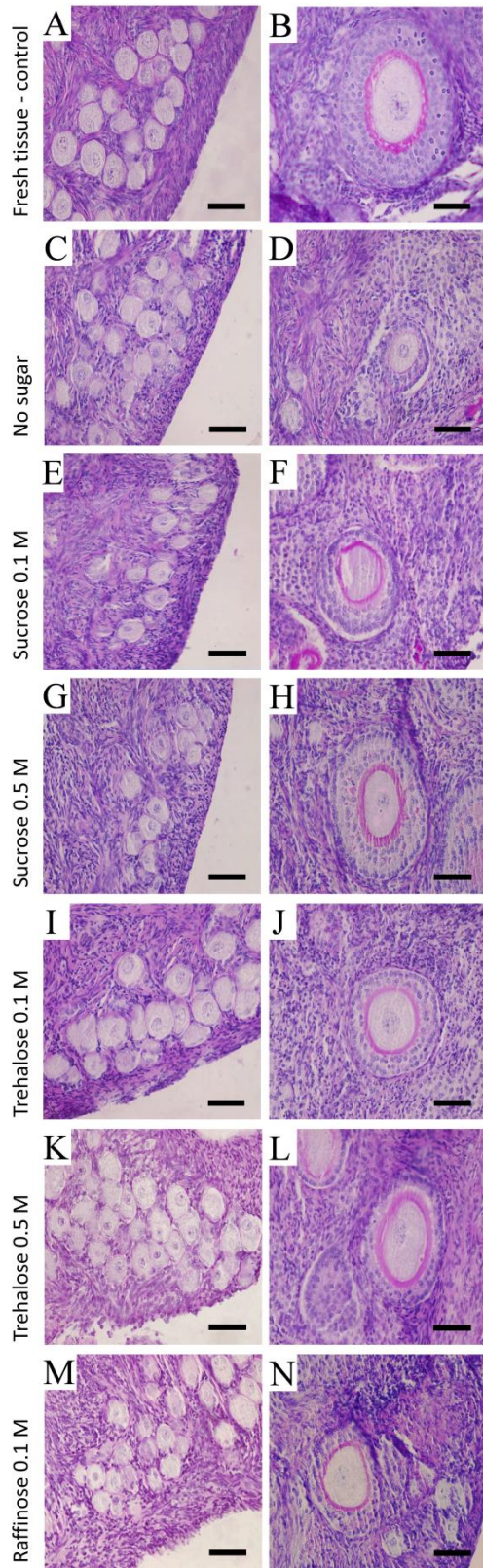


Fig 2. Representative images of feline ovarian tissue. Primordial (A, C, E, G, I, K, M) and secondary (B, D, F, H, J, L, N) follicles in fresh tissue (A, B) and in tissue vitrified without sugar (C, D), or in the presence of sucrose 0.1 M (E, F), sucrose 0.5 M (G, H), trehalose 0.1 M (I, J), trehalose 0.5 M (K, L), or raffinose 0.1 M (M, N). Staining: PAS-haematoxylin; Bars represent 50 μm.

Tissue fibrosis was estimated by measuring the fold change of collagen fibres area in the ovarian tissue. No difference among the treatments on the collagen thickness content was observed and data are presented as a whole. Tissue vitrified in the presence of trehalose presented a closely similar total collagen content when compared to control (~ 0.8-fold from control), with tissue vitrified without sugar or with sucrose 0.1 M presented greater collagen (~ 2-fold increase) (Fig. 3).

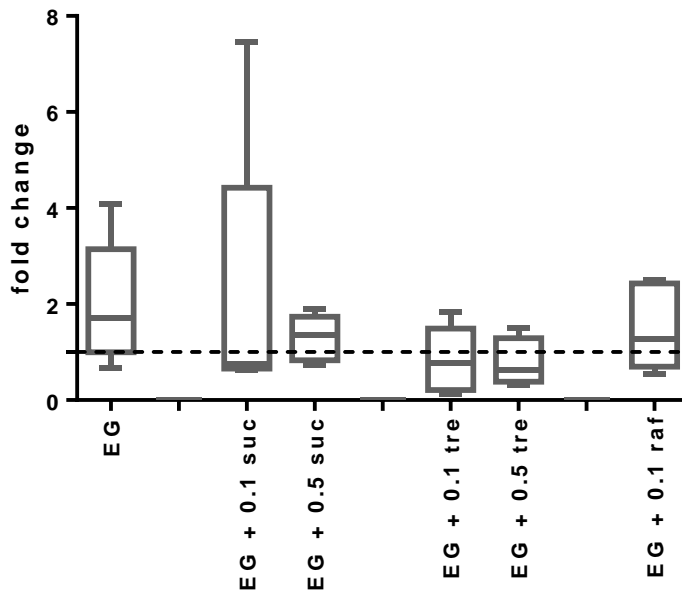


Fig 3. Fold-change in collagen area in feline ovarian tissue after vitrification in the presence of EG only, or with EG combined with sucrose (0.1 or 0.5 M), trehalose (0.1 or 0.5 M), or raffinose (0.5 M). Dashed line indicates the collagen area in control tissues, normalized as 1.

Experiment II

Vitrification of ovarian tissue with EG or EG + DMSO maintains follicular survival similar to control independently on the vitrification method, but impairs follicular morphology after *in vitro* culture

Vitrification of ovarian tissue did not affect the percentages of morphologically normal preantral follicles when compared with control. Although vitrification with OTC using EG alone presented the highest percentage of morphologically normal follicles (56%), no differences among treatments were observed (Fig. 4). *In vitro* culture of vitrified-warmed ovarian tissue resulted in a significant decrease in the percentages of morphologically normal preantral follicles, while fresh cultured tissue kept similar percentages when compared to control (Fig. 4).

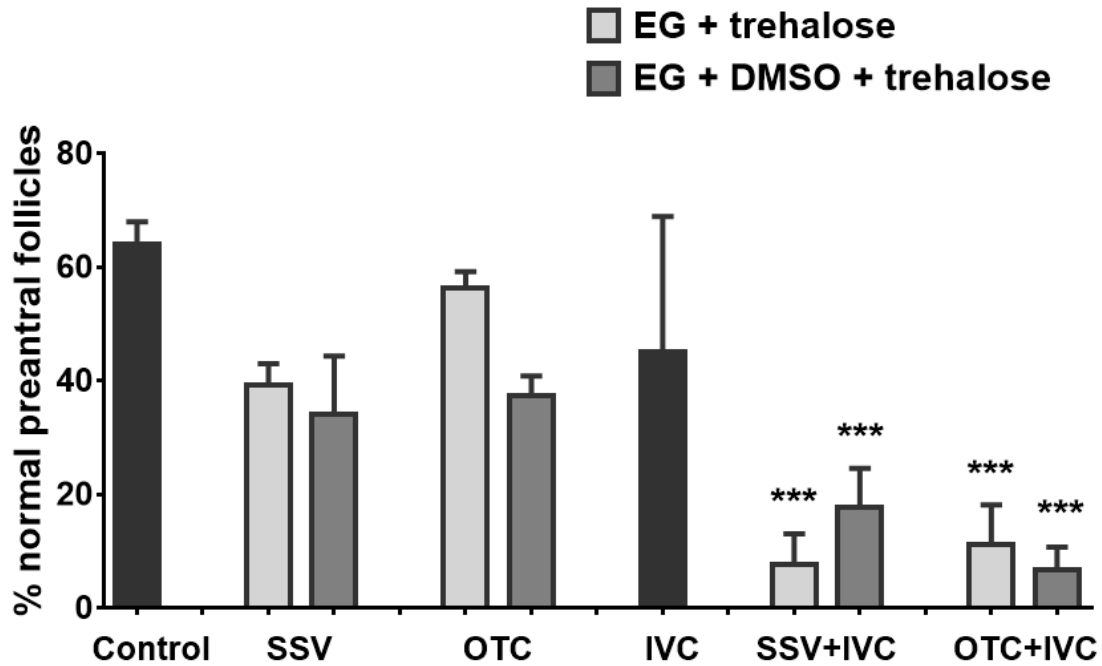


Fig 4. Mean (\pm SEM) percentages of morphologically normal preantral follicles in the control group, as well as after vitrification, followed or not by *in vitro* culture. Vitrification was performed in the presence of EG + trehalose or EG + DMSO + trehalose, using either SSV or OTC methods for both tested vitrification media. Significant differences from control are indicated; *** $P < 0.001$. No differences were observed among treatments.

Morphological analysis does not show follicular activation or development of fresh or vitrified-warmed ovarian tissue submitted to *in vitro* culture

Based on morphological analysis, before and after seven days *in vitro* culture all treatments presented a significant higher percentage of primordial follicles when compared with the percentages of developing ones. Although percentages of developing follicles were increased after *in vitro* culture, the percentages of these morphological changes evaluated with haematoxylin-eosin staining were not significantly different from control (Fig. 5).

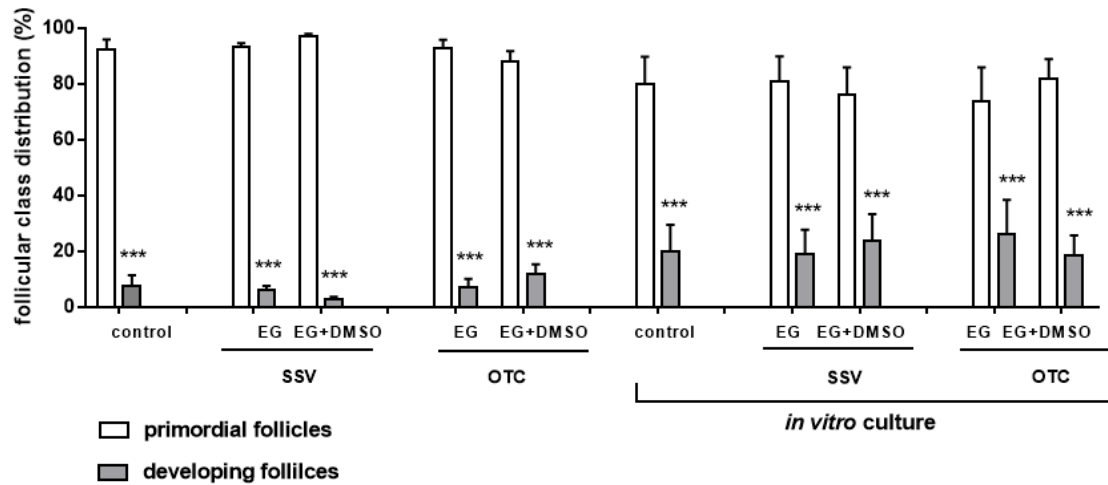


Fig 5. Mean (\pm SEM) percentages of primordial and developing follicles in control tissue, as well as after vitrification, followed or not by *in vitro* culture. Vitrification was performed in the presence of EG + trehalose or EG + DMSO + trehalose, using SSV or OTC methods. Significant differences between the percentages of primordial and developing follicles within each group are indicated; *** $P < 0.001$. No differences were observed among treatments.

The use of OTC device leads to a high activation of primordial follicles when compared to fresh tissue, but none of the treatments affect proliferation of developing follicles

Based on Ki67 labelling, it was observed that the percentages of activated follicles were significantly increased when comparing fresh *in vitro* cultured with control ovarian tissue. Although no difference on the percentage of activated follicles was observed between fresh tissue and SSV vitrified cultured tissue, all the vitrified ovarian fragments presented a significant increase in the rates of activated follicles when compared to control. When tissue was vitrified applying the OTC system, activation rate was significantly higher than that observed for fresh cultured tissue (IVC). All the cultured tissues, vitrified or not, presented significant higher percentages of developing follicles with proliferating granulosa cells when compared with fresh control.

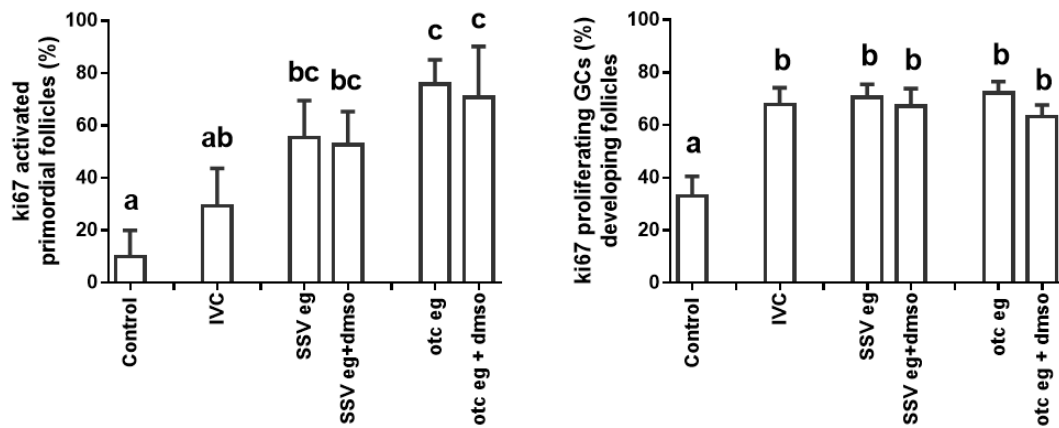


Fig 6. Mean (\pm SEM) percentages of activated primordial follicles and proliferating granulosa cells (GCs) per developing follicles based on Ki67 labelling. Different superscripts indicate significant differences; ** $P < 0.01$.

Proliferation of granulosa cells occurred in primary and not secondary follicles during in vitro culture

To further evaluate the proliferation potential of granulosa cells from primary and secondary follicles, AgNOR labelling was determined. Independently on the freshness of the tissue (non-vitrified vs vitrified), cryoprotectant solution and vitrification method, it was observed that, compared to control (1.5 ± 0.1), there was a significant increased number of NOR in granulosa cells from cultured fresh (2.1 ± 0.2) and vitrified (SSV EG: 2.3 ± 0.1 ; SSV EG DMSO: 2.3 ± 0.2 ; OTC EG: 2.1 ± 0.1 ; OTC EG DMSO: 2.2 ± 0.1) primary follicles. When secondary follicles were evaluated no differences were observed between cultured and fresh tissue (Fig. 7). Images of follicles labelled with Ki-67 or AGNor are depicted in Figure 8.

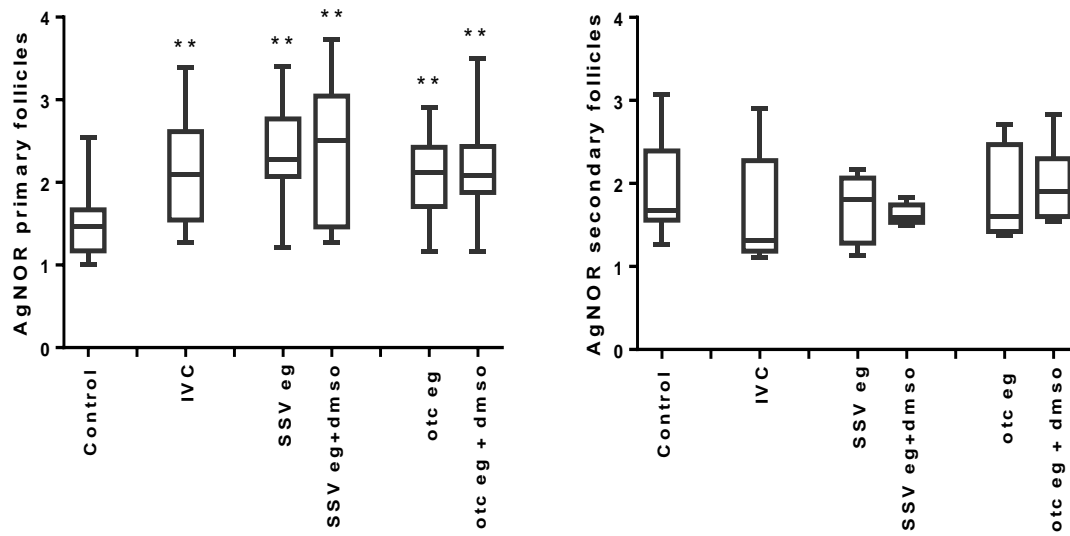


Fig 7. Boxplots with average (\pm SEM) number of development NORs per nucleus of granulosa cells from primary and secondary follicles in control tissue, as well as after seven days *in vitro* culture of tissue previously vitrified or not. Significant differences between the treatments and fresh control are indicated; ** $P < 0.01$. No differences were observed among treatments after *in vitro* culture.

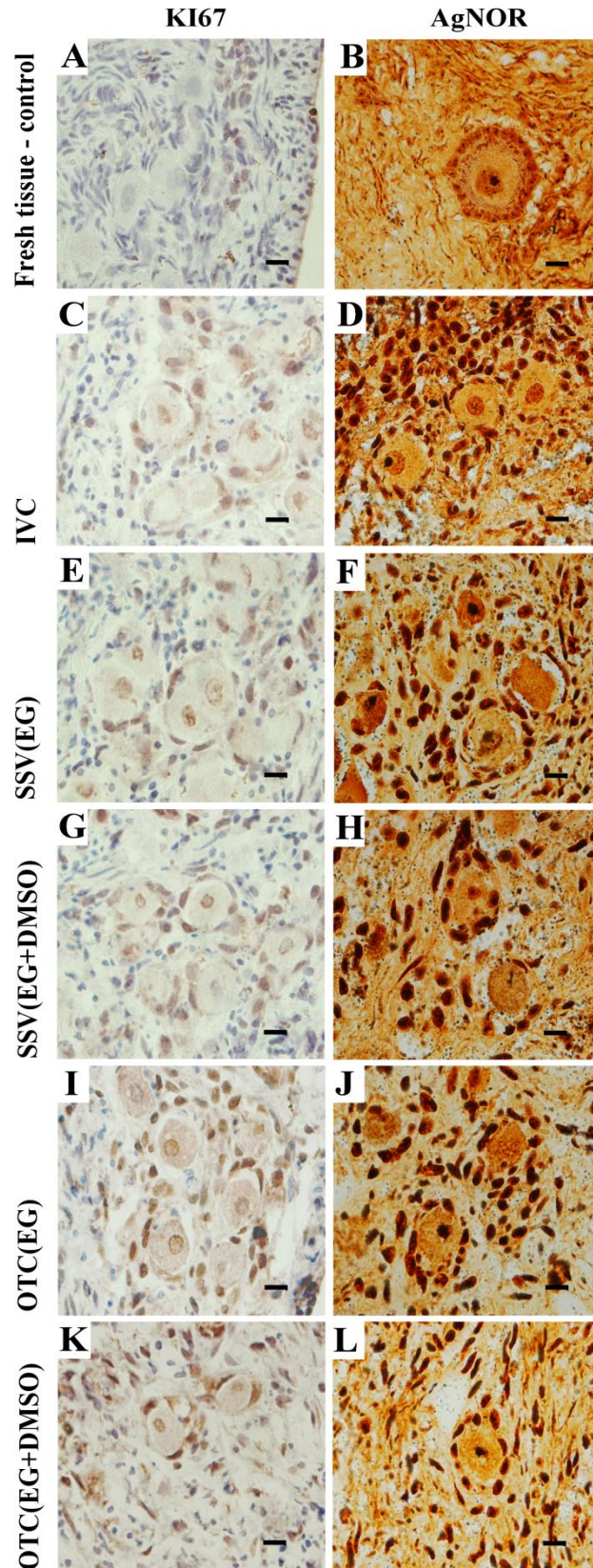


Fig 8. Representative images of ovarian tissue immunolabelled with Ki67 and AgNOR in all treatments. Bars: 10 μ m

In vitro culture leads to an increase in collagen fibers thickness

Tissue fibrosis was estimated again after vitrification and tissue *in vitro* culture (Fig. 9). No significant differences were found among treatments neither when they were compared with control fresh or *in vitro* cultured tissue, although it was observed an increased in collagen fibers thickness (green to orange) after *in vitro* culture (Fig. 10).

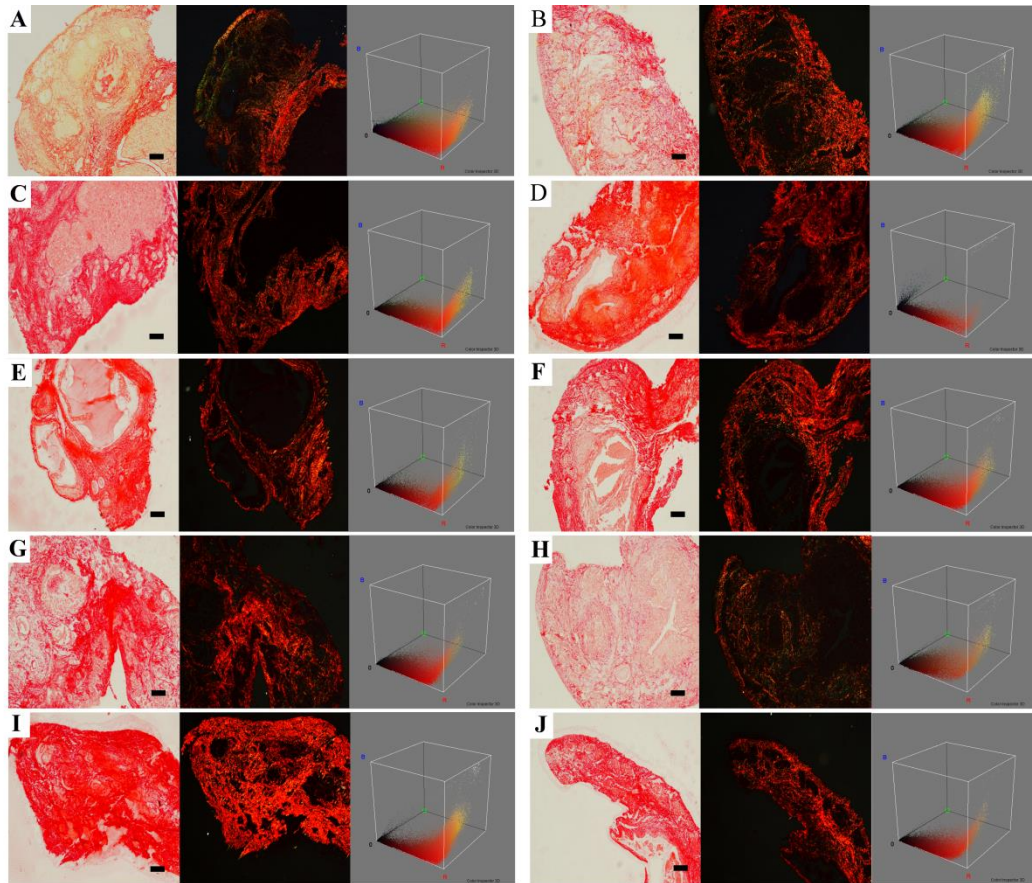


Fig 9. Representative images for control tissue (A) followed by *in vitro* culture (B), or submitted to vitrification applying SSV EG, SSV EG+DMSO, OTC EG, OTC EG+DMSO (C, D, E, F, respectively) followed by *in vitro* culture (G, H, I, J, respectively). Images were obtained under light microscopy (red staining), by birefringent polarization and after transformation of images by Image J. Scale bars: 100 μ m.

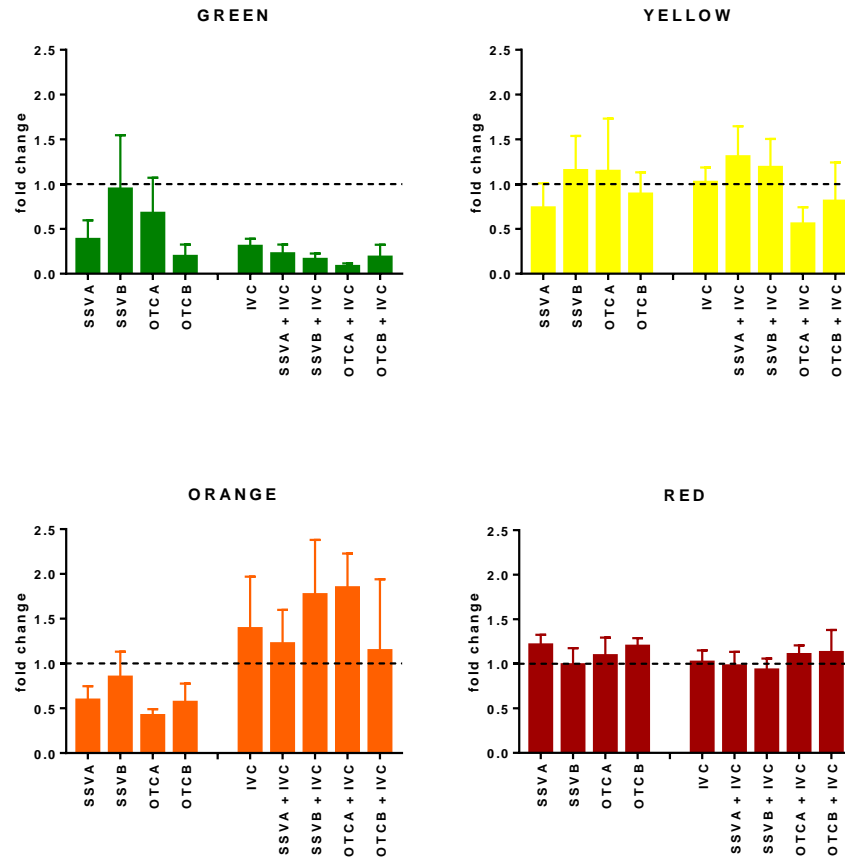


Fig 10. Mean collagen area by fibers thickness in the different studied groups. Degree of thickness ranged of less to more thick as green, yellow, orange, and red birefringence

Vitrification of ovarian tissue with EG as single intracellular cryoprotectant, specially when applying SSV method, leads to AQP9 down-regulation

The mRNA expression levels of six key genes are depicted in Figure 11. Immediately after vitrification and cryoprotectant removal, the relative mRNA expression was significantly downregulated for AQP3 (2.5 fold; $P < 0.05$), AQP9 (3.5 fold; $P < 0.05$), and ABCB1 (2.5 fold; $P < 0.01$), only when applying the SSV method and when EG was used as single intracellular cryoprotectant.

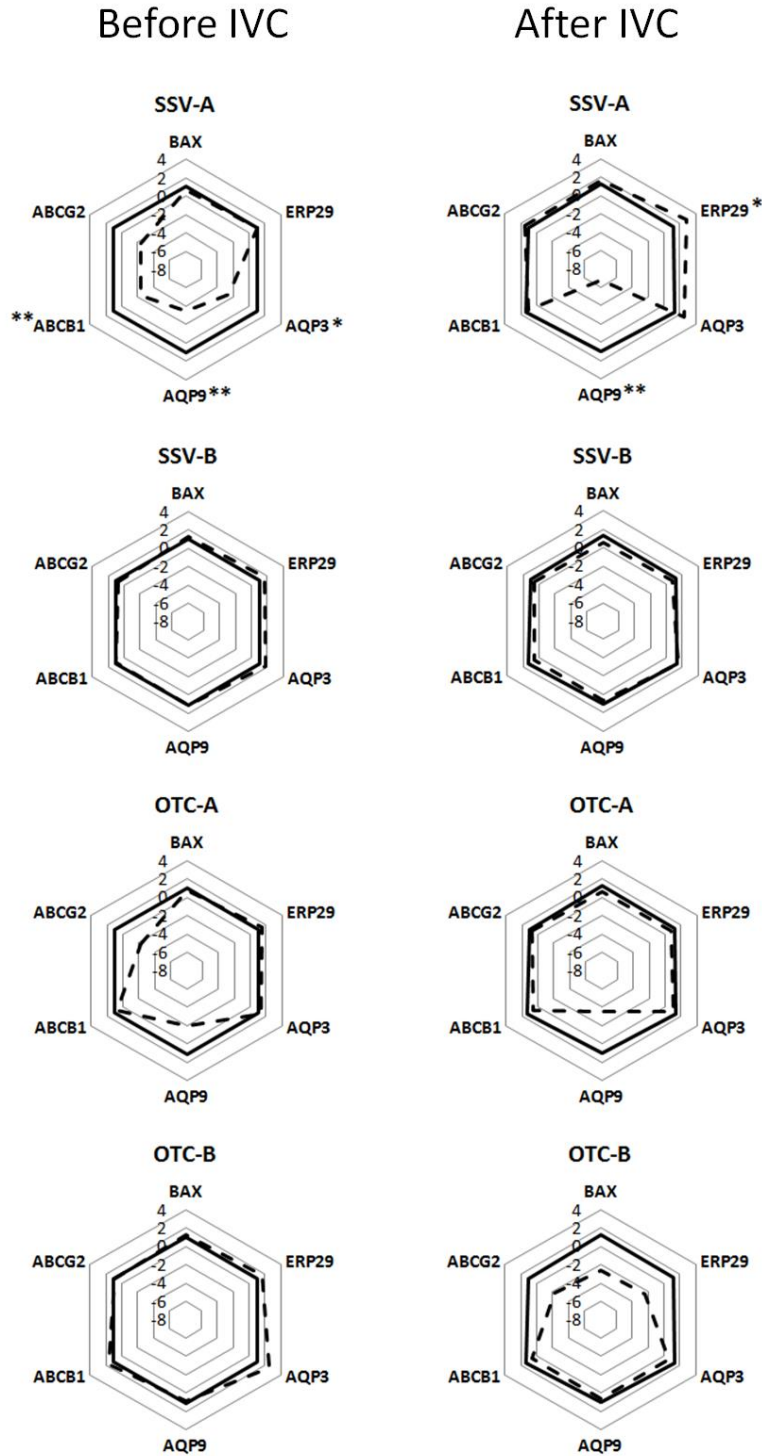


Fig 11. Mean mRNA expression levels of markers of apoptosis (BAX), Endoplasmic Reticulum stress (ERP29), aquaporins (AQP3 and AQP9), and ATP-binding cassette transporters (ABCB1 and ABCG2) immediately after vitrification or after vitrification followed by ovarian tissue in vitro culture. Control is represented by a solid line and treatments by a dashed line. Data are presented as fold change calculated in reference of control values set as 1. Significant differences between treatment and control are represented by * ($P < 0.05$) or ** ($P < 0.01$).

No statistically significant effect on gene expression was observed for the other tested groups. Similarly, after vitrification, when vitrified tissue was *in vitro* cultured, only those submitted to SSV method with EG as single intracellular cryoprotectant presented significant changes in gene expression. For this treatment, an up-regulation of ERP29 (2.5 fold; $P < 0.05$) was observed, together with the down-regulation of AQP9 (6.7 fold; $P < 0.01$). Expression of AQP3 returned to control levels.

DISCUSSION

In the present study we showed the importance of extracellular sugars, the influence of the combination of two intracellular cryoprotectants on the follicular survival and molecular stability, and the huge follicular activation after *in vitro* culture of vitrified ovarian tissue.

By screening three different extracellular cryoprotectants, it was clear the importance of vitrification medium supplementation with trehalose, which was more efficient than sucrose or raffinose on the protection of follicular morphology. Vitrification medium containing raffinose was able to keep human follicular morphology similar to control levels (Sanfilippo et al., 2015). However, we must bear in mind that intracellular cryoprotectants and vitrification protocol also influences follicular survival and the study did not compare raffinose with other sugar. Although sucrose is the most commonly used sugar in cryopreservation protocols, it was recently shown that trehalose preserves a larger number of human primordial follicles than sucrose during vitrification (Tian et al., 2015). Trehalose acts as an antifreezing agent found in some insect species (Vanin et al., 2008) and improves chemical and physical stress tolerance in plants (Mostofa et al., 2015). Regarding cryopreservation, different trehalose mechanisms were proposed, like those that trehalose forms a protective film to stabilize cell structure (Crowe et al., 1992), helps biomolecules to maintain a glassy spatial structure (Timasheff, 1993; Paolantoni et al., 2009), instead of interact directly with a protein, trehalose binds water molecules around protein surface (Sola-Pena and Meyer-Fernandes, 1998; Lupi et al., 2012), or by its ability to counteract osmotic stress, hypoxia (Chen and Haddad, 2004), as well as oxidative stress (Hu et al., 2010; Zhang et al., 2015). All these factors might explain the observed trend of trehalose treated tissue presenting the most similar collagen patterns when compared to control fresh tissue. Collagen is an important element of the extracellular matrix involved in maintenance of the normal spatial structure of the ovarian tissue and, consequently, plays an important role on tissue integrity and cell-cell interactions (Lind et al., 2006; Woodruff & Shea 2007). However, the present study showed that collagen patterns were not affected by the vitrification procedure,

and a tendency on tissue collagen thickening was observed after *in vitro* culture, which can be related to tissue damage.

As far as we know, when performed in the presence of an extracellular cryoprotectant, cryopreservation medium for feline ovarian tissue always contains sucrose (Lima et al., 2006; Tanpradit et al., 2015). Hence, it is not possible to compare our data with trehalose with other studies in feline. Furthermore, EG has been the intracellular cryoprotectant of choice alone (Lima et al., 2006; Wiedemann et al., 2012; 2013), or in combination with DMSO (Alves et al., 2012; Luvoni et al., 2012; Tanpradit et al., 2015).

Independently on the vitrification method and vitrification solutions tested herein, follicular morphology was maintained similar to control immediately after warming. After culture, follicular loss was observed in all vitrified-thawed fragments. This shows that no obvious differences could be found when comparing both vitrification methods. This data appears very promising once a closed system was as efficient as an open one. It was shown before that both methods, SSV and OTC, have similar success in the preservation of the morphology of vitrified ovine ovarian follicles (Bandeira et al., 2015). Much is discussed about the risks of tissue contamination during cryopreservation if in direct contact with liquid nitrogen. Although it was recently reported that no bacterial and fungal cross-contamination could be caused by the vitrification method (open or closed), microorganisms can survive in liquid nitrogen (Molina et al., 2016). Therefore, this direct contact remains a risk.

Not always morphological analysis is sufficient to evaluate follicular activation and cell proliferation. Based on morphologic analysis in the present study, after seven days *in vitro* culture of vitrified-warmed ovarian fragments, the percentages of developing follicles were similar for all treatments, as well as similar to freshly *in vitro* cultured tissue. However, this was not confirmed by Ki67 labelling. All the vitrified fragments submitted to *in vitro* culture presented a higher rate of follicular activation if compared with control, On the other hand, no follicular activation was observed after analysis of the cultured fresh tissue, which presented activation rates similar to control. Furthermore, when tissue was vitrified with the OTC device, this activation was even higher than that observed to freshly cultured tissue. Follicular loss can occur via apoptosis or massive activation. No changes in BAX mRNA expression were observed in the present study. Although this cannot exclude other apoptosis pathway, it still corroborates with the hypothesis that vitrification brings the risks of follicular massive activation after culture. Such a follicular activation is often related to transplanted ovarian tissue due to hypoxia/revascularization stress (Santos et al., 2009; Scalercio et al., 2015). Although this overactivation can be also caused by exposure to chemicals such as alkylating agents (Kalich-

Philosoph et al., 2013), it is not possible to make a direct connection between cryoprotectant and follicular overactivation once this effect was also dependent on the vitrification device. Follicular activation is regulated by surrounding somatic cells (primordial follicle granulosa cells – pfGCs). Differentiation of pfGCs to granulosa cells (activation) is prevented by the mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1), a kinase that plays a role on cell response to growth factors and nutrients functioning as a modulator of protein synthesis and autophagy (Laplante and Sabatini, 2012). An overexpression of mTORC1 will result in an excessive activation of primordial follicles (Ahikari et al., 2010), and their premature activation (Zhang et al., 2014). Probably, vitrification leads to an irregular transcription of mTORC1, or *in vitro* culture of vitrified ovarian tissue requires a specific protocol to counteract extra stress and follicular overactivation. No differences on the rates of granulosa cells proliferation in developing follicles were observed among treatments, confirming that this negative effect was specific for primordial follicles.

Although the deleterious effects from vitrification can be linked to apoptosis (Mazoochi et al., 2009), in the present study no changes in BAX expression was observed, similarly to findings from Abdollahi et al. (2013). Remarkably, mRNA expression modulation was observed only in ovarian tissue vitrified with the SSV method, applying EG as single intracellular cryoprotectant. It was shown before that caprine ovarian tissue vitrified in the presence of EG only presented a down-regulation of AQPs, probably due to an inefficient *in vitro* culture system or as an alternative to counteract osmotic stress (Sales et al., 2016).

CONCLUSION

Vitrification of feline ovarian tissue can be optimized by using a combination of trehalose (extracellular cryoprotectant) with EG combined or not with DMSO (intracellular cryoprotectants). A closed system will not decrease the rates of follicular survival when compared with an open one, but a specific protocol for *in vitro* culture is needed to avoid undesirable massive follicular activation.

ACKNOWLEDGEMENTS

DCB is a recipient of a grant from CAPES (Brazil) and this project was granted by CNPq

REFERENCES

- Abdollahi M, Salehnia M, Salehpour S, Ghorbanmehr N (2013) Human ovarian tissue vitrification/warming has minor effect on the expression of apoptosis-related genes. *Iran Biomed J.* 17(4):179-86.
- Ahikari C, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ, Liu K. (2010) Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum. Mol. Genet.* 19:397-410.
- Alves AE, Kozel AC, Luvoni GC (2012) Vitrification with DAP 213 and Cryotop of Ex Situ and In Situ Feline Cumulus–Oocyte Complexes. *Reprod Domest Anim.* 47:1003-1008.
- Bandeira F T, Carvalho A A, Castro S V, Lima L F, Viana D A, Evangelista J S, Pereira M J, Campello C C, Figueiredo J R, Rodrigues A P (2015) Two methods of vitrification followed by in vitro culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. *Reprod Domest Anim.* 50(2):177-85.
- Brito D C, Brito A B, Scalercio S R, Percario S, Miranda M S, Rocha R M, Diniz J A, Oskam I C, Van den Hurk R, Paris M C, Domingues S F, Santos R R (2014) Vitamin E-analog trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus paella*). *Cell Tissue Res.* 255(2):471-80.
- Brito D C, Domingues S F, Silva J K, Wu X, Santos R R, Pieczarka J C. (2016) Detrimental Effect of Phenol Red on the Vitrification of Cat (*Felis catus*) Ovarian Tissue. *Biopreserv Biobank.* 14(1):17-22.
- Carvalho A A, Faustino L R, Silva C M, Castro S V, Lopes C A, Santos R R, Bao S N, Figueiredo J R, Rodrigues A P (2013) Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: ovarian tissue cryosystem (OTC). *Anim Reprod Sci.* 138(3-4):220-7.
- Castro S V, Carvalho A A, Silva C M, Santos F W, Campello C C, Figueiredo J R, Rodrigues A P (2014) Frozen and Fresh Ovarian Tissue Require Different Culture Media to Promote in Vitro Development of Bovine Preantral Follicles. *Biopreservation and Biobanking.* 12, 5.
- Chen Q, Haddad G (2004) Role of trehalose phosphate synthase and trehalose During hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol.* 207: 3125–3129.
- Courbière B, Baudot A, Mazoyer C, Salle B, Lornage J (2009) Vitrification: a future technique for ovarian cryopreservation? Physical basis of cryobiology, advantages and limits. *GynecolObstetFertil.* 37(10):803–13.
- Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol.* 54:579-99.

- Crowe, L M, Reid D S, Crowe J H (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71:2087–2093.
- Crowe, J H, Carpenter J F, Crowe L M (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 6:73–103.
- Fabbri R, Vicent R, Macciocca M, Pasquinelli G, Paradisi R, Battaglia C, Martino N A, Venturoli S. (2014) Good Preservation of Stromal Cells and No Apoptosis in Human Ovarian Tissue after Vitrification. *Biomed Res Int.* 2014:673537.
- Faustino LR, Santos RR, Silva CM, Pinto LC, Celestino JJ, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues AP (2010) Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Anim Reprod Sci.*122(1-2):90-7.
- Hu J H, Zan L S, Zhao X L, Li Q W, Jiang Z L, Li Y K, Li X (2010) Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen thawed bovine semen. *J. Anim. Sci.* 88: 1657–1662.
- Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, Wolf I, Kanety H, Sredi B, Meirow D. (2013) Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci. Transl. Med.* 5:185ra62.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149:274-293.
- Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S (2014) Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 62:751-758.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204:216237.
- Lima A K, Silva A R, Santos R R, Sales D M, Evangelista A F, Figueiredo J R, Silva L D (2006) Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology.* 6(6-7):1664-6.
- Lind A K, Weijdegård B, Dahm-Kähler P, Mölne J, Sundfeldt K, Brännström M. (2006) Collagens in the human ovary and their changes in the perifollicular stroma during ovulation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 85(12):1476-84.
- Lunardi F, Araújo V, Faustino L, Carvalho A, Gonçalves R, Bass C, Bão S, Nameb K, Campello C, Figueiredo J, Rodrigues A (2012) Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Small Rumin Res.* 107, 121–130.

- Lupi L, Comez L, Paolantoni M, Fioretto D, Ladanyi B M (2012) Dynamics of biological water: Insights from molecular modeling of light scattering in aqueous trehalose solutions. *J. Phys. Chem. B* 116, 7499–7508.
- Luvoni G, Tessaro I, Apparício M, Ruggeri E, Luciano A, Modina S (2012) Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reprod Domest Anim.* 47(3):385-91.
- Mazoochi T, Salehnia M, Pourbeiranvand S, Forouzandeh M, Mowla S J, Hajizadeh E (2009) Analysis of apoptosis and expression of genes related to apoptosis in cultures of follicles derived from vitrified and non-vitrified ovaries. *Mol Hum Reprod.* 15(3):155-64.
- Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, Raanani H, Levron J, Fridman E. (2007) Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human oocytes exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod* 22(6):1626-33.
- Molina I, Mari M, Martinez JV, Novella-Maestre E, Pellicer N, Peman J. (2016) Bacterial and fungal contamination risks in human oocyte and embryo cryopreservation: open versus closed vitrification systems. *Fertil. Steril.* Epub ahead of print
- Mostofa M G, Hossain M A, Fujita M, Tran L S (2015) Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Sci Rep* 5:11433.
- Nisolle M., Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J. (2000). Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen–thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil. Steril.* 74:122–129.
- Oskam IC, Asadi B A, Santos R R (2010) Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. *Fertil Steril.* 93(8):2764-6.
- Pfaffl M W (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1;29(9):e45.
- Paolantoni M, Comez L, Gallina ME, Sassi P, Scarponi F, Fioretto D, Morresi A (2009) Light scattering spectra of water in trehalose aqueous solutions: evidence for two different solvent relaxation processes. *J Phys Chem B.* 4;113(22):7874-8.
- Rich L, Whittaker P (2005) Collagen and Picrosirius Red staining: A polarized Light Assessment of Fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J MorpholSci.* 22(2):97-104.
- Sales A D, Duarte A B, Santos R R, Alves K A, Lima L F, Rodrigues G Q, Brito I R, Lobo C H, Bruno J B, Locatelli Y, Figueiredo J R, Rodrigues A P. (2016) Modulation of aquaporins 3 and 9 after exposure of ovine ovarian tissue to cryoprotectants followed by in vitro culture. *Cell Tissue Res.* (Epub ahead of print)

- Sanfilippo S, Canis M, Smitz J, Sion B, Darcha C, Janny L, Brugnion F (2015) Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod Biol Endocrinol.* 25;13:67.
- Santos R, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo J, Silva J, Van den Hurk R, (2007) Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res.* 327, 167–176.
- Santos R R, Knijn H M, Vos P L, Oei C H, van Loon T, Colenbrander B, Gadella BM, van den Hurk R, Roelen BA (2009) Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertility and Sterility.* 91(4): 1455-1458.
- Santos R R, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B (2010) Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science.* 122(3-4): 151-163.
- Scalercio S R, Amorim C A, Brito D C, Percario S, Oskam I C, Domingues S F, Santos R R (2015) Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reprod Fertil Dev.* (epub ahead of print)
- Silva JR, Lucci CM, Carvalho FC, Bao SN, Costa SH, Santos RR, Figueiredo JR (2000) Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat PF preserved in vitro. *Theriogenology* 54:809–22.
- Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR (1998) Stabilization against thermal inactivation Promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch Biochem Biophys.* 1:10–14.
- Tanpradit N, Comizzoli P, Srisuwatanasagul S, Chatdarong K (2015) Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. *Theriogenology.* 83(9):1553-61.
- Tian T, Zhao G, Han D, Zhu K, Chen D, Zhang Z, Wei Z, Cao Y, Zhou P (2015) Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviors of human ovarian tissues: sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. *Hum Reprod.* 30(4):877-83.
- Timasheff S N (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22:67–97.
- Vanderzwalmen P, Connan D, Grobet L, Wirleitner B, Remy B, Vanderzwalmen S, Zech N, Ectors FJ (2013) Lower intracellular concentration of cryoprotectants after vitrification than after

slow freezing despite exposure to higher concentration of cryoprotectant solutions. *Hum Reprod.* 28(8):2101-10. Epub 2013 Apr 16.

Vanin S, Bubacco L, Beltramini M (2008) Seasonal variation of trehalose and glycerol concentrations in winter snow-active insects. *Cryo Letters* 29(6):485-91.

Wiedemann C, Hribal R, Ringleb J, Bertelsen MF, Rasmusen K, Andersen CY, Kristensen SG, Jewgenow K (2012) Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reprod Domest Anim.* 47, 6:300-4.

Wiedemann C, Zahmel J, Jewgenow K (2013) Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Vet Res.* 22;9:37.

Wood T C, Montali R J, Wildt D E (1997) Follicle/oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Develop.* 46:190-200.

Woodruff T K, Shea L D (2007) The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod Sci.* 14(8):6–10.

Yokota K, Hirano T, Urata N, Yamauchi N, Hattori M A (2011) Upregulation of P-glycoprotein activity in porcine oocytes and granulosa cells during in vitro maturation. *J Reprod Dev.* 57(3):322-6.

Youm H, Lee J, Lee J, Jee B, Suh C, Kim S (2014) Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Hum Reprod.* 29:720–30.

Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y, Bosbach B, Brannstrom M, Liu K. (2014) Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr. Biol.* 24:2501-2508.

Zhang X G, Wang Y H, Han C, Hu S, Wang L Q, Hu J H (2015) Effects of trehalose supplementation on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine calf testicular tissue. *Cryobiology.* 70(3):246-52.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas diferentes fases experimentais nesta tese permitiram concluir que:

- ✓ Tecido ovariano felino pode ser melhor vitrificado em solução livre de vermelho fenol;
- ✓ A vitrificação de tecido ovariano pode ser otimizada usando uma combinação de trealose (crioprotetor extracelular), com EG combinado ou não com DMSO (crioprotetores intracelulares);
- ✓ O OTC não diminui as taxas de sobrevivência folicular quando comparado com o SSV;
- ✓ Um protocolo específico de CIV para tecido ovariano vitrificado é necessário para evitar a ativação folicular em massa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GHANI, M.A. et al. Effect of graft site and gonadotrophin treatment on follicular development of canine ovarian grafts transplanted to NOD-SCID mice. **Reproduction Medicine Biology**. 10: 259–266, 2011.

AERTS, J.M. et al. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. **Fertility and sterility**. 94(2): 708-714, 2010.

AGARWAL, A.; SALEH, R.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility And Sterility, Birmingham**. 79: 829-843, 2003.

ALBERTI, L.R. et al. Avaliação morfofuncional do auto-implante ovariano no retroperitônio. **Medicina Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, SP, v. 35, p. 30-35, 2002.

ALBERTINI, R.; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**. 30(3): 181-188, 1999.

ALI, J.; SHELTON, J.N. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98: 459–465, 1993.

ALMEIDA, A.P. et al. Gene Expression and Immunolocalization of Fibroblast Growth Factor 2 in the Ovary and Its Effect on the In vitro Culture of Caprine Preantral Ovarian Follicles. **Reprod Domest Anim**. 47: 20-25, 2012.

ALVES, E.A. et al. In vitro Survival of Follicles Collected from Domestic Cats' Ovaries at Different Stages of Oestrous Cycle and Cultured with IGF-1. **Reprod Dom Anim**. 47 (6): 109–112, 2012.

AMORIM, A.C. et al. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *HUM REPROD*. 28(8): 2146-2156, 2013.

ANDERSEN, C.Y. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**. 23(10): 2266–2272, 2008.

APPT, S.E. et al. Serum anti-Muüllerian hormone predicts ovarian reserve in a monkey model. *Menopause*.16(3): 597-601, 2009.

ARAT, S. et al. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. **Reproduction, Fertility and Development**. 23(8): 1012-1023, 2011.

ARAV, A. et al. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187, 2002.

ASSELIN, E. et al. Mammalian Follicular Development and Atresia: Role of Apoptosis. **Biological Signals and Receptors**. 9: 87–95, 2000.

AUBARD, H. et al. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.** 79, 83-87, (1998).

AUBARD, Y. et al. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen–thawed ovarian cortex in sheep. **Human Reproduction.** 14: 2149–2154, 1999.

ÁVILA-PORTILLO, L.M. et al. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.** 57(4): 291-300, 2006.

BAKER, S.J.; SPEARS, N. The role intra-ovarian interactions in the regulation of follicles dominance. **Human Reprod Update.** 5 (2): 153-165, 1999.

BALABAN, B. et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. **Human Reproduction.** 23(9): 1976-82, 2008.

BANDEIRA, F. et al. Two Methods of Vitrification Followed by In Vitro Culture of the Ovine Ovary: Evaluation of the Follicular Development and Ovarian Extracellular Matrix. **Reprod Domest Anim.** 26, 2014.

BANERJEE, R. Liposomes: applications in medicine. **J. Biomater. Appl.** 16: 3–21, 2001.

BARBONI, B. et al. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. **Biol. Reprod.** 63: 858–864, 2000.

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1237: 77-85, 1995.

BEAUMONT, H.M.; MANDL, A.M. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the fetal and neonatal rat. **Proc R Soc London.** 155: 557-579, 1961.

BEN-HAROUSH, A.R. et al. Expression of basic fibroblastic growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. **Fértil Steril.** 84: 1257-1268, 2005.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol Reprod Dev.** 67: 162-171, 2004.

BEZERRA, M.B. Folículos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo in vitro e xenotransplante. 2010. **Tese (Doutorado).** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal – São Paulo. Brasil, 2010.

BIRON-SHENTAL, T. et al. Survival of frozen–thawed human ovarian fetal follicles in long-term organ culture. **Fertil Steril.** 81:716–9, 2004.

BISKIND, G.R.; KORDAN, B; BISKIND, M.S. Ovary transplanted to spleen in rats: the effect of unilateral castration, pregnancy and subsequent castration. **Cancer Res.**, 10, 309–318, 1950.

- BORDES, A. et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Hum. Reprod.** 20, 2745–2748, 2005.
- BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology.** 61(2–3): 581–594, 2004.
- BRASILEIRO FILHO, G. et al. Bogliolo patologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 220 p, 1993.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology.** 66: 5–13, 2006.
- BIRON-SHENTAL T. et al. Survival of frozen-thawed human ovarian fetal follicles in long-term organ culture. *Fertil. Steril.* 81, 716-719, 2004.
- BRITO, D.C. et al. Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). **Cell Tissue Res.** 355(2): 471-80, 2014.
- BRUNO, J.B. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development.** 21: 679–687, 2009.
- BUKOVSKY, A. et al. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reprod Biol Endocrinol.** 2:20, 2004.
- BYSKOV, A.G.; LINTERN-MOORE, S. Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. **J Anat.** 116: 207–17, 1973.
- BYSKOV, A.G. Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? **Nature.** 252:396–7, 1974.
- BYSKOV, A.G. The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. **J Reprod Fertil.** 45: 201–9, 1975.
- CAI, X. et al. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. **Hum. Reprod.** 20: 1969–1974. 2005.
- CALDWELL, B. V.; PAWLING, R. S.; Wright, P. A. Re-establishment of ovarian periodicity after transplantation to the Syrian hamster cheek pouch. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.** 123, 551, 1966.
- CALLEJO, J. et al. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarin tissue. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, Md., US, v. 86, p. 4489-94, 2001.
- CALLEJO, J. et al. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: long-term evaluation of effects on ovarian structure and function. **Fertil Steril.** 77:396–402, 2002.

- CAMARGO, L.S.A. et al. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**. 63: 256–262, 2011.
- CAMPBELL, B. K. et al. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol**. 163:137–139, 2000.
- CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAN, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**. 9: 2334–2338, 1995.
- CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**. 110: 11-19, 1997.
- CARLSSON, I.B. et al. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. **Reproduction**. 131: 641–649, 2006.
- CARRIJO JR, O.A. Estimativa, características morfológicas e estruturais e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. 2009. **Tese (Doutorado)**. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil, 2009.
- CARRIJO JR, O.A. et al. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. **Cells Tissues Organs**. 191: 152-160, 2010.
- CARVALHO, A.A. et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**. 138: 220-227, 2013.
- CARVALHO, A.A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Res Vet Sci**. 97(1):140-7, 2014.
- CECCONI, S. et al. In Vitro Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian Tissue. **Biology of Reproduction**. 70: 12–17, 2004.
- CELESTINO, J.J.H. et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**. 108: 309–318, 2007.
- CHANG, L.J. et al. An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening. **Clin Exp Reprod Med**. 38:1-8. 2011.
- CHI, H.J. et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 23:1023–1028, 2008.
- CHOI, J. et al. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. **Cryobiology**. 54:55-62, 2007.
- COMIZZOLI, P.; WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.S. Effect of 1,2-Propanediol Versus 1,2-Ethenediol on Subsequent Oocyte Maturation, Spindle Integrity, Fertilization, and Embryo Development In Vitro in the Domestic Cat. **Biology of Reproduction**. 71: 598–604, 2004.
- CONCANNON, P.W.; HODGSON, B.; LEIN, D. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulation. **Biology of Reproduction**. 23: 111-117, 1980.

CORT, W.M. et al. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. 52(6): 174-178, 1975.

CRESTANA, F. M. et al. Autotransplantação de Ovário no Subcutâneo e Consumo Folicular em Gatas Domésticas (*Felis catus*). *Veterinary Notice*, v.12, p.131-140, 2006.

CRESTANA, F.M. Autotransplantação de ovário no Subcutâneo e consumo folicular em gatas Domésticas (*Felis catus*). 2006. Dissertação (mestrado). Universidade federal de Uberlândia. Uberlândia – Minas Gerais. Brasil, 2006.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**. 48: 831-841, 1997.

DANFORTH, D. R. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. **Biol. Reprod.** 68: 1736–1741, 2003.

DANILOVIC, A. et al. Protective effect of N-acetylcysteine on early outcomes of deceased renal transplantation. **Transplant. Proc.** 43: 1443–1449, 2011.

DATH, C. et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. **Human Reproduction**. 25(7): 1734–1743, 2010.

DEKEL, N.; HILLENSJO, T.; KRAICER, P.F. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. **Biol Reprod**. 20: 191-197, 1979.

DE LA PENA, E.C. et al. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**. 123:593– 600, 2002.

DEMEESTERE, I. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: Case Report. **Human Reproduction**. 21(8): 2010–2014, 2006.

DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Human Reproduction**. 15(6): 649–665, 2009.

DEPALO, R.; CAVALLINI, A. Assessment of Estrogen Receptors and Apoptotic Factors in Cryopreserved Human Ovarian Cortex. **Systems Biology in Reproductive Medicine**. 55: 236–243, 2009.

DISSEN, G.A. et al. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**. 134:1146-1154, 1994.

DRIANCOURT, M.A. et al. Role of KIT and KIT ligand in ovary function. **Ver Reprov**. 5: 143-52, 2000.

DOLMANS, M.M. et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. **Reproduction**. 134: 253-62, 2007.

DOMINGUES, S.F.S. et al. Histological study of capuchin monkey (*Cebus apella*) ovarian follicles. **Acta Amazonica**. 34 (3): 495 – 501, 2004.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 30:1/2, p. 57-71, 2006.

DOMINGUEZ, F. et al. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. **Fertil Steril**. 99: 565–72, 2013.

DONNELLY, E.T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E. The effect of ascorbate and alphatocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Mutagenesis**. 14: 505–512, 1999.

DONNEZ, J. et al Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**. 364: 1405-1410, 2004.

DONNEZ, J. et al. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. **Hum Reprod**. 21: 183–188, 2006.

DONNEZ, J. et al. Live birth after allografting of ovarian cortex between monozygotic twins with Turner syndrome (45,XO/46,XX mosaicism) and discordant ovarian function. **Fertil Steril**. 96(6):1407-11, 2011.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. 28: 1188-1197, 2014.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A.K.; MATZUK, M. M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocrine Reviews**, v.30, p. 624–712, 2009.

EDYTA, A.; ALI, E. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. **PLoS One**. 6: e27604, 2011.

EDWARDS, S.J. et al. The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. **Endocrinology** 149(3):1026–1030, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**. 35(4): 495–516, 2007.

EL-NAGGAR, M.M. et al. Effect of thawing rate and post-thaw culture on the cryopreserved fetal rat islets: functional and morphological correlation. **Life Sci**. 78:1925-1932, 2006.

ENDO, Y. et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. **Reprod Biomed Online**. 24: 301–7, 2012.

EPPIG, J.J. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes in vitro. **Hum Reprod**, 9:969-976, 1994.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**. 25: 800-805, 1966.

ERICKSON, G.F. Role of Growth Factors in Ovary Organogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**. 8: S13, 2001.

EROGLU, A. et al. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nature Biotechnology**. 18:163–7, 2000.

EROGLU, A.; TONER, M.; TOTH, T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. **Fertility and Sterility**. 77(1), 2002.

EROGLU, A. Cryopreservation of mammalian oocytes by using sugars: intra- and extracellular raffinose with small amounts of dimethylsulfoxide yields high cryosurvival, fertilization, and development rates. **Cryobiology**. 60 (3): S54–S59, 2010.

FABBRI, R. et al. Effects of Cyclic Increase in Gonadotropins on the In Vitro Development of Primordial Follicles to Antral Stage. **Ultrastructural Pathology**. 36(5); 356–361, 2012.

FABBRI, R. et al. Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification. **Biomed Res Int**. 673-537, 2014.

FAHEEM, M.S. et al. Effect of Bovine Ovarian Tissue Vitrification on the Structural Preservation of Antral Follicles. **Reproduction in Domestic Animals**. 48: 774-780, 2013.

FAHY, G.M. Analysis of “solution effects” injury: rabbit renal cortex frozen in the presence of dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**. 17(4): 371–388, 1980.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**. 60: 45-53, 2010.

FARRANT, J. General observations on cell preservation. In: M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, **Pitman Medical Limited**, Kent, England, p. 1-18, 1980.

FASSBENDER, M. et al. High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. **J Reprod Dev**. 53:1023-1034, 2007.

FAUSTINO, L.R. et al. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**. 122: 90–97, 2010.

FERREIRA, E.M. et al. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. 32 (3); 172-181, 2008.

FERREIRA, R.M. **Efeito da adição de antioxidante (trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e ao meio de transporte de oócitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro**. 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. In: SIES, H (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York, Academic, p. 114-121, 1984.

FUKU, E. et al. In vitro fertilization and development of frozen thawed bovine oocytes. **Cryobiology**. 29: 485-92, 1992.

FUCHINOUE, K. et al. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with taxol in the vitrification solution. *J.Assist. **Reprod. Genet.*** 21: 307–309, 2004.

GILCHRIST, R.B. et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **J Cell Sci** 119(Pt 18):3811–3821, 2006.

GIUDICE, C. Insulin-like growth factors and ovarian development. **Endocr Ver.** 13; 641–669, 1992.

GOERITZ, F. et al. Embryo Retrieval after Hormonal Treatment to Control Ovarian Function and Non-surgical Artificial Insemination in African Lions (*Panthera leo*). **Reprod Dom Anim.** 47 (6): 156–160, 2012.

GOOK, D.A.; OSBORN, S.M.; JOHNSTON, W.I.H. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. **Hum Rep Rod.** 8: 1101-1109, 1993.

GOOK, D.A.; OSBORN, S.M.; JOHNSTON, W.I.H. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2- propanediol. **Hum Reprod.** 10, 654-658, 1995.

GOOK, D.A. et al. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. **Human Reproduction.** 18(9): 1772-1781, 2003.

GOSDEN, R. Transplantation of ovaries and testes. In *Fetal Tissue Transplants in Medicine* Ed. **R Edwards**. Cambridge University Press. pp 253–273, 1992.

GOSDEN, R.G. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196 degrees C. *Hum Reprod.* 9(4): 597–603, 1994.

GOSDEN, R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Molecular Cell Endocrinology.** 63: 125–129, 2000.

GOUGEON, A.; LEFEVRE, B. Evolution of the diameters of the largest health and atretic follicles during the human menstrual cycle. **J Reprod Fertil.** 69: 497-502, 1983.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocr Rev.** 17: 121–155, 1996.

GREENAWAY, J. et al. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. **Biol. Reprod.** 72; 1071–1078, 2005.

GROUT, B.W.W.; MORRIS, G. J. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. **Theriogenology.** 71: 1079-1082, 2009.

GUERIN, P. F.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**. 7(2):175-189, 2001.

GUNASENA, K.T. et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant *Loxodonta africana* ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**. 53: 265–275, 1998.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. Barueri: Manole. 513p, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.** 119: 598-620, 1992.

HERRICK, J.R. et al. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. **Biology of Reproduction**. 76: 858–870, 2007.

HOLT, W.V. et al. Genetic resource banks in wildlife conservation. **J Zool**, 238:531–544, 1996.

HOVATTA, O. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol–sucrose as cryoprotectant. **Human Reproduction**. 11: 1268–1272, 1996.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **RBM Online**. 10: 729-734, 2005.

HREDZAK, R. et al. Influence of Slow-rate Freezing and Vitrification on Mouse Embryos. **Acta Veterinária Brno**. 74: 23–27, 2005.

IMTHURN, B. et al. Gonadotrophin administration can benefit ovarian tissue grafted to the body wall: implications for ovarian grafting. **Mol Cell Endocrinol**. 163:141–6, 2000.

INCI, I. et al. N-acetylcysteine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. **Ann. Thorac. Surg**. 84: 240–246, 2007.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **J Reprod Fertil**. 34: 39-54, 1987.

ISACHENKO, V. et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**. 138: 319–327, 2009.

IUCN, International Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/amazing-species>>. Acesso em: Dez. 2014.

JEE, B.C. et al. Effect of sphingosine-1-phosphate supplementation on follicular integrity of vitrified–warmed mouse ovarian grafts. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 152:176-180, 2010.

JEMMETT, J. E.; EVANS, J.M. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. **Journal of Small Animal Practice**. **18(1)**, 31–37, 1977.

JEWGENOW, K. GORITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. **Animal Reproduction Science**. **39**: 285-297, 1995.

JEWGENOW, K., et al. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. **Journal of Reproduction and Fertility**. **Supplement**. **51**: 33–39, 1997.

JEWGENOW, K. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**. **112**: 39-47, 1998.

JEWGENOW, K.; PARIS M. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. **Theriogenology**. **66**: 93-100, 2006.

JIN, S. et al. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. **Fertility and Sterility**. p. 1-6, 2010.

JOHNSON, L.M.; GAY, V.L. Luteinizing hormone in the cat. I. Tonic secretion. **Endocrinology**. **109**: 240-252, 1981.

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

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: **W.B.Saunders**. 592p, 2001.

JUENGEL, J.L. et al. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Mol Cell Endocrinol**. **191**:1–10, 2002.

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

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Hum Reprod**. **24**:1–14, 2009.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. **26**: 239–57, 1972.

KIM, M.; TILLY, J.L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. **Biochimica et Biophysica Acta**. **1644**: p. 205– 210, 2004.

KIM, S.S. et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. **Fertil Steril**. **82**: 679–85, 2004.

KLOCKE, S. et al. Slow -freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. **Arch Gynecol Obstet**. **291(2)**: 419-26, 2015.

- KNAUER, E. Ovarientransplantation. *Centralbl. F. Gynak., Leipz.* 20: 524-528, 1869.
- KRYSKO, D.V. et al. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*. 13: 1065–108, 2008.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H. Anatomia dos animais domésticos: Texto e Atlas colorido. *Artemed*. 4ª Edição, 2011.
- KORFSMEIER, K. H. Oocytes in primordial follicles of the immature cat (*Felis domestica*). *Anatomischer Anzeiger*. 154; 283-292, 1983.
- KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*. 11: 300–308, 2005.
- KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 67: 73-80, 2007.
- LA MARCA, A. et al. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13: 398-408, 2012.
- LASCHKE, M.W.; MENGER, M.D.; VOLLMAR, B. Cryopreservation does not affect neovascularization of freely transplanted ovarian follicles. *Fertil Steril*. 79: 1458 – 1460, 2003.
- LEASK, A., ABRAHAM, D.J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochemistry Cell Biology*. 81; 355–363, 2003.
- LEE, D.M. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*. 428, 2004.
- LEE, R.K. et al. Blastocyst development after cryopreservation and subcutaneous transplantation of mouse ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet*. 22: 95–101, 2005.
- LEIBO, S.P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozenthawed bovine embryos. *Theriogenology* 21:767–790, 1984.
- LEONEL, E.C.R. Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas. 2013. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. Brasil, 2013.
- LI, L.; CLEVERS, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 327: 542–545, 2010.
- LIFEMAP DISCOVERY, Embryonic development & stem cell compendium. Disponível em : <<http://discovery.lifemapsc.com/>> Acesso em: Fev. 2015.
- LIMA, A.K.F. Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. 2006. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará. Brasil, 2006.
- LIMA, A.K.F. et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles *in situ* from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*. 66: 1664–1666, 2006.

LIMA, J.S. et al. Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. **Zygote**, p. 1-5, 2012.

LIMA-VERDE, I.B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e ao embrião mamífero. **Medicine Veterinaria Recife**. 1(1): 81-88, 2007.

LIN, T.C. et al. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. **BMC Biotechnol**. 8: 38, 2008.

LINTERN-MOORE, S. et al. Follicular development in the infant human ovary. **Journal Reproduction and Fertility**. 20: 773- 778, 1974.

LIU, J. et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. **Biol Reprod**. 64:171-178, 2001.

LIU, J. et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Hum Reprod**. 17: 605–11, 2002.

LUCCI, C. M. et al. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. 56 (1):39-49, 1999.

LUVONI, G.C.; PELLIZZARI, P.; BATTOCCHIO, M. Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. **Jornal of Reproduction and Fertility supplement**. 51; 93-98, 1997.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**. 66: 101–111, 2006.

LUVONI, G.C. et al. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. **Reproduction in Domestic Animals**. 47: 385–391, 2012.

LUYET, B.J. The ultrarapid freezing of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica**. 1:1-14, 1937.

LUYCKX, V. et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. **Fertil Steril**. 101: 1149-56, 2014.

LUZ, H.K.M. et al. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediolfreezing médium. **Biopreservation and biobanking**. 10(4): 338-342, 2012.

MAGALHÃES-PADILHA, D.M. et al. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles. **Theriogenology**. 77: 206–213, 2012.

MAHMOODI, M. et al. N-acetylcysteine improves function and follicular survival in mice ovarian grafts through inhibition of oxidative stress. **Reproductive BioMedicine Online**, 2014.

MASSARDIER, J. et al. Technical Aspects of Laparoscopic Ovarian Autograft in Ewes After Cryopreservation by Slow-Cooling Protocol. **Reproduction Domestic Animal**. 45: 8–12, 2010.

MANI, A.M. et al. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. **Reproduction**. 139; 139–151, 2010.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**. 54 1059–1069, 1996.

MATOS, M.H. et al. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Res Vet Sci**. 90: 404–411, 2011.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**. 247: C125-142, 1984.

MCGEE, Jr. H.A.; MARTIN, W.J. Cryochemistry. **Cryogenics NASA Center**. 2: 1-11, 1962.

McLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p. 3–9, 2000.

McLAUGHLIN, E.A.; MCLVER, S.C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**. 137; 1–11, 2009.

McNATTY, K.P. et al. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal Of Reproduction And Fertility Supplement*. 49:123–35, 1995.

MEDEIROS, R.M.T.; PAULINO, C.A. in *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Ed. **Guanabara Koogan**. 736-749, 2006.

MEIROW, D. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **N Engl J Med**. 353:318– 321, 2005.

MIALOT, J.P. Cirurgia do aparelho genital feminino. In: *Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos*. Porto Alegre: **Hora Veterinária**. p.142- 9, 1998

MONTEIRO, C. M. R.; KOIVISTO, M. B.; SILVA, A M. Perfil Histológico do Útero e Ovários de Gatas Submetidas à Ovariosalpingohisterectomia. **ARS Veterinaria**. 22 (3); 236-241, 2006.

MOTTA, P.M.; MAKABE, S.; NOTTOLA, S.A. The Ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. **Human Reproduction Update**. 3(3): 281-295, 1997.

MOTTA, J.P.R. et al. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. **Cryobiology**. 68: 343–348, 2014.

MUHLBACHER, F.; LANGER, F.; MITTERMAYER, C. Preservation solutions for transplantation. *Transplant Proc.* 31(5): 2069–2070, 1999.

MURUVI, W. et al. In vitro growth and differentiation of primary follicles isolated from cryopreserved sheep ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**. 112: 36–50, 2009.

NAGANO, M. et al. Effects of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on in vitro viability of mouse preantral follicles. **Biomed. Res.** 28: 153–160, 2007.

NEWTON, H. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 11: 1487–1491, 1996.

NEWTON, H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. **Hum Reprod Update**. 4: 237–247, 1998.

NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.** 175: 123–130, 2001.

NILSSON, E.E. et al. Gene Bionetwork Analysis of Ovarian Primordial Follicle Development. **PLoS ONE**. 5(7), 2010.

NISOLLE, M. et al. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Fertil Steril**. 74: 122–9, 2000.

NUGENT, D. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, Oxford, Inglaterra, GB, v.3, p. 267–280, 1997.

OHINATA, Y. et al. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. **Cell**. 137:571–584, 2009.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. **N Engl J Med**. 342, 1919, 2000.

OKTAY, K. et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. **JAMA: The journal of the American Medical Association**, United States, v. 286, n. 12, p. 1490–3, 2001.

OKTEM, O.; OKTAY, K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. **Cancer Res**. 67:10159–62, 2007.

OLIVEIRA K.G. et al. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. **Animal Reproduction Science**, v.123, p. 75–80, 2011.

ORISAKA, M. et al. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. **Endocrinology** 150(6):2740–2748, 2009.

ORTEGA-CAMARILO, C. et al. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. **Reproduction**. 137: 979–986, 2009.

O'SHEA, J.D. Histochemical observation on mucin secretion by subsurface epithelial structures in the canine ovary. **J Morphol**.120:347–58, 1964.

OSKAM, I.C.; ASADI, B.A.; SANTOS, R.R. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. **Fertil Steril**. 93:2764–6, 2010.

PAAPE, S. R. et al. Luteal activity in the pseudopregnant cat. **Biol. Reprod**. 13: 470-474, 1975.

PARIS, M.C.J. et al. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? *Theriogenology*. 61: 277–291, 2004.

PARK, C.Y. et al. The feasibility and efficacy of gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy induced ovarian failure in patient with gynecological malignancies. **Obstet Gynecol Sci**. 57(6): 478-83, 2014.

PARK, S.P. et al. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscopic grid. **Hum. Reprod**. 14: 2838-2843, 1999.

PARMEGIANI, L. et al. Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. **Human Reproduction**. 23 (8); 1771–1777, 2008.

PARROTT, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1: 230–241, 1960.

PARTE, S. et al. Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. **Stem Cells and Development**. 20(8): 1451–1464, 2011.

PARTE, S. et al. Isolation and characterization of stem cells in the adult mammalian ovary. *Methods Mol Biol*. 1235: 203-29, 2015.

PAYNTER, S.J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction Update**. 6: 449–456. 2000.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**. 9: 267-277, 2008.

PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in reproductive Medicine**. 20: 5-13, 2002.

PENG, X. et al. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. **J Assist Reprod Genet** 27(5):247–257, 2010.

PEPLING, M.E.; SPRADLING, A.C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. **Dev Biol.** 234:339–51, 2001.

PEREDA, J.; ZORN, T.; SOTO-SUAZO, M. Migration of Human and Mouse Primordial Germ Cells and Colonization of the Developing Ovary: An Ultrastructural and Cytochemical Study. **Microscopy Research and Technique**, v.69, p. 386–395, 2006.

PETERS, H.; McNATTY, K.P. The ovary Berkeley and Los Angeles, CA: University of California Press; 1980.

PETROIANU, A. et al. Natural pregnancy in rabbits that underwent oophorectomy and orthotopic allogeneic or autologous ovarian transplantation. **Fertil Steril.** 77:1298–9, 2002.

PICTON, H.M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction.** 136; 703–715, 2008.

PINTO, L.C. et al. Quantification of Dimethyl Sulfoxide Perfusion in Sheep Ovarian Tissue: A Predictive Parameter for Follicular Survival to Cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking.** 6:269–276, 2008.

POLGE, C., SMITH, A.V., PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature.** 164: 666, 1949.

POPE, C.E. et al. In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. **Theriogenology** 77: 531–538, 2012.

QUINTANA, R. et al. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. **Fertil.Steril.** 82; 1101–1105, 2004.

RAHIMI, G. et al. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development.** 15; 343–349, 2003.

RALL, W.; REID, D.; POLGE, C. Analyses of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology.** 21: 106–121, 1984.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. **Nature.** 313:573–5, 1985.

RASCADO, T.S. et al. Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. **Theriogenology.** 74: 596–601, 2010.

RECIO, L. et al. Comparison of Comet Assay Dose-Response for Ethyl Methanesulfonate Using Freshly Prepared Versus Cryopreserved Tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 53:101–113, 2012.

RINGLEB, J.; ROHLER, M.; JEWGENOW, K. Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on in vitro fertilization of cat oocytes. **Reproduction.** 127: 179–186, 2004.

ROBERTS, A. E. et al. Neutralization of endogenous vascular endothelial growth factor depletes primordial follicles in the mouse ovary. **Biol. Reprod.** 76; 218–223, 2007.

RODRIGUES, A.P.R. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science.** 84:211–227, 2004.

RODRIGUES, A.P.R. et al. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Research.** 56; 103–111, 2005.

RODRIGUES, P. et al. *In Vitro* Culture of Cryopreserved Caprine Ovarian Tissue Pieces and Isolated Follicles. **Cell Preservation Technology.** 4(4), 2006.

RODRIGUES, P. et al. Oogenesis: Prospects and Challenges for the Future. **Journal of Cellular Physiology.** 216; 355–365, 2008.

RÜSSE, I. Oogenesis in caule and sheep. **Bibliotheca Anatômica.** 24;77-92, 1983.

RYTER, S.W.; CHOI, A.M.K. Heme Oxygenase-1: Redox Regulation of a Stress Protein in Lung and Cell Culture Models. **Antioxidants & Redox Signaling.** 7(1):2, 2005.

SAGSOZ, N.; KISA, U.; APAN, A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. **Human Reproduction.** 17: 2972-2976, 2002.

SALLE, B. et al. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. **Fertility and Sterility.** 70:(1),1998.

SANFILIPPO, S. et al. Quality and functionality of human ovarian tissue after cryopreservation using an original slow freezing procedure. **J Assist Reprod Genet.** 30(1):25-34, 2013.

SANTANA, L.N. et al. Vitrification of ovarian tissue from primates and domestic ruminants: an overview. **Biopreserv Biobank.** 10 (3): 288-94, 2012.

SANTOS, R.R. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science.** 91: 249–263, 2006a.

SANTOS, R.R. et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell Tissue and Research.** 325: 523–53, 2006b.

SANTOS, R.R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation.** 2007. 144f. Tese (Doutorado) - Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2007a.

SANTOS, R.R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science.** 99: 53–64, 2007b.

SANTOS, R.R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** 32(1): 9-15, 2008.

SANTOS, R.R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility.** 91(4): 1455-1458, 2009.

- SANTOS, R.R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**. 122(3-4): 151-163, 2010.
- SARAGUSTY, J. et al. Do physical forces contribute to cryodamage? **Biotecnologia e Bioengenharia**. 104: 719-728, 2009.
- SARAIVA, M.V.A. et al. Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial follicle development. **Small Rum Res**. 78: 87-95, 2008.
- SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Rec Med Vet**. 167:205-218, 1991.
- SAUVAT, F., et al. Ovarian function is restored after grafting of cryopreserved immature ovary in ewes. **The FASEB Journal**. 27, 2013.
- SCALERCIO, S.R.R.A. et al. Immunolocalization of Growth, Inhibitory, and Proliferative Factors Involved in Initial Ovarian Folliculogenesis From Adult Common Squirrel Monkey (*Saimiri collinsi*). **Reproductive Sciences**. 1-7, 2014.
- SCALERCIO, S.R. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft of squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). (Dados não publicados).
- SCHINDLER, R.; NILSSON, E.; SKINNER, M.K. Induction of Ovarian Primordial Follicle Assembly by Connective Tissue Growth Factor CTGF. **PLoS ONE**. 5(9), 2010.
- SCHUBERT, B.; CANIS, M.; DARCHA, C. Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril*. 89(6):1787-1794, 2008.
- SCHULTZ, R.M.; WASSARMAN, P.M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. **J Cell Sci**. 24:167-194, 1977.
- SHAW, J.M.; WOOD, E.C.; TROUNSON, A.O. Transplantation and cryopreservation of ovarian tissue. In: Trounson AO, Gardner D, editors. **Handbook of in vitro fertilization**. 2nd ed., Boca Raton, FL: CRC Pressp. 413-30, 2000.
- SHAW, J.M. et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular Cell Endocrinology**. 161: 103-110, 2000.
- SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K.; SHIKANOV, A. Bioengineering the Ovarian Follicle Microenvironment. **Annu. Rev. Biomed. Eng**. 16:29-52, 2014.
- SHELTON, J.N. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. **Theriogenology**. 37: 713-721, 1992.
- SHIKANOV, A. et al. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice. **Tissue Eng Part A**. 17(23-24): 3095-104, 2011.

SHILLE, V.M.; LUNDSTROM, K.E.; STABENFELDT, G.M. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol 17 β concentrations in plasma: Relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. **Biology of Reproduction**. 21: 953-963, 1979.

SHILLE, V.M. et al. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. **Journal of Reproduction and Fertility**. 68; 29-39, 1983.

SHIMIZU, T. et al. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biol Reprod**. 67;1846-1852. 2002.

SHIN, T. et al. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature**. 415, 2002.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**. 11(5); 461-471, 2005.

SLEE, R.B. et al. Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells. **Endocrinology**. 142; 1082-1089, 2001.

SPRÍCIGO, J.F.W. et al. Effect of the exposure to methyl- β -cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. **Cryobiology**. 65; 319-325, 2012.

STORNELLI, M.A. Evaluación de semen en el gato doméstico: análisis de rutina y metodologías especiales felino. **Rev Bras Reprod Anim**. 31(1): 135-140, 2007.

STOUFFER, R.L. et al. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. **Arch Med Res**. 32; 567-575, 2001.

SU, Y.Q. et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP-15 and GDF-9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development** 135(1):111-121, 2008.

SUGIMOTO, M. et al. Follicle survival in neonatal rat *ovaries* cryopreserved by *vitrification*. **Cryo Lett**. 17: 93-98, 1996.

SUH, C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Rev Endocr Metab Disord**. 3:5-12, 2002.

SUN, R.Z. et al. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. **J Mol Hist** . 41:325-332, 2010.

TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. **Reprod. Domest. Anim**. 39; 206-216, 2004.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, 26(8): 563-567, 2010.

TERAZONO, T. et al. Assessment of canine ovaries autografted to various body sites. **Theriogenology**. 77: 131-138, 2012.

TIAN, T. et al. Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviors of human ovarian tissues: sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. **Hum Reprod.** 5, 2015.

TING, A.Y. et al. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction.** 26(9): 2461–2472, 2011.

TSURIBE, P.M.; GOBBO, C.A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. **Fertil Steril;** 91:1976–83, 2009.

TSUTSUI, T.; STABENFELDT. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. **J. Reproduction Fert. Suppl.** 47: 29-35, 1993.

USTA, U. et al. Tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: effects of L-carnitine and N-acetyl cysteine. **Pediatr. Surg. Int.** 24: 567–573, 2008.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development.** 51: 53–58, 1998.

VANACKER, J. et al. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. **Biomaterials.** 33: 6079-85, 2012.

VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. **Anim. Reprod.**, v.6, n.1, p.72-95, 2009.

VAN WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biol Reprod.** 55:1003–11, 1996.

VIRANT-KLUN, I. et al. Putative stem cells with ancembryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. **Differentiation.** 76: 843–856, 2008.

VIRANT-KLUN, I. et al. Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells, **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** 12, 2011.

WANDJI, S.; FORTIER, M.A.; SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biol Reprod.** 46; 1034-1041, 1992.

WANG, L.H. et al. Morphological and Apoptotic Comparison of Primordial and Primary Follicles in Cryopreserved Human Ovarian Tissue. **Reprod Dom Anim** 44, 879–883, 2009.

WANG, L. et al. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. **J Assist Reprod Genet.** 30(10): 1301-11, 2013.

- WANG, X. et al. Successful in vitro culture of preantral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**. 141:183–191, 2011.
- WEISSMAN, A. et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD–SCID mouse. **Biology of Reproduction**. 60: 1462–1467, 1999.
- WENZEL, J.G.; ODEND’HAL, S. The mammalian rete ovarii: a literature review. **Cornell Vet**. 75:411–25, 1985.
- WIEDEMANN, C. et al. Preservation of Primordial Follicles from Lions by Slow Freezing and Xenotransplantation of Ovarian Cortex into an Immunodeficient Mouse. **Reprod Dom Anim**. 47 (6): 300–304, 2012.
- 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 Veterinary Research**. 9:37, 2013.
- WIGGLESWORTH, K. et al. Transcriptomic Diversification of Developing Cumulus and Mural Granulosa Cells in Mouse Ovarian Follicles. **Biol Reprod**. 92(1); 23, 2015.
- WOLF, D.P. et al. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. **Biology of Reproduction**. 71: 486–493, 2004.
- WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**. 46; 190-200, 1997.
- YEN, S.S.C. The human menstrual cycle. In: Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL, eds. **Reprod Endoc Physiol Patho Clinical Man**. Philadelphia. Saunders; 200–236. 1999
- YEOMAN, R.R. et al. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. **Human Reproduction**. 16(9): 1965-1969, 2001.
- YOUM, H.W. et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. **Hum Reprod**. 29:720–30, 2014.
- YOUM, H.W. et al. Transplantation of mouse ovarian tissue: Comparison of the transplantation sites. **Theriogenology**. 1–8, 2014.
- ZAMBONI, L.; GONDOS, B. Intercellular bridges and synchronization of germ cell differentiation during oogenesis in the rabbit. **J Cell Biol**. 36:276–82, 1968.
- ZHANG, J.M. et al. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 166(1): 52-5, 2013.
- ZHENG, J.H. et al. A modified CZ-1 preserving solution for organ transplantation: comparative study with UW preserving solution. *Chin Med J*. 121(10): 904–909, 2008.