

CAROLINA RODRIGUEZ JIMENEZ

**VITRIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS
PRÉ-ANTRAIS DE FÊMEAS BOVINAS COM
DIMETILSULFÓXIDO E SACAROSE ACRESCIDO
DE α – TOCOFEROL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696v
2010

Rodríguez Jiménez, Carolina, 1983-
Vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas
bovinas com dimetilsulfoxido e sacarose acrescido de
 α -tocoferol / Carolina Rodríguez Jiménez. – Viçosa, MG,
2010.
xiv, 55f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

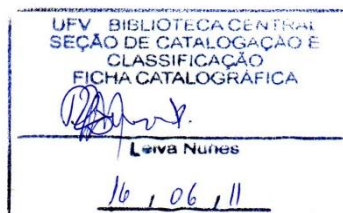
Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 36-52.

1. Reprodução animal. 2. Bovino - Reprodução.
3. Ovários - Criopreservação. 4. Biotecnologia.
5. Gametas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.0824



CAROLINA RODRIGUEZ JIMENEZ

**VITRIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS
PRÉ-ANTRAIS DE FÊMEAS BOVINAS COM
DIMETILSULFÓXIDO E SACAROSE ACRESCIDO
DE α – TOCOFEROL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

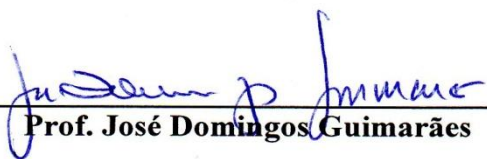
Aprovada: 22 de fevereiro de 2010.



Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Coorientador)



Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)



Prof. José Domingos Guimarães



Prof. Antonio Bento Mancio



Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

A meu Deus, guia em todos meus objetivos, presente na inspiração e conhecimento adquiridos, sem os quais nenhum pensamento, palavra ou frase se concretizariam.

A minha mãe Polanda pela força, incentivo, orientação, carinho, amor...

Por estar comigo em todas as etapas da minha vida.

Dedico

"Aprender sempre é uma maneira de traduzir os sonhos em realidade".

Antes de começar o caminho do dia-a-dia

Lembre-se que somente você pode percorrê-lo, e que de você depende chegar ao sucesso que você quer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que tenho na minha vida e por ter me dado força e coragem para alcançar meus objetivos e continuar lutando por eles.

- À minha mãe, Yolanda Jimenez de Rodriguez, por estar sempre presente me incentivando, apoiando e orientando em todos os momentos. Obrigada por nunca ter me faltado quando eu precisei de você e por todo o amor e dedicação.
- À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização deste curso.
- Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.
- Ao Professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela oportunidade de ter sido meu orientador, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, convivência, conselhos e sugestões.
- Ao professor Eduardo Paulino da Costa, por sua disposição e sugestões para a realização deste trabalho.
- Ao Giancarlos e Rafael Otero e ao Professor Joaquim Patarroyo, pelo apoio e auxílio no meu experimento, muito obrigada.
- Aos estagiários Amanda e Leandro, minha gratidão por todo auxílio e apoio no experimento.
- À Elenice, pela amizade, conselhos e ensinamentos em todo mestrado.
- A meus amigos Madriano, Guilherme, Erly, Valdevane, pela amizade, auxílio para a realização do meu experimento.
- Aos demais funcionários do Departamento de Zootecnia, do Laboratório de Histologia e Parasitologia no Departamento de Medicina Veterinária, pelo apoio durante a realização do meu experimento.
- Às minhas colegas de república, Elisa, Germana, Ivanna e Tassia, pela convivência agradável e pelo companheirismo.
- À minha irmã Angélica pela amizade, apoio e conselhos.
- Ao meu irmão, cunhado, e demais familiares, pela torcida, pela força em todas as fases desta caminhada;
- Ao Dagoberto, pela atenção, compreensão, apoio, confiança, paciência e amor no dia-a-dia por estes anos.

BIOGRAFIA

CAROLINA RODRIGUEZ JIMENEZ, filha de Yolanda Jimenez de Rodriguez e Jesus Antonio Rodriguez Pineda, nasceu em 24 de fevereiro de 1983, em Cali, Valle – Colômbia.

Em 20 de outubro de 2006, graduou-se em Zootecnia pela Universidade de Cundinamarca, em Fusagasuga, Cundinamarca – Colômbia.

Em 04 de março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia, na área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais – Brasil.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Oogênese.....	4
3.2. Foliculogênese.....	4
3.3. Classificação dos folículos pré-antrais.....	5
3.4. População folicular e atresia.....	6
3.5. Degeneração celular.....	7
3.6. Apoptose.....	7
3.7. Crioprotetores e Criopreservação.....	7
3.8. Tocoferol.....	10
3.9. Importância do isolamento e cultivo de folículos pré-antrais.....	10
3.10. Isolamento de Folículos pré-antrais <i>in vitro</i>	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Localização e delineamento experimental.....	13
4.2. Coleta e manipulação de ovários.....	13
4.3. Fase I. Vitrificação, descongelamento e histologia de folículos ovarianos pré-antrais em fêmea bovina <i>in situ</i>	13
4.3.1. Vitrificação.....	14
4.3.2. Descongelamento.....	14
4.3.3. Histologia clássica.....	15
4.3.4. Classificação de folículos pré-antrais.....	15
4.4. Fase II. Estudo da morfologia viabilidade de folículos pré-antrais de fêmea bovina isolados do tecido ovariano pós-vitrificação.....	17
4.4.1. Isolamento mecânico.....	17
4.4.1.1. Dissociação mecânica dos fragmentos ovarianos.....	17

4.4.1.2. Separação de folículos isolados por meio de filtração simples.....	17
4.4.1.3. Análise da viabilidade.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1.Fase I. Estudo da morfologia vitrificação, descongelamento e histologia de folículos ovarianos pré-antrais em fêmea bovina <i>in situ</i>	21
5.1.1. Morfologia de folículos pré-antrais.....	21
5.1.2. Folículos pré-antrais primordiais.....	22
5.1.3. Resultados de folículos pré-antrais primários.....	25
5.1.4. Folículos pré-antrais secundários.....	28
5.2. Fase II. Viabilidade de folículos pré-antrais de fêmea bovina isolados do tecido ovariano pós-vitrificação.....	30
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
8. ANEXO.....	52

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Distribuição das soluções de vitrificação e descongelamento para os diferentes tratamentos.....	14
Tabela 2. Quantidade de folículos ovarianos pré-antrais de fêmea bovina classificados em primordiais, primários e secundários e qualificados em bons, regulares e ruins.....	21
Tabela 3. Dados dos folículos ovarianos pré-antrais primordiais, qualificados em bons, regulares e ruins entre os tratamentos (controle e vitrificados).....	22
Tabela 4. Diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primordiais bons regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.....	23
Tabela 5. Dados dos folículos ovarianos pré-antrais primários, qualificados em bons, regulares e ruins entre os tratamentos (controle e vitrificados).....	25
Tabela 6. Diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primários bons regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.....	27
Tabela 7. Dados dos folículos ovarianos pré-antrais secundários, qualificados em bons, regulares e ruins entre os tratamentos (controle e vitrificados).....	28
Tabela 8. Diferenças estatísticas de folículos pré-antrais secundários bons regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.....	29
Tabela 9. Viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas bovinas isolados de forma mecânica do tecido ovariano pós-vitrificação.....	31
Tabela 10. Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais viáveis mortos de fêmeas bovinas isolados de forma mecânica do tecido ovariano pós-vitrificação.....	32
Tabela 11. Análise quantitativa e porcentual <i>in situ</i> , das diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primordiais bons regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.....	52

Tabela 12. Análise quantitativa e porcentual <i>in situ</i> , das diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primários bons regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.....	53
Tabela 13. Análise quantitativa e porcentual <i>in situ</i> , das diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primários bons regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.....	54

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1.Folículo Primordial; 2. Folículo Primário; 3. Folículo Secundário; 4. Folículo Terciário; 5. Folículo Pré-ovulatório.....	6
Figura 2. Descongelamento de folículos pré-antrais em tecido ovariano de fêmea bovina: a) retirados do nitrogênio líquido (-196°C) e expostos à temperatura ambiente (25°C); b) descongelamento total dos fragmentos pela exposição a Banho Maria (37°C); c) distribuição dos fragmentos em cada tipo de descongelamento por tratamento, MEM: meio essencial mínimo, SAC:sacarose, M:mol.....	15
Figura 3. Secção histológica de fragmento ovariano corado pelo Ácido Periódico-Schiff Hematoxilina e eosina mostrando classificação de FOPA. (A) folículo primordial, (B) folículo primário (C) folículo secundário O: oócito; N: núcleo do oócito; G: células da granulosa.....	16
Figura 4. Secção histológica de fragmento ovariano corado pelo Ácido Periódico-Schiff Hematoxilina e eosina mostrando qualificação de FOPA. (A) Folículo normal, (B) Folículo degenerado, C) Folículo degenerado O: oócito; Nu: núcleo do oócito; GC: células da granulosa; pO: oócito picnótico; dGC: célula da granulosa degenerada.....	16
Figura 5. Processo histológico de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) em tecido de fêmeas bovinas.....	18
Figura 6. Processo de isolamento mecânico para folículos ovarianos pré-antrais em tecido de fêmeas bovinas.....	19
Figura 7. Folículos pré-antrais corados com azul trypan, viáveis (A,B,C,D, H) e inviáveis (E,G,I); com vários aumentos no microscópio invertido.....	20

RESUMO

JIMENEZ, Carolina Rodriguez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas bovinas com dimetilsulfóxido e sacarose acrescida de α -tocoferol.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres, Co-orientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Eduardo Paulino da Costa

Objetivou-se realizar a vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) de fêmeas bovinas com dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose (SAC) acrescida de α -tocoferol (TOC), avaliando a morfologia de FOPA *in situ* e a viabilidade de FOPA isolados pós-vitrificação. O estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados ovários coletados de fêmeas bovinas abatidas, sem raça e idade definidas e em diferentes fases do ciclo estral. As variáveis qualitativas relacionadas à morfologia e viabilidade do FOPA foram submetidas ao teste não-paramétrico de Kruskal-wallis e teste de qui-quadrado respectivamente, a 5 % de probabilidade. No primeiro experimento utilizou-se 66 ovários de fêmeas bovinas, foram feitos cortes de 5 mm³ aproximadamente. Os fragmentos foram distribuídos aleatoriamente em nove tratamentos, representados pelo controle (fixado a fresco) e quatro soluções de vitrificação (SV) com dois tipos de descongelamento cada, representados da seguinte maneira: SV1m: DMSO, com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM); SV1s: DMSO, com descongelamento em SAC; SV2m: DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; SV2s: DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; SV3m: DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em MEM; SV3s: DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e SV4m: DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; SV4s: DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC. Cada corte, após o descongelamento, foi fixado para histologia clássica e corado com eosina e hematoxilina sendo observado ao microscópio óptico em aumento de 400x. Analisou-se 13.500 FOPA, encontrando-se 6,238 primordiais, 6,812 primários e 450 secundários, e classificados em: bom, regular ou ruim. Concluiu-se que o DMSO, SAC e TOC podem ser utilizados na criopreservação de FOPA de fêmeas bovinas, recomendando-se trabalhar com DMSO, SAC e TOC 10 mM com descongelamento em MEM, e DMSO com SAC descongelado tanto com MEM quanto com SAC para criopreservar o FOPA *in situ*. No segundo experimento, foram utilizados 51 ovários de fêmeas bovinas, os cortes, tratamentos, criopreservação e

descongelamento como descrito no primeiro experimento. Após o descongelamento, os fragmentos foram dissociados mecanicamente com meio de manutenção M199 e 5 % de albumina sérica bovina para filtração e posterior obtenção de FOPA isolados. A viabilidade dos FOPA foi examinada com azul de Trypan, mortos e vivos, corados ou não-corados, respectivamente, e observados ao microscópio invertido em aumento de 400x. Analisou-se 1500 FOPA isolados por tratamento, e um total de 13.500 folículos foram observados. Os resultados mostraram que o controle, ou seja, FOPA isolados sem vitrificação, diferiram de todos os tratamentos de criopreservação, mostrando assim que a criopreservação prejudica a viabilidade dos FOPA isolados. Porém, entre os tratamentos de vitrificação, o DMSO, SAC e TOC 10 mM, independentemente do tipo de descongelamento, mostraram os melhores resultados de viabilidade pós-criopreservação.

ABSTRACT

JIMENEZ, Carolina Rodriguez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Cryopreservation of preantral ovarian follicles of cows with dimethylsulfoxide and sucrose plus α -tocopherol.** Advisor:Ciro Alexandre Alves Torres, Co-advisors:Giovanni Ribeiro de Carvalho and Eduardo Paulino da Costa.

The objective of the study was to vitrify the ovarian pré-antral follicles (PF) of cows with dimethylsulfoxide (DMSO) and sucrose (SAC) plus α -tocopherol (TOC), by evaluation of the morphology of PF *in situ* and viability of post-vitrification isolated PF. The study was conducted in the Laboratory of Animal science, University Federal of Viçosa. Ovaries were collected from slaughtered cows, with undefined breed and age at different stages of the estrous cycle. Qualitative variables related to viability and morphology of the PF were analysed by non parametric test Kruskal-wallis and chi-square, respectively, at 5% probability. In the first experiment 66 ovaries of bovine females were used, fragments were cut with 5 mm³ approximately. Fragments were randomly assigned to nine treatments, represented by control (fixed in fresh) and four vitrification solutions (VS) with two thawing types each, represented as follows: SV1m: DMSO, with thawing in minimum essential medium (MEM); SV1s:DMSO, with thawing in SAC; SV2m: DMSO + SAC, with thawing in MEM; SV2s: DMSO + SAC, with thawing in SAC; SV3m: DMSO + SAC + TOC 5 mM, with thawing in MEM; SV3s: DMSO + SAC + TOC 5 mM, with thawing in SAC; SV4m: DMSO + SAC + TOC 10 mM, with thawing in MEM; SV4s: DMSO + SAC + TOC 10 Mm, with thawing in SAC. Each cut, after thawing, was fixed for classical histology and stained with hematoxylin and eosin and observed under 400x optical microscope. Thirteen thousand and five hundred (13,500) PF were analyzed, 6,238 primordial, 6,812 primary and 450 secondary, which were classified as good, regular and bad. It was concluded that DMSO, SAC and TOC may be used in the cryopreservation of bovine females PF. It is recommended to work with DMSO, SAC and 10 TOC mM thawed in MEM and DMSO and SAC thawed in MEM or SAC for PF cryopreservation. The second experiment 51 ovaries of cows were used, been cut, treated, cryopreserved and thawed as described in the first experiment. After thawing, the fragments were mechanically dissociated using maintenance M199 medium and 5% bovine serum albumin in order to, filtrate and subsequently isolates the PF. The viability of PF was examined with trypan blue, dead and alive stained or unstained respectively, and observed under

inverted microscope with increase 400X. Fifteen hundred (1,500) isolated PF were analyzed per treatment, with a total of 13,500 observed. The Results showed that the control, ie, PF without vitrification, differed from all of cryopreserved treatments, thus showing that cryopreservation affect the viability of isolated PF. However, the treatments of vitrification with DMSO, SAC and TOC 10 mM, irrespective of the thawing procedure, showed the best results of viability after cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

A criotecnologia tem sido utilizada para preservação de sêmen, embriões e oócitos maduros (oriundos de folículos antrais), visando à constituição de bancos de germoplasma animal, assegurando dessa forma, a preservação das espécies. Estudos iniciais realizados sobre a foliculogênese têm demonstrado importantes revelações de grande interesse para a reprodução, com expectativa de grande multiplicação de animais de elevado potencial genético e econômico. Vários desses estudos têm sido realizados com folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) (FIGUEIREDO et al., 2002; AMORIM et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004, 2005; SANTOS et al., 2005; SILVA et al., 2005; MATOS et al., 2007).

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) pode ser caracterizada como o estudo do folículo pré-antral, isolado ou não do ambiente ovariano, envolvendo o seu cultivo *in vitro* e a criopreservação (FIGUEIREDO et al., 1993; CARAMBULA et al., 1998). Na maioria dos mamíferos, 90% dos folículos ovarianos são pré-antrais, e aproximadamente 99,9% destes sofrem atresia antes da ovulação, sendo que 0,1% ovularão podendo ou não ser fecundados. A coleta de FOPA pode ser realizada em qualquer idade ou estágio do ciclo estral ou mesmo de animais que morrem subitamente, podendo-se assim, obter grande número de FOPA de qualquer fêmea no decorrer da sua vida (SHAW et al., 2000).

Oócitos inclusos em folículos pré-antrais possuem diversas características que os tornam menos susceptíveis à crioinjúria que oócitos maduros (GOSDEN et al., 1994; SHAW et al., 2000). As características mais importantes são: Menor tamanho do oócito, a baixa taxa metabólica, estágio do ciclo celular, o número restrito de células da granulosa, a ausência de zona pelúcida, pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis às baixas temperaturas que protege o oócito das variações ambientais como no oócito maduro.

A criopreservação de FOPA tem sido realizada *in situ* (COX et al., 1996; NEWTON et al., 1996; LUNA et al., 2007), ou na sua forma isolada em bovinos (FIGUEIREDO et al., 1993) como também em camundongas (CADY et al., 1997; GUANASENA et al., 1997), coelhas (DANIEL et al., 1989), ovinos (AL-AGHBARI & MENINO, 2002), caprinos (SANTOS et al., 2007) e mulheres (NEWTON et al., 1999).

Para Figueiredo et al. (2002), a MOIFOPA tem importância tanto para a pesquisa fundamental ou básica quanto para a reprodução animal. No tocante à pesquisa

fundamental, essa biotécnica poderá contribuir para elucidação dos mecanismos, hoje desconhecidos, implicados na foliculogênese na fase pré-antral. Referente à reprodução animal, no futuro, o isolamento de milhares de FOPA, a partir de um único ovário, e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação, poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em via de extinção por meio do fornecimento de um grande número de oócitos de um mesmo animal, crescidos e maturados *in vitro*, para padronização de biotécnicas como a clonagem, fertilização *in vitro* e transgênese. Por conseguinte, Objetivou-se fazer a vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas bovinas com dimetilsulfóxido e sacarose acrescida de α -tocoferol, avaliando a morfologia de FOPA *in situ* e a viabilidade de FOPA isolados pós-vitrificação.

2. OBJETIVOS

- Testar dimetilsulfóxido, sacarose e α -tocoferol na vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais em fêmea bovina *in situ*.
- Avaliar a adição de um crioprotetor extracelular (sacarose) no descongelamento de folículos pré-antrais em fêmea bovina *in situ* e isolados do tecido ovariano.
- Avaliar a morfologia de folículos pré-antrais de fêmea bovina *in situ* pós-vitrificação.
- Avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais de fêmea bovina isolados do tecido ovariano pós-vitrificação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Oogênese

A oogênese é definida como o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais das fêmeas, culminando em um oócito maduro para ser fecundado, formando o oócito haplóide fecundado (OHF) (RUSSE, 1983). Nos mamíferos, a oogênese tem início durante a vida fetal e desenvolve-se por meses a anos nos animais adultos (WASSARMAN, 1988).

O desenvolvimento ovariano nos mamíferos inicia com as células germinativas primordiais, originadas do saco vitelínico, que migram e invadem a gônada embrionária. A célula germinativa primordial coloniza a gônada primitiva, perde sua motilidade e inicia a gametogênese.

3.2. Foliculogênese

A foliculogênese é definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório. Esse processo é contínuo, com saída diária de folículos do *pool* de reserva, os quais crescem, regridem em sua maioria, similarmente às mudanças que ocorrem para o corpo lúteo, estando, desse modo, o conteúdo ovariano em constante modificação (HAFEZ, 1995).

Ao final da multiplicação mitótica da oogônia, uma camada de células somáticas circunda o oócito primário, formando o folículo primordial. Esses folículos necessitam ser ativados para ter início a fase de crescimento (RUSSE, 1983). Gradualmente, as células da granulosa do folículo primordial tornam-se cúbicas, caracterizando um folículo intermediário (BEZERRA et al., 1998) e, posteriormente, um folículo primário, quando este passa a ser circundado apenas por células cúbicas dispostas em única camada (VAN DEN HURCK et al., 1997). A partir desse momento, ocorre aumento contínuo do oócito e proliferação das células da granulosa, que passam a se dispor em camadas concêntricas ao redor do oócito, formando o folículo secundário. Durante o crescimento dos folículos pré-antrais, observa-se a diferenciação das células tecaais, a formação e o espessamento da zona pelúcida, principalmente nos folículos secundários (HIRSHFIELD, 1989). A expressão de receptores específicos para estrógeno, progesterona e testosterona ocorre entre o estágio de desenvolvimento do folículo secundário terminal e terciário inicial. A fase antral da foliculogênese tem início com a

formação de uma cavidade nos folículos terciários e culmina com a formação do folículo maduro ou de Graaf (BEARDEN & FUQUAY, 1997).

Quanto ao desenvolvimento folicular, este pode ser dividido em três fases: recrutamento, seleção e dominância. O recrutamento parece ocorrer em decorrência de uma elevação transiente de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), a partir da qual um grupo de folículos inicia seu desenvolvimento, determinando a emergência de uma onda folicular (FORTUNE, 2000). Entretanto, dentre os folículos recrutados, apenas um número específico de folículos para cada espécie é selecionado para crescer. Isso se deve a fatores extra e intra-ovarianos, como ambiente hormonal, presença de receptores específicos, nutrição e a ação de fatores de crescimento. Os folículos selecionados a crescer até o tamanho pré-ovulatório são chamados de “dominantes”. As células da granulosa desses folículos produzem inibina, que age aumentando a síntese de estrógeno e, por meio de mecanismo de *feedback* negativo do estrógeno e da inibina na adenohipofise, há um decréscimo na produção do FSH, impedindo o crescimento dos folículos considerados subordinados, ou seja, aqueles com menos receptores para o FSH. Finalmente, o folículo dominante da última onda folicular atinge o tamanho pré-ovulatório e, da ação sinérgica do FSH com o Hormônio Luteinizante (LH), ocorre a liberação do oócito (HAFEZ, 1995).

3.3. Classificação dos folículos pré-antrais

Os folículos ovarianos pré-antrais podem ser classificados de acordo com o diâmetro folicular, ou grau de evolução, observando-se o número de camadas de células da granulosa (CGs), e sua viabilidade, como normais ou atresícos. Nos bovinos, o diâmetro do folículo primordial e seu oócito são, respectivamente, 30-40 e 20-25 μm . O diâmetro dos folículos primários e oócitos são respectivamente, 40-60 e 30-40 μm , e os folículos secundários, em torno de 60-200 μm (BECKER et al., 1996).

Hulshof et al. (1994a) classificaram os folículos pré-antrais em primordiais, primários e secundários, de acordo com diferenças morfológicas, sendo que os folículos primordiais apresentam um oócito rodeado por uma camada de quatro a oito CGs achatadas; os primários mostravam um oócito rodeado por uma camada de onze a doze CGs cuboidais; e os secundários mais de uma camada de CGs cuboidais (esquema descrito na figura 1). Entretanto, Basso & Esper. (2002) que classificaram os folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) caracterizaram folículos primordiais pela presença de oócito esférico ou ovóide, completamente rodeado por

uma camada simples de CGs achatadas, sendo que algumas tendiam à forma cuboidal, e folículos primários foram caracterizados por oócito esférico com uma camada simples de CGs de formato cuboidal. Já os secundários apresentavam duas ou mais camadas de CGs de forma cuboidal.

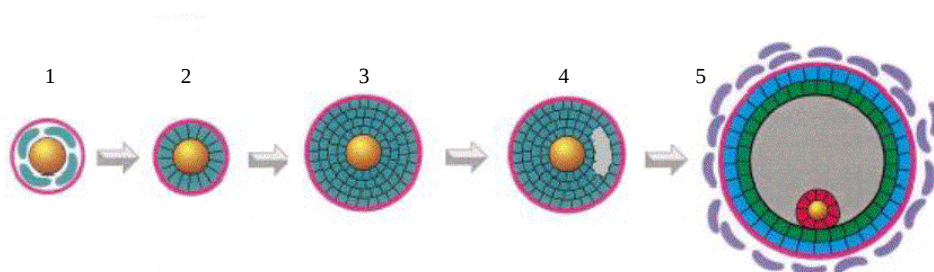


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1. Folículo Primordial; 2. Folículo Primário; 3. Folículo Secundário; 4. Folículo Terciário; 5. Pré-ovulatório (RODGERS et al., 1999).

3.4. População folicular e atresia

No nascimento, as fêmeas de mamíferos apresentam ovários com milhares de folículos primordiais (HIRSHFIELD, 1991), sendo que a população folicular no ovário no nascimento foi estimada em 235.000 folículos em vacas (BETTERIDGE et al., 1998), 420.000 em suínos (GREENWALD & MOOR, 1989), 160.000 em ovelhas (DRIANCOURT et al., 1991), 35.000 em cabras (LUCCI et al., 1999) e 2.000.000 em mulheres (ERICKSON, 1986). No entanto, apenas alguns deles se desenvolvem até o estágio de folículo pré-ovulatório, pois a maioria torna-se atrésico após iniciar o crescimento *in vivo* (EPPIG & O'BRIEN, 1996).

A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica. Segundo Hirshfield (1989), um folículo atrésico pode ser identificado pela presença de picnose e/ou apoptose nas células da granulosa e/ou alterações degenerativas do oócito. A apoptose ou morte celular programada (WYLLIE, 1980; SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI, 1993) já foi demonstrada em folículos (TILLY et al., 1991) e igualmente sugerida como sendo um dos processos da atresia folicular. Independente da fase na qual ocorre e, apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, reduzindo, conseqüentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO et al., 2002).

A atresia parece, portanto, ser um dos processos que controla o número de folículos selecionados para chegar até a ovulação (FIGUEIREDO et al., 2002), ou seja, o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório *in vivo* a partir de folículos pré-antrais é um fenômeno raro porque se considera que, em bovinos, somente um em cada mil folículos primordiais atingirá o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório (IRELAND, 1987).

3.5. Degeneração celular

A degeneração é um tipo de morte celular passiva, que ocorre após agressão com dano severo das membranas, induzida por fatores externos, como a ação degradativa agressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesada, de maneira que ocorre degradação progressiva, com ativação da resposta imunológica. As alterações nucleares aparecem sob três padrões distintos. Primeiro ocorre diminuição da basofilia da cromatina (cariólise), uma alteração que reflete na atividade da DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e aumento da basofilia, quando o DNA aparentemente se condensa em uma massa sólida e basofílica. No terceiro padrão, conhecido como cariorrexe, o núcleo picnótico ou parcialmente picnótico sofre fragmentação (HIRSHFIELD, 1989).

3.6. Apoptose

A apoptose é um processo ativo que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos, nos quais a célula participa de sua própria destruição, seguindo passos pré-determinados. Esse processo é controlado geneticamente e remove células danificadas, que expressam modificações em seu código genético, evitando assim a transmissão de erros, culminando com a fragmentação e fagocitose dos restos celulares, sem ocasionar uma resposta inflamatória (KERR et al., 1972).

3.7. Crioprotetores e Criopreservação

Agentes crioprotetores protegem as células da desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. De modo geral, agentes podem agir: penetrando nas células (crioprotetores intracelulares) e substituindo as moléculas de água da célula; reduzindo o ponto de congelação; protegendo membranas celulares (crioprotetores extracelulares) por meio da sua ligação às cabeças dos grupos

fosfolipídios; aumentando a viscosidade do meio, ou diminuindo a concentração de eletrólitos durante criopreservação, reduzindo, assim, o risco de danos osmóticos. Contudo, agentes crioprotetores podem ser tóxicos, bem como podem facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células (SANTOS, 2007).

O objetivo da criopreservação é garantir que as células permaneçam com baixa taxa metabólica durante determinado período de estocagem, do qual possam ser resgatadas a fim de continuar o seu desenvolvimento normal (GORDON, 1994). O processo de criopreservação envolve basicamente as seguintes etapas: adição de agente crioprotetor (período de equilíbrio/exposição); resfriamento e indução da formação de gelo e congelação ou vitrificação; estocagem em nitrogênio líquido; descongelamento ou aquecimento e remoção ou diluição do agente crioprotetor.

A criopreservação pode ser realizada por dois métodos básicos: congelação convencional ou lenta e vitrificação. A congelação lenta é caracterizada pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de agente crioprotetor (1,5 mol/L) (PAYNTER et al., 1999), por período que pode variar de 20 a 60 minutos (RODRIGUES et al., 2004a; CANDY et al., 1997). Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de 2°C/min. até -4 a -9°C, mantendo-se nessa temperatura por um curto período (10 a 15 minutos) para a estabilização térmica e realização do *seeding*, o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular. Em seguida, a amostra continua sendo resfriada lentamente a uma velocidade de 0,3°C/min. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80°C), o material é estocado em nitrogênio líquido (-196°C).

A vitrificação (formação de estado vítreo) foi idealizada por Luyet em 1937. Depois de quase 50 anos, descreveram a vitrificação como uma alternativa ao processo de congelação lenta (RALL & FAHY, 1985). Ao contrário da congelação lenta, a vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de agente crioprotetor (geralmente entre 4 e 6 mol/L) por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), geralmente à temperatura ambiente, seguido de um resfriamento ultra rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo. De acordo com Stachecki & Cohen (2004), a vitrificação possui dois aspectos básicos a serem considerados: as altas concentrações de agentes crioprotetores utilizadas na exposição aumentam os efeitos tóxicos e, apesar desse efeito durante o período de equilíbrio, a vitrificação, por ser uma congelação rápida, aumenta as taxas de sobrevivência.

Diversos tipos de crioprotetores têm sido utilizados em diferentes concentrações. A escolha do crioprotetor e de sua melhor concentração dependem do procedimento de criopreservação utilizado, da estrutura a ser criopreservada, bem como da espécie animal. Os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular e agem penetrando na célula a fim de interagir e influenciar a dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (DOBRINSKY, 1996). Os crioprotetores utilizados com maior frequência para a criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano são o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol (PROH) e o etilenoglicol (EG). Entretanto, apesar da conhecida ação benéfica desses elementos, deve-se considerar a toxicidade dos mesmos (GOSDEN, 2000), que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de conservação, principalmente quando altas concentrações são empregadas. Para ambos os métodos de criopreservação (congelamento lento e vitrificação), o primeiro passo para uma eficiente preservação consiste na penetração de um crioprotetor nas células (ELMOAZZEN et al., 2005). Dessa forma, para desenvolver um protocolo de criopreservação é necessário determinar a perfusão ideal de cada crioprotetor para a célula a ser preservada.

O procedimento de descongelamento, por sua vez, pode ser realizado de forma lenta ou rápida. O descongelamento rápido, no qual a amostra é retirada do nitrogênio líquido e exposta imediatamente à temperatura ambiente ou mergulhada em banho-maria, é o procedimento mais corretamente utilizado (LIM et al., 1999; ASADA et al., 2000). Entretanto, o descongelamento lento que geralmente utiliza equipamentos por meio de um aumento gradual da temperatura, também tem sido empregado com êxito, apesar de ser mais prejudicial às células criopreservadas (MAZUR et al., 1984). Após o descongelamento, é necessária a remoção do crioprotetor que pode ser realizada em etapas (várias lavagens do material criopreservado) utilizando uma solução isotônica adicionada ou não de um crioprotetor extracelular como a sacarose.

Apesar do sucesso obtido com o completo desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais murinos criopreservados (EPPIG & O'BRIEN, 1996), incluindo o desenvolvimento de folículos congelados-descongelados seguido pela fecundação *in vitro*, desenvolvimento embrionário (SMITZ et al., 1996) e nascimento (LIU et al., 2001; DE LA PEÑA et al., 2002), resultados similares são de difícil obtenção e sucesso em animais domésticos. No entanto, muitos estudos vêm aperfeiçoando o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de animais domésticos, resultando em sua ativação e crescimento (SILVA et al., 2004a, 2006; GIGLI et al., 2006).

3.8. Tocoferol

A vitamina E foi descoberta em 1922 por Herbert Evans e Katherine Bishop. É um nutriente essencial, que age como antioxidante no organismo animal (SEN et al., 2006). Sabe-se que essa vitamina é predominante na membrana plasmática das células animais (BARROSO et al., 1997; WANG et al., 2002;), e que quantidades significativas estão presentes no ovário e no fluido folicular (ATTARAN et al., 2000). O termo vitamina E é um termo genérico para todos os tocoferóis e seus derivados que possuem atividade de tocoferol, ou seja, componentes naturais com atividade semelhante a da vitamina E (TRABER & SIES, 1996).

O α -tocoferol desempenha um importante papel na regulação do processo oxidativo causado pelos radicais livres, sendo a forma mais comum e mais ativa encontrada na natureza (POVALISHEV et al., 2006). A principal função biológica da vitamina E é proteger os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, visto que a peroxidação desses lipídios pode levar a danos estruturais, afetando a função e a permeabilidade destas, resultando em injúrias irreversíveis e morte celular (OLSON & SEIDEL, 2000). A regeneração do α -tocoferol implica na manutenção da concentração dessa substância na membrana celular (SEN et al., 2006).

Souza et al. (1999) indicam que o α -tocoferol pode atuar efetivamente como eliminador de radicais livres, prevenindo assim a apoptose. No entanto, além da excelente atividade antioxidante demonstrada pelo α -tocoferol, sabe-se que essa substância pode, em determinadas situações, agir como pró-oxidante.

Estudos verificaram que o α -tocoferol em excesso pode inibir a proliferação celular, efeito que não está relacionado com sua ação antioxidante, possivelmente mostrando interações específicas do α -tocoferol com enzimas, proteínas estruturais, lipídios e fatores transcricionais (ZING & AZZI, 2004).

3.9. Importância do isolamento e cultivo de folículos pré-antrais

Várias vantagens do emprego atual e/ou futuro da biotécnica de MOIFOPA podem ser relacionadas, tais como: aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico ou em perigo de extinção; redução do intervalo de gerações; recuperação de rebanhos eliminados por problemas sanitários; utilização de ovários de animais que não respondem a tratamentos de superovulação; utilização de ovários de animais portadores de patologias adquiridas (não-congênicas) de ovidutos e/ou útero; obtenção de descendentes de um animal mesmo após a sua morte; otimização da

3.10. Isolamento de FOPA *in vitro*

Existem basicamente três tipos de isolamento de folículos pré-antrais: isolamento mecânico (FIGUEIREDO et al., 1993; HULSHOF et al., 1994; WANDJI et al., 1996a); digestão proteolítica pelo uso de enzimas (GREENWALD & MOOR, 1989; FIGUEIREDO et al., 1993; DURRANT et al., 1998; MACHADO et al., 2002); e isolamento mecânico em associação com dissociação enzimática parcial (FIGUEIREDO et al., 1993; CARAMBULA et al., 1996; OKTAY et al., 1997).

O princípio dos métodos de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina) utilizando instrumentos mecânicos, associados ou não, aos químicos ou enzimáticos. Nos procedimentos mecânicos, os equipamentos mais utilizados são o *tissue chopper* (FIGUEIREDO et al., 1993), mixer (NUTTINCK et al., 1993), tesouras cirúrgicas (CARAMBULA et al., 1996), pequenos fórceps (HULSHOF et al., 1994) e agulhas dissecantes (TORRANCE et al., 1989; JEWGENOW & PITRA, 1993; JEWGENOW, 1996). Em contraste aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos têm sido mais comumente usados para o isolamento de folículos pré-antrais de ovários bovinos (FIGUEIREDO et al., 1993; NUTTINCK et al., 1993a; HULSHOF et al., 1994; KATSKA & RYNSKA, 1998), caprinos (RODRIGUES et al., 1998ab; LUCCI et al., 1999), ovinos (AMORIM et al., 2000) e felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993).

Carambula et al. (1996) isolaram folículos pré-antrais de fetos bovinos utilizando uma tesoura cirúrgica, realizaram cortes sucessivos dentro de um tubo de centrífuga, fragmentando os ovários de maneira uniforme. Basso (2001) isolou cerca de 326 folículos pré-antrais do ovário de feto bovino e em média 178 folículos pré-antrais de vaca adulta utilizando o método mecânico. Já Basso & Esper (2002) isolaram mecanicamente pelo *Tissue Chopper* 35.539,20 folículos pré-antrais por vaca da raça Nelore (*Bos taurus indicus*).

Com relação aos procedimentos enzimáticos, as enzimas proteolíticas mais utilizadas são a collagenase, tripsina e pronase, sendo a primeira empregada na maioria dos trabalhos, pois tem se mostrado mais eficiente e menos deletéria aos oócitos. Métodos enzimáticos de isolamento de FOPA foram descritos não apenas em animais de laboratório como: camundongos (EPPIG, 1976; 1977; TORRANCE et al., 1989; CARROLL et al., 1991a,b), ratos (DANIEL et al., 1989), hamsters (ROY &

GREENWALD, 1985) coelhos (NICOSIA et al., 1975). Mas também em: suínos (GREENWALD & MOOR, 1989; HIRAO et al., 1994), cães (BOLAMBA et al., 2002) felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993), fetos bovinos (CARAMBULA et al., 1996), fetos ovinos (CARAMBULA et al., 1996), fetos caprinos (MACHADO et al., 2002) e humanos (ROY & TREACY, 1993).

Em contraste aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos têm sido usados com mais frequência para o isolamento de folículos pré-antrais de ovários bovinos (FIGUEIREDO et al., 1993; NUTTINCK et al., 1993; HULSHOF et al., 1994; KATSKA & RYNSKA, 1998), caprinos (RODRIGUES et al., 1998ab; LUCCI et al., 1999), ovinos (AMORIM et al., 2000) e felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização e delineamento experimental

O estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal no Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa - UFV. Foram utilizados ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça e idades definidas e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em abatedouro localizado a 60 km.

As variáveis qualitativas relacionadas à morfologia do folículo pré-antral foram submetidas ao teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis (SAEG, 1999), e a variável qualitativa “viabilidade do folículo pré-antral” foi comparada em tabela de contingência e analisada pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

4.2. Coleta e manipulação

Foram utilizados 117 ovários de fêmeas bovinas. Sendo que, 66 ovários foram coletados no experimento I para o estudo da morfologia de FOPA *in situ* e no experimento II, se utilizaram 51 ovários para o estudo da viabilidade de FOPA isolados.

Os ovários foram removidos e imersos em garrafa térmica com solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl¹) acrescentada de sulfato de estreptomicina² (COENEN, 1993), em temperatura variando de 35 a 38 °C. No laboratório, os ovários foram imersos em outra solução fisiológica de (NaCl¹) acrescida de sulfato de estreptomicina² em 4°C. Após essa etapa, retirou-se duas porções de cada ovário que foram seccionados com tesouras e lâminas de bisturi sentido cortiço-medular, umidificados durante a fragmentação com meio essencial mínimo (MEM)³ acrescido de 5% de albumina sérica bovina⁴ (FIGUEIREDO et al., 2002).

4.3. Experimento I. Estudo da morfologia: vitrificação, descongelamento e histologia de folículos ovarianos pré-antrais de fêmea bovina *in situ*.

Os fragmentos foram distribuídos aleatoriamente em nove tratamentos, representados pelo controle (fixado a fresco) e quatro soluções de vitrificação (SV) com dois tipos de descongelamento cada, representados da seguinte maneira: **SV1m⁵**: Dimetilsulfóxido (DMSO), com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM);

¹ Cloreto de sódio NaCl 0,9 % (9 g / L de NaCl em água Miliq) Veltec, Brasil. ² Sulfato de estreptomicina (50 mg/L de NaCl) Veltec, Brasil. ³ MEM (9,5 g/L de MEM em água Miliq), Cultilab, Brasil. ⁴ Albumina sérica bovina-BSA (100 g/ L de BSA em água Miliq), Veltec, Brasil.

SV1s⁵: DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m**⁶: DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s**⁶: DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m**⁷: DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s**⁷: DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m**⁸: DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s**⁸: DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das soluções de vitrificação e descongelamento para os diferentes tratamentos.

Tratamentos	COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE VITRIFICAÇÃO					DESCONGELAMENTO	
	MEM	DMSO 5 M	SAC 0,5 M	TOC 5 mM	TOC 10 mM	SAC	MEM
SV1s	X	X				X	
SV1m	X	X					X
SV2s	X	X	X			X	
SV2m	X	X	X				X
SV3s	X	X	X	X		X	
SV3m	X	X	X	X			X
SV4s	X	X	X	X	X	X	
SV4m	X	X	X	X	X		X

Solução de vitrificação (SV); Dimetilsulfóxido (DMSO); Sacarose (SAC); Tocoferol (TOC); Meio essencial mínimo (MEM) SV1m (solução de vitrificação 1 descongelada com MEM) SV1s (solução de vitrificação 1 descongelada com SAC).

4.3.1. Vitrificação

Foram utilizados criotubos (tampa com rosca externa, volume de 2 mL, fundo cônico), para o processo de vitrificação, depositaram-se os fragmentos do tecido ovariano e adicionaram-se 1,8 mL da solução de vitrificação, seguido por um período de equilíbrio de 5 minutos à temperatura ambiente (25°C). Ao término desse período, tubos foram imersos verticalmente em racks em nitrogênio líquido (-196°C) durante uma semana (RALL & FATHY, 1985; STACHECKI et al., 2004).

utilização de biotécnicas como a Fertilização *in vitro* (FIV), clonagem, transgênese e transferência de embriões; pesquisa fundamental: fonte abundante de informações a respeito da foliculogênese na fase pré-antral; formação de recursos humanos e formação de bancos de germoplasma (FIGUEIREDO et al., 1993).

⁵SV1: (355 mL de DMSO 5 M + 645 mL de MEM/L de solução), ⁶SV2: (355 mL DMSO 5,0 M + 171 g de SAC 0,5M + 474 mL de MEM/L de solução) ⁷SV3: (355 mL DMSO 5,0 M + 171 g SAC 0,5M + TOC 5 mM 0,236 g + 473 mL de MEM/L de solução) ⁸SV4: (355 mL DMSO 5,0 M + 171 g SAC 0,5M + TOC 10 mM 4,73 g + 469 de MEM/L de solução). ¹⁰ Meio essencial mínimo MEM (10 g / L de água Miliq).

4.3.2. Descongelamento

Criotubos foram expostos por um minuto à temperatura ambiente de 25°C, e imersos em água previamente aquecida em banho-maria a 37°C até completo descongelamento. Posteriormente, fragmentos foram distribuídos para descongelamento total com MEM ou MEM acrescido de concentrações decrescentes de sacarose, distribuídos da seguinte forma: MEM + SAC 0,5 M; MEM + SAC 0,25 M; e MEM sem SAC (SANTIN ET AL., 2009). Após as lavagens, foram fixados em solução de formol a 4% e destinados a processo histológico, como apresentado na figura 2.

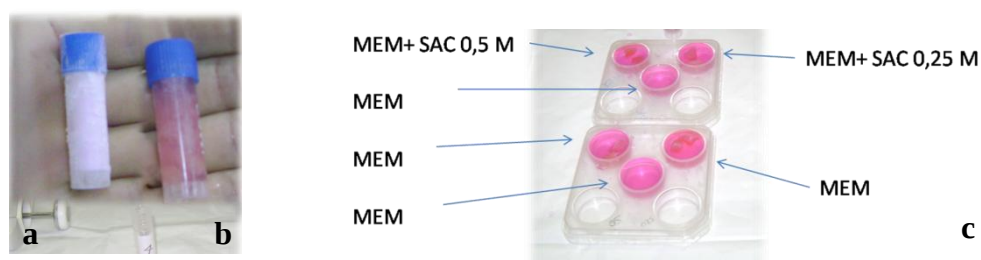


Figura 2. Descongelamento de folículos pré-antrais em tecido ovariano de fêmea bovina: a) retirados de nitrogênio líquido (-196°C) e expostos à temperatura ambiente (25°C), b) descongelamento total dos fragmentos pela exposição ao banho-maria a 37°C, c) distribuição dos fragmentos em cada tipo de descongelamento por tratamento, MEM: meio essencial mínimo, SAC: sacarose, M: mol.

4.3.3. Histologia clássica

Após fixação em solução de formol a 4% por 12 horas, os fragmentos, sofreram desidratação com soluções alcoólicas crescentes (70, 80, 90 e 100%), permanecendo 30 minutos em cada concentração de álcool. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados por 30 minutos em xilol e, após uma hora, inclusos em parafina. Em seguida, fizeram-se blocos de parafina (dois cortes do fragmento foram colocados por lâmina) e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (VAN DEN HURK et al., 1998; VENDOLA et al., 1998; NILSON & SKIMMER, 2002; MARTINEZ et al., 2004). As lâminas foram examinadas com um microscópio óptico com aumento de 400x com um total de 50 folículos pré-antrais observados por cada lâmina com 30 repetições (1500 FOPA por tratamento).

4.3.4. Classificação de folículos pré-antrais

Os folículos pré-antrais foram analisados segundo Basso & Esper (2002), que classificaram os folículos pré-antrais de vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*), definindo os folículos primordiais como oócitos esféricos ou ovóides, completamente rodeados por uma camada simples de células da granulosa (CGs) achatadas, sendo que algumas tinham forma cuboidal; os folículos primários foram caracterizados como oócitos esféricos com uma camada simples de CGs de formato cuboidal; e os folículos secundários como oócitos esféricos apresentando duas ou mais camadas de CGs de forma cuboidal, (como descrito na figura 3).

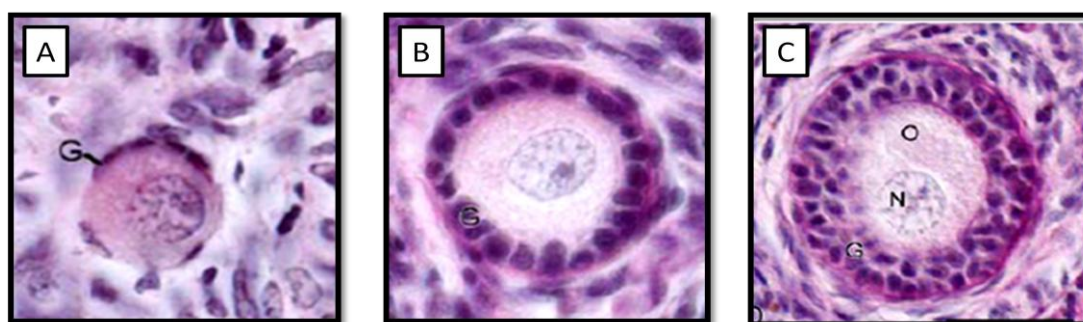


Figura 3. Corte de fragmento ovariano corado pelo Ácido Periódico-Schiff Hematoxilina mostrando classificação de FOPA. (A) folículo primordial, (B) folículo primário, (C) folículo secundário. O: oócito; N: núcleo do oócito; G: células da granulosa, (SILVA et al., 2004b).

A avaliação qualitativa dos folículos foi baseada na integridade do oócito e das células da granulosa, sendo os folículos classificados morfológicamente como: **bons** (folículos contendo oócito e células da granulosa intactas); **regulares** (folículos apresentando retração citoplasmática e/ou núcleo do oócito picnótico); **ruins** (folículos apresentando degeneração oocitária acompanhada por desorganização das células da granulosa) (figura 4). Baseando-se na classificação e qualificação FOPA, foram denominados assim: FOPA primordiais bons (PBO), primordiais regulares (PRE), primordiais ruins (PRU), primários bons (PABO), primários regulares (PARE), primários ruins (PARU), e secundários bons (SBO), secundários regulares (SRE) e secundários ruins (SRU) (Processo descrito na figura 5).

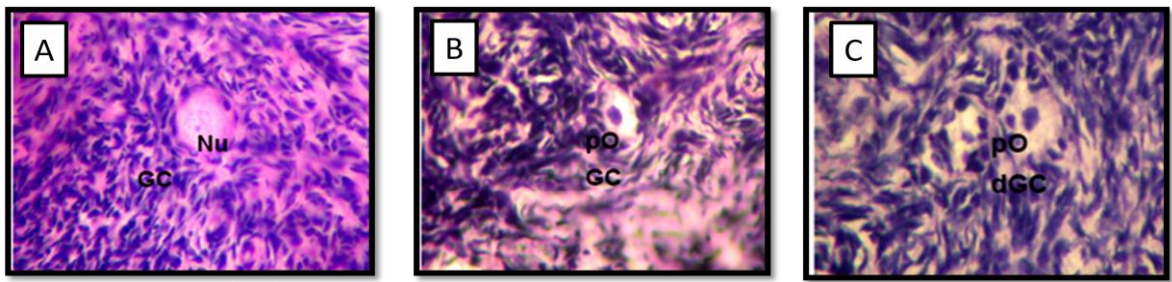


Figura 4. Corte de fragmento ovariano corado pelo Ácido Periódico-Schiff Hematoxilina mostrando qualificação de FOPA. (A) Folículo normal, (B) folículo degenerado, (C) folículo degenerado. O: oócito; Nu: núcleo do oócito; GC: células da granulosa; pO: oócito picnótico; dGC: célula da granulosa degenerada. (FERNANDES et al., 2005).

4.4. Experimento II: Viabilidade de folículos pré-antrais de fêmea bovina isolados do tecido ovariano pós-vitrificação.

No Experimento II, 51 ovários foram trabalhados para viabilidade FOPA, processos de coleta, manipulação, vitrificação e descongelamento. Foram realizados da mesma forma como descrito na experimento I.

4.4.1. Isolamento mecânico

4.4.1.1. Dissociação mecânica dos fragmentos ovarianos

Fragmentos de tecido ovariano pós-descongelamento foram finamente fragmentados com lamina de bisturi e colocados em tubos Falcon de 50 mL, com 10 mL de MEM acrescido de 5% de albumina sérica bovina (FIGUEIREDO et al., 2002). Realizou-se dissociação mecânica através de repetidos movimentos de sucção e ejeção (cinquenta vezes) utilizando-se pipetas de 1000µm e 600µm de diâmetro.

4.4.1.2. Separação de folículos isolados por meio de filtração simples

Após a dissociação mecânica, a suspensão obtida na etapa anterior foi filtrada duas vezes em peneiras de tela em aço inox. A primeira filtração reteve partículas maiores de 300µm e a segunda maiores de 106µm. Isso foi feito para se obter uma solução com folículos pré-antrais isolados menores que 106µm e, posteriormente, analisou-se a viabilidade com azul de trypan.

4.4.1.3. Análise da viabilidade.

A cada 100µL de meio de suspensão contendo FOPA isolados, foram adicionados 5µL do corante azul de trypan 0,4%. Foram classificados em viáveis ou não-viáveis quando não corados ou corados em azul respectivamente. Foram observados no microscópio invertido, onde uma quantidade de cinquenta FOPA por tratamento foi observada, sendo repetidos 30 vezes cada. Processo se apresentado na figura 6 e 7.

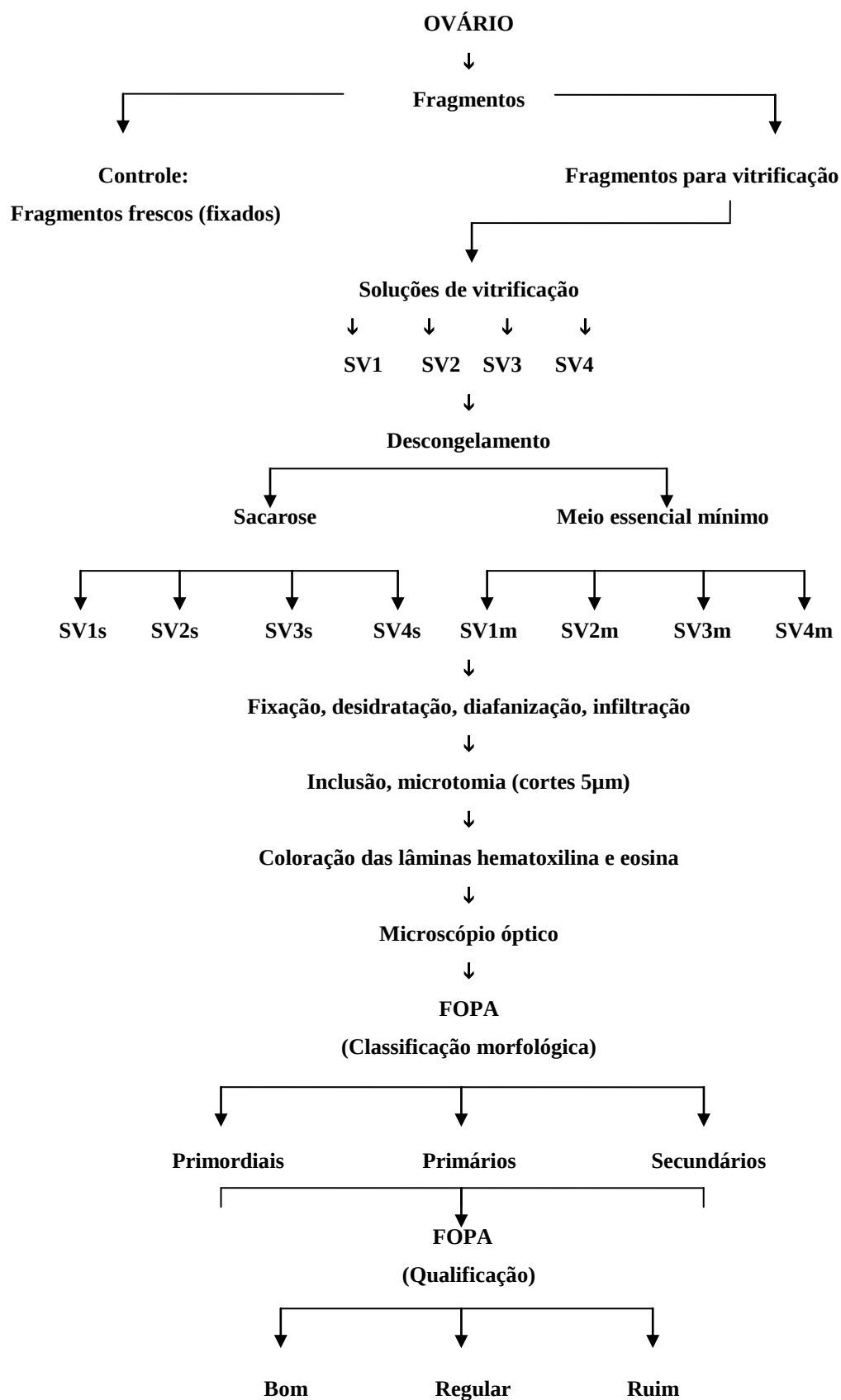


Figura 5. Processo histológico de folículos ovarianos pré-antrais em tecido de fêmeas bovinas.

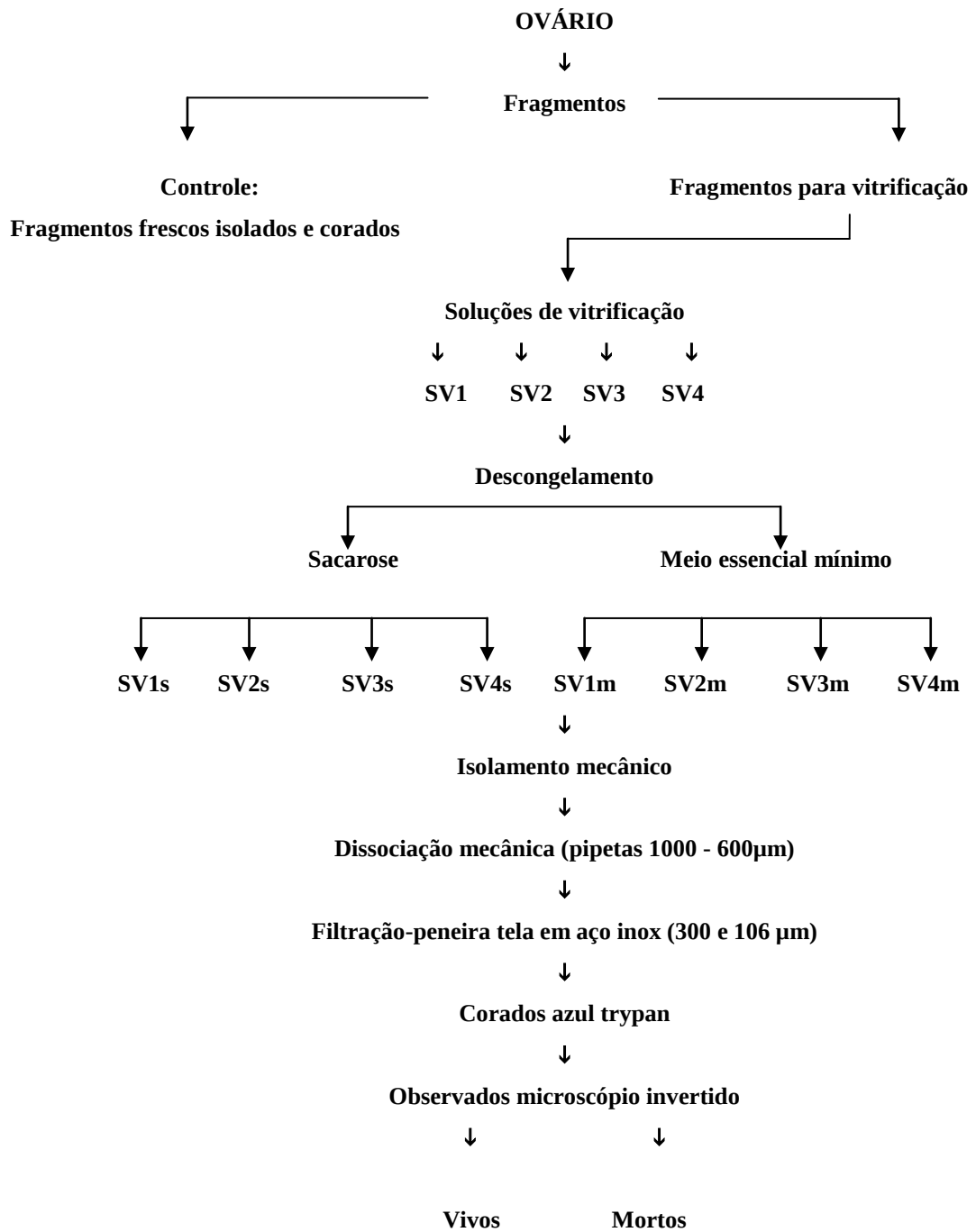


Figura 6. Processo de isolamento mecânico pós-vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais.

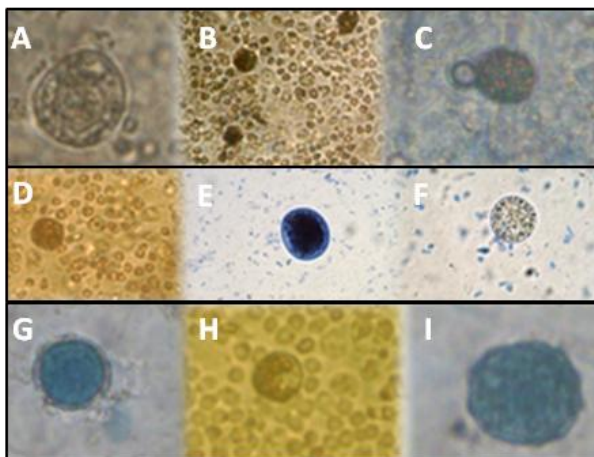


Figura 7. Folículos pré-antrais corados com azul trypan, viáveis (A,B,C,D,F,H) e inviáveis (E,G,I); com vários aumentos no microscópio invertido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I. Estudo da morfologia, vitrificação, descongelamento e histologia de folículos ovarianos pré-antrais em fêmea bovina *in situ*.

5.1.1. Morfologia de folículos pré-antrais

Foram avaliados 9 tratamentos (50 observações e 30 repetições por tratamento), para um total de 13.500 FOPA *in situ* analisados histologicamente no microscópio óptico com aumento de 400x (tabela 2).

Tabela 2. Contagem de folículos ovarianos pré-antrais de fêmea bovina classificados em primordiais, primários e secundários, e qualificados em bons, regulares e ruins.

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS					
	Classificados		Qualificados		
	Número	%	Número	%	% Total
Primordiais					
Bom (PBO)			3544	56,8	26,3
Regular (PRE)	6.238	46,2	1750	28,1	13
Ruim (PRU)			944	15,1	7
Primários					
Bom (PABO)	6.812	50,5	2714	39,8	20,1
Regular (PARE)			2411	35,4	17,9
Ruim (PARU)			1687	24,8	12,5
Secundários					
Bom (SBO)	450	3,3	137	30,4	1
Regular (SRE)			223	49,6	1,7
Ruim (SRU)			90	20	0,7
Total	13.500	100	13.500	100	100

Primordiais bons (PBO), primordiais regulares (PRE), primordiais ruins (PRU), primários bons (PABO), primários regulares (PARE), primários ruins (PARU), secundários bons (SBO), secundários regulares (SRE), secundários ruins (SRU).

Luna et al. (2007, 2008) analisaram 340 e 523 FOPA de tecido ovariano bovino e encontraram 242 e 188 primordiais e 98 e 335 primários respectivamente, e os secundários não foram analisados devido a seu número reduzido encontrado. O alto número de FOPA analisados no presente estudo possibilitou avaliar a classificar a qualidade de todos os tipos de FOPA. De acordo com Santos et al. (2006), os folículos primordiais apresentam maiores chances de resistirem aos processos de criopreservação. Por outro lado, Gandolfi et al. (2006) indicaram que folículos primordiais são mais

susceptíveis ao processo de criopreservação. Esses resultados diferem de Lucci et al. (2004), que não encontraram diferença nas classes de folículos ovarianos bovinos, ou seja, primordiais, primários e secundários, quando criopreservados.

Tabela 3. Dados dos folículos ovarianos pré-antrais primordiais, qualificados em bons, regulares e ruins entre os tratamentos.

MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMORDIAIS						
TRATAMENTOS	PBO	%	PRE	%	PRU	%
Controle	489	13,8	159	9,1	61	6,5
SV1m	395	11,1	233	13,3	141	14,9
SV1s	311	8,8	191	10,9	121	12,8
SV2m	338	9,5	165	9,4	61	6,5
SV2s	532	15	181	10,3	88	9,3
SV3m	378	10,7	239	13,7	154	16,3
SV3s	345	9,7	197	11,3	98	10,4
SV4m	448	12,6	180	10,3	114	12,1
SV4s	308	8,7	205	11,7	106	11,2
TOTAL	3544	100	1750	100	944	100

SV1m: dimetilsulfóxido (DMSO), com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM); **SV1s:** DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC.

5.1.2. Folículos pré-antrais primordiais

Os valores médios e percentuais obtidos para a classe de FOPA primordiais avaliados qualitativamente (bons, regulares e ruins), estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Observou-se que os valores obtidos para FOPA-PBO dos tratamentos SV1s (311;8,8%), SV2m (338;9,5%) e SV4s (308;8,7%) diferiram ($P < 0,05$) do valor do tratamento controle (489;13,8%) não sendo observada diferença para os demais tratamentos.

Para a classe de FOPA regulares, os tratamentos SV1m (233;13,3%) e SV3m (239;13,7%) diferiram ($P < 0,05$) dos demais. E na classe de FOPA ruins também foram observados valores altos desses folículos: SV1m (141;14,9%) e SV3m (154;16,3). E os tratamentos SV1s e SV4m diferiram ($P < 0,05$) do tratamento controle e dos demais tratamentos do estudo (tabelas 2 e 3).

Tabela 4. Diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primordiais bons, regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMORDIAIS BONS (PBO)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	489	395	311**	338*	532	378	345	448	308**
SV1m	0	0	311	338	532	378	345	448	308
SV1s			0	338	532**	378	345	448*	308
SV2m				0	532**	378	345	448	308
SV2s					0	378*	345**	448	308**
SV3m						0	345	448	308
SV3s							0	448	308
SV4m								0	308*
SV4s									0
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMORDIAIS REGULARES (PRE)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	159	233*	191	165	181	239*	197	180	205
SV1m	0	0	191	165	181	239	197	180	205
SV1s			0	165	181	239	197	180	205
SV2m				0	181	239	197	180	205
SV2s					0	239	197	180	205
SV3m						0	197	180	205
SV3s							0	180	205
SV4m								0	205
SV4s									0
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMORDIAIS RUINS (PRU)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	61	141**	121*	61	88	154**	98	114*	106
SV1m	0	0	121	61**	88	154	98	114	106
SV1s			0	61	88	154	98	114	106
SV2m				0	88	154**	98	114**	106
SV2s					0	154	98	114	106
SV3m						0	98	114	106
SV3s							0	114	106
SV4m								0	106
SV4s									0

*Significativo a 5% ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-wallis. ** Significativo a 1% pelo teste de Kruskal-wallis.
SV1m: dimetilsulfóxido (DMSO), com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM); **SV1s:** DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em SAC.

Analisando os resultados dos FOPA primordiais qualificados em bons, regulares e ruins, observou-se que, dentre os nove tratamentos, dois se destacaram com bons resultados. O tratamento SV2s e SV4m apresentaram o melhor resultado em produção e qualidade sem diferença ($P>0,05$) do controle nas três qualificações. Por conseguinte, a adição de níveis de α -tocoferol na solução de vitrificação ajuda manter a qualidade morfológica desses folículos. Como também, a utilização de protetores extracelulares como SAC na vitrificação e descongelamento mostrou um procedimento que favorece a sustentação da qualidade dessas estruturas como se observou no tratamento SV2s, Verificando estudos com ovinos que mostraram que FOPA desta espécie podem ser vitrificados com sucesso utilizando etilenoglicol 40% ou DMSO 40% em combinação com sacarose 0,5M. (FIGUEIREDO et al., 2002).

Deste modo, o descongelamento com crioprotetor extracelular SAC ajuda a evitar o choque térmico e beneficia a célula em sua estrutura pós-vitrificação e pós-descongelamento. Porém, o tratamento SV4s com o mesmo tipo de descongelamento (SAC) prejudicou a qualidade e quantidade dos FOPA, observando-se nos resultados que teve interferência no método de descongelação já que a mesma solução de vitrificação, mas com descongelamento com MEM (SV4m) teve desempenho satisfatório igual ao SV2s. Concluindo-se que, a utilização de sacarose na vitrificação e no descongelamento, melhora a qualidade dos FOPA e adicionando antioxidantes sem o crioprotetor extracelular no descongelamento se podem obter os mesmos resultados, podendo-se utilizar um ou outro dependendo o objetivo de estudo. Porém, a utilização de mais estudos e mais técnicas de validação, serão de alta utilidade para comprovar sua eficácia (Tabela 3 e 4). Rall (1987) e Dhali et al (2000) observaram efeito deletério dos crioprotetores, em função da exposição a altas concentrações, que têm características tóxicas, a associação de diferentes crioprotetores intracelulares e extracelulares como a sacarose, é uma alternativa para melhorar a resposta na vitrificação.

Nos tratamentos SV3m e SV3s, verificou-se o efeito do α -tocoferol sobre as soluções de vitrificação, indicando respostas estáveis no estudo na fase de FOPA PBO, não diferindo ($P>0,05$) do controle, mas com diferença ($P<0,05$) do tratamento SV2s, sendo este o melhor tratamento de vitrificação junto com o SV4m. Este por sua vez, não teve diferença estatística ($P>0,05$) com os tratamentos SV3m e SV3s, indicando, que o α -tocoferol tem efeito positivo na vitrificação de FOPA. Entretanto, não são encontrados registros técnicos na espécie bovina de estudos relacionados ao efeito do α -tocoferol na criopreservação de FOPA. É importante ressaltar esse tipo de estudos para

auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas que possam ajudar na criopreservação de FOPA. Rodrigues et al, (2004) mostraram que folículos primordiais criopreservados com glicerol, etilenglicol, DMSO e propanodiol na concentração de 1,5M resultaram aproximadamente 50% de folículos viáveis.

Na análise geral dos tratamentos SV1m e SV1s, verificou-se resultados insatisfatórios e muito variáveis para as três qualidades estudadas, indicando que se faz necessária a adição de outros componentes na solução de vitrificação para melhorar a qualidade morfológica.

5.1.3. Resultados de folículos pré-antrais primários

Os valores obtidos para a classe de FOPA primários em total foi 6.812, dos quais 2.714 (39,9%) FOPA-PABO; 2.411 (35,4%) FOPA-PARE; e 1.687 (24,8%) FOPA-PARU (Tabela 1).

Tabela 5. Folículos ovarianos pré-antrais primários, qualificados em bons, regulares e ruins entre os tratamentos (controle e vitrificação).

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMÁRIOS						
TRATAMENTOS	PABO	%	PARE	%	PARU	%
Controle	330	12,2	258	10,7	125	7,4
SV1m	276	10,2	218	9	198	11,7
SV1s	335	12,3	287	11,9	223	13,2
SV2m	378	13,9	289	12	215	12,7
SV2s	303	11,2	252	10,5	123	7,3
SV3m	255	9,4	253	10,5	167	9,9
SV3s	304	11,2	292	12,1	219	13
SV4m	278	10,2	239	9,9	192	11,4
SV4s	255	9,4	323	13,4	225	13,3
TOTAL	2714	100	2411	100	1687	100

Primários bons (PABO), primários regulares (PARE), primários ruins (PARU). **SV1m:** dimetilsulfóxido (DMSO), com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM); **SV1s:** DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em SAC.

Analísaram-se as três qualidades (bom, regular e ruim) nos FOPA primários dentre todos os tratamentos. Somente SV3s, SV4s e SV1s com tipo de descongelamento SAC (tabela 5 e 6) diferenciou-se ($P < 0,05$) do tratamento controle (por suas altas produções de FOPA, PARE e PARU), não sendo observada diferença para os demais tratamentos do estudo. Entretanto, os tratamentos SV2m (378/13,9%) e SV2s

(303/11,2%) e SV4m (278/10,2%) apresentaram as três qualificações (bom, regular e ruim) respostas satisfatórias na produção de FOPA–PABO e baixas de FOPA–PARE e PARU, não diferindo ($P>0,05$) do controle. Porém, da mesma forma, os tratamentos SV1, SV3 descongelado com MEM, tiveram respostas satisfatórias para as três qualificações e não diferiram ($P>0,05$) do controle. Mas, suas quantidades foram inferiores que as três qualidades anteriormente citadas. (tabelas 5 e 6).

Dessa maneira, os crioprotetores DMSO E SAC têm um bom desempenho pós-vitrificação nos FOPA primários, coincidindo com os FOPA primordiais. De acordo com FUKU et al. (1992), DMSO, propanodiol e etilenoglicol possuem maior permeabilidade à membrana celular que o glicerol, levando a menores taxas de FOPA viáveis quando o último é utilizado. Com relação ao tipo de descongelamento nos tratamentos de vitrificação, os FOPA primários afetaram-se mais no tipo de descongelamento entre tratamentos que os FOPA primordiais. Observou-se que o SAC foi menos efectivo que quando se utilizou o MEM na maioria dos tratamentos, com exceção em SV2s (tabelas 5 e 6). Então, o meio de descongelamento com sacarose, dependendo de outros componentes na solução de vitrificação pode prejudicar a morfologia dos folículos primários, mas não prejudicam a morfologiadados folículos primordiais.

Segundo Hotamisligil (1996) as deformações encontradas nos folículos primários podem ser atribuídas às diferenças de pressões osmóticas entre o ambiente intra e extracelular, exercidas pelos crioprotetores que levam à mudança de volume dos oócitos que, por sua vez, pode causar danos na membrana plasmática e organelas.

Especificamente em pequenos ruminantes, diversos autores demonstraram que o DMSO tem apresentado bons resultados no que se refere à criopreservação de tecido ovariano (AMORIM et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004b; SANTOS et al., 2005). Em humanos, a primeira gestação obtida a partir de oócitos congelados/descongelados foi observada quando a técnica de congelação lenta foi empregada e o DMSO utilizado como crioprotetor (CHEN, 1986).

Tabela 6. Diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primários bons, regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMÁRIOS (PABO)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	330	276	335	378	303	255	304	278	255
SV1m		0	335	378	303	255	304	278	255
SV1s			0	378	303	255	304	278	255
SV2m				0	303	255	304	278	255
SV2s					0	255	304	278	255
SV3m						0	304	278	255
SV3s							0	278	255
SV4m								0	255
SV4s									0
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMÁRIOS REGULARES (PARE)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	10,7	9	11,9	12	10,5	10,5	12,1	9,9	13,4*
SV1m		0	11,9	12	10,5	10,5	12,1	9,9	13,4
SV1s			0	12	10,5	10,5	12,1	9,9	13,4
SV2m				0	10,5	10,5	12,1	9,9	13,4
SV2s					0	10,5	12,1	9,9	13,4
SV3m						0	12,1	9,9	13,4
SV3s							0	9,9	13,4
SV4m								0	13,4
SV4s									0
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS PRIMÁRIOS RUINS (PARU)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	7,4	11,7	13,2*	12,7	7,3	9,9	13,0*	11,4	13,3*
SV1m		0	13,2	12,7	7,3	9,9	13	11,4	13,3
SV1s			0	12,7	7,3	9,9	13	11,4	13,3
SV2m				0	7,3	9,9	13	11,4	13,3
SV2s					0	9,9	13,0*	11,4	13,3*
SV3m						0	13	11,4	13,3
SV3s							0	11,4	13,3
SV4m								0	13,3
SV4s									0

*Significativo a 5% ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-wallis. ** Significativo a 1% ($P < 0,01$), pelo teste de Kruskal-wallis. Primários bons (PABO), primários regulares (PARE), primários ruins (PARU). **SV1m:** dimetilsulfóxido (DMSO), com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM); **SV1s:** DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em SAC.

5.1.4. Folículos pré-antrais secundários

Foram analisados 450 FOPA secundários de bovinos, dos quais 137 FOPA-SBO, 223 FOPA-SRE e 90 FOPA-SRU. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos (tabelas 8 e 9), podendo-se entender que todos eles, inclusive o tratamento controle, se comportaram uniformemente para quantidade e qualidade nos FOPA-secundários. Em bovinos e outras espécies é de grande importância a produção e criopreservação de folículos secundários, porque até hoje, tem sido obtido em cultivo *in vitro* um folículo antral a partir de folículos secundários (GUTIERREZ et al., 2000).

Tabela 7. Dados dos folículos ovarianos pré-antrais secundários, qualificados em bons, regulares e ruins entre os tratamentos.

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS						
TRATAMENTOS	SBO	%	SER	%	SRU	%
Controle	21	15,3	43	19,3	14	15,6
SV1m	7	5,1	19	8,5	13	14,4
SV1s	8	5,8	16	7,2	8	8,9
SV2m	23	16,8	23	10,3	8	8,9
SV2s	8	5,8	12	5,4	1	1,1
SV3m	12	8,8	30	13,5	12	13,3
SV3s	12	8,8	24	10,8	9	10
SV4m	18	13,1	28	12,6	3	3,3
SV4s	28	20,4	28	12,6	22	24,4
TOTAL	137	100	223	100	90	100

Secundários bons (SBO), secundários regulares (SRE), secundários ruins (SRU). **SV1m:** dimetilsulfóxido (DMSO), com descongelamento em meio essencial mínimo (MEM); **SV1s:** DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em SAC.

A vitrificação de FOPA bovino *in situ* pode ser utilizada com sucesso, Santos et al. (2007) relataram que a vitrificação de tecido ovariano vem sendo utilizada em algumas espécies, dentre elas, a caprina, na qual a preservação tecidual adequada foi obtida com o uso de técnicas de vitrificação. Ishijima et al. (2006), usando como único crioprotetor DMSO a 2M, acetamida a 1M e propileno-glicol a 3M, obtiveram bons resultados na vitrificação de fragmentos ovarianos de cães, mostrando assim que a associação de crioprotectores é uma alternativa que deve ser considerada.

Tabela 8. Diferenças estatísticas de folículos pré-antrais secundários bons, regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.

FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS BONS (SBO)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
CONTROLE	21	7	8	23	8	12	12	18	28
SV1m	0	0	8	23	8	12	12	18	28
SV1s			0	23	8	12	12	18	28
SV2m				0	8	12	12	18	28
SV2s					0	12	12	18	28
SV3m						0	12	18	28
SV3s							0	18	28
SV4m								0	28
SV4s									0
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS REGULARES (SRE)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
CONTROLE	43	19	16	23	12	30	24	28	28
SV1m	0	0	16	23	12	30	24	28	28
SV1s			0	23	12	30	24	28	28
SV2m				0	12	30	24	28	28
SV2s					0	30	24	28	28
SV3m						0	24	28	28
SV3s							0	28	28
SV4m								0	28
SV4s									0
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS RUINS (SRU)									
TRATAMENTOS	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
CONTROLE	14	13	8	8	1	12	9	3	22
SV1m	0	0	8	8	1	12	9	3	22
SV1s			0	8	1	12	9	3	22
SV2m				0	1	12	9	3	22
SV2s					0	12	9	3	22
SV3m						0	9	3	22
SV3s							0	3	22
SV4m								0	22
SV4s									0

*Significativo a 5% ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-wallis. ** Significativo a 1% ($P < 0,01$), pelo teste de Kruskal-wallis primários bons (PBO), primordiais regulares (PRE), primordiais ruins (PRU). **SV1s:** DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC.

Entende-se que melhorias nos protocolos de vitrificação de fragmentos de tecido ovariano bovino podem ser implementadas, como: redução dos fragmentos (o que favorece a entrada e difusão do soluto); redução do tempo de exposição aos crioprotetores; uso de crioprotetores mais adequados à espécie; diminuição do volume da solução a ser vitrificada; e aumento da velocidade de vitrificação. Yavin & Arav (2007) indicaram que, para o sucesso da vitrificação, deve haver equilíbrio entre a taxa de resfriamento e a viscosidade da solução que é oferecida pela concentração dos crioprotetores e o volume da amostra. De acordo com os mesmos autores, problemas como cristalização durante a vitrificação e descongelamento e fraturas, podem ocorrer e, uma vez aliados ao efeito tóxico e ao choque osmótico, levam ao insucesso da técnica. A adequação das técnicas de vitrificação favorecerá a formação de bancos de germoplasma bovino com aplicações em programas de melhoramento e na preservação de raças nativas e naturalizadas que se encontrem em declínio numérico e/ou ameaçadas de extinção.

Entretanto, Gandolfi et al. (2006) compararam duas técnicas de vitrificação com a técnica de congelamento lento usando fragmentos ovarianos de humanos, suínos e bovinos, e concluíram que a vitrificação, independentemente de espécie, classe folicular e técnica, não foi adequada para a preservação de folículos pré-antrais como a técnica de congelamento lento. Tem-se obtido bons resultados com o congelamento lento de tecido ovariano bovino em determinados estudos com mais de 70% de preservação da normalidade folicular (PAYNTER et al., 1999; LUCCI et al., 2004; LAMAITA et al., 2005; CELESTINO et al., 2007).

5.2. Experimento II. Viabilidade de folículos pré-antrais de fêmea bovina isolados do tecido ovariano pós-vitrificação.

Após o descongelamento, o tecido ovariano pode ser destinado ao isolamento folicular (ZHANG ET AL., 1995; OKTAY et al., 1997; ABIR et al., 1999; NEWTON et al., 1999), cultivo *in vitro* (SUGIMOTO et al., 1996; PAYNTER et al., 1999) ou ainda ao transplante (GOSDEN et al., 1994). Na criopreservação em ovinos os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou ETG e DMSO (1,5 e 3,0M), sugerindo que essas substâncias mantêm, com maior eficiência, a integridade dos FOPA após congelamento/descongelamento, quando adicionados ao meio de criopreservação, minimizam o estresse osmótico.

Tabela 9. Viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas bovinas isolados de forma mecânica do tecido ovariano pós-vitrificação.

TRATAMENTO	Controle	SV1m	SV1s	SV2m	SV2s	SV3m	SV3s	SV4m	SV4s
Controle	1030	671**	709**	673**	548**	805**	867**	899**	924**
SV1m		0	709	673	548**	805**	867**	899**	924**
SV1s			0	673	548**	805**	867**	899**	924**
SV2m				0	548**	805**	867**	899**	924**
SV2s					0	805**	867**	899**	924**
SV3m						0	867*	899**	924**
SV3s							0	899	924*
SV4m								0	924
SV4s									0

*Significativo a 5 % ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-wallis, ** Significativo a 1 % ($P < 0,05$), pelo teste de qui-quadrado. **SV1s**: DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m**: DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s**: DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m**: DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s**⁸: DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m**: DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s**: DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC.

Foram avaliados 13.500 FOPA divididos em tratamento controle e oito soluções de vitrificação, sendo 1500 FOPA para cada tratamento. As suspensões foliculares, obtidas após a utilização do procedimento mecânico de folículos pré-antrais, continham células do estroma ovariano, oócitos desnudos e numerosos folículos ovarianos. Carambula et al. (1996) isolaram FOPA de fetos bovinos, utilizando tesoura cirúrgica e realizaram cortes sucessivos dentro de tubos de centrifuga, fragmentando os ovários de maneira uniforme, além de diminuir o custo de implantação do sistema. O método foi mais eficiente que o *Tissue Chopper* quanto ao número de folículos recuperados e tornou o processo mais rápido que o sistema tradicional.

Neste experimento os resultados mostraram que o tratamento controle (sem criopreservação) diferiu de todos os tratamentos de criopreservação, e dos 1500 folículos observados no tratamento controle 1030 (68,7%) estavam vivos, demonstrando o melhor resultado de FOPA em comparação com FOPA submetidos à criopreservação (tabela 9). Santos et al. (2005), analisando os FOPA após procedimentos de congelamento/descongelamento, observaram uma redução de folículos viáveis com azul Trypan em relação ao controle. Roy & Treacy (1993) observaram que as baixas taxas metabólicas causadas pelas temperaturas são essenciais para a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais humanos após isolamento devido à diminuição do metabolismo celular e, conseqüentemente à redução da necessidade metabólica.

Analisando os tratamentos de vitrificação, observa-se nos tratamentos SV3 e SV4, com SAC ou MEM como meio de descongelamento, mostraram melhores respostas em viabilidade de FOPA, indicando que o α -tocoferol ajuda a manter os folículos vivos pós-vitrificação *in situ* e pós-isolamento mecânico (tabela 9 e 10).

Tabela 10. Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais viáveis e mortos de fêmeas bovinas isolados de forma mecânica do tecido ovariano pós-vitrificação.

Tratamentos	VIABILIDADE			
	Vivos	%	Mortos	%
Controle	1030	68,7	470	31,3
SV1m	671	44,7	829	55,3
SV1s	709	47,3	791	52,7
SV2m	673	44,9	827	55,1
SV2s	548	36,5	952	63,5
SV3m	805	53,7	695	46,3
SV3s	867	57,8	633	42,2
SV4m	899	59,9	601	40,1
SV4s	924	61,6	576	38,4
Total	7126		6374	

SV1s: DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em SAC.

Sendo os FOPA estruturas pequenas e muito susceptíveis a injúrias na sua estrutura ocasionando a sua morte, é importante conhecer soluções ou componentes que possam manter a viabilidade desses folículos depois dos procedimentos de criopreservação. Além desse processo, o descongelamento e seu posterior isolamento mecânico, para retirar as células do tecido ovariano, aumentam a probabilidade de modificações prejudiciais, seja pelos componentes extracelulares, por procedimentos laboratoriais ou implementos utilizados para seu procedimento. Estudo desenvolvido por Yavin & Arav (2007) determinou que o aumento do volume para a criopreservação diminuiu a probabilidade de ocorrer vitrificação, aumentando o risco de ocorrer cristalização, fenômeno altamente deletério nos folículos criopreservados. No presente estudo, verificou-se que folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas bovinas isolados de forma mecânica do tecido ovariano pós-vitrificação, com DMSO, SAC e α -tocoferol 10 mM, descongelando com SAC ou MEM foram os tratamentos mais eficazes para manter a viabilidade nos folículos pré-antrais em bovinos (tabela 9 e 10). Segundo

Wang et al.(2002) e Barroso et al.(1997), α -tocoferol é predominante na membrana plasmática das células animais e que quantidades significativas estão presentes no ovário e no fluido folicular (ATTARAN et al., 2000). O α -tocoferol adicionado em 5, 10, 15 mM, pode preservar a morfologia e estimular a ativação de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. No entanto, a adição destes antioxidantes nas concentrações testadas reduziu a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* em caprinos (BEZERRA et al.,2006).

6. CONCLUSÕES

- 1) **Dimetilsulfóxido, sacarose e α -tocoferol podem ser utilizados na criopreservação de folículos pré-antrais de fêmeas bovinas.**
- 2) **Criptetor extracelular (sacarose) pós-criopreservação contribui para preservar a morfologia de folículos pré-antrais de fêmeas bovinas.**
 - a. Recomenda-se trabalhar com dimetilsulfóxido e sacarose descongelados com sacarose para criopreservar folículos pré-antrais *in situ*.
 - b. Recomenda-se trabalhar com dimetilsulfóxido, sacarose e α -tocoferol 10 mM descongelados com meio essencial mínimo para criopreservar folículos pré-antrais *in situ*.
- 3) **Mantém-se a viabilidade de folículos pré-antrais isolados de fêmeas bovinas pós-vitrificação.**
 - a. Recomenda-se trabalhar com dimetilsulfóxido, sacarose e α -tocoferol 10 mM, descongelados tanto com meio essencial mínimo quanto com sacarose, para manter a viabilidade dos folículos pré-antrais isolados do tecido ovariano bovino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIR, R.; ROIZMAN, P.; TISCH, B.; NITKE, S. et al. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. **Human Reproduction**, v.14, p.1299-1301, 1999.
- AL-AGHBARI, A.M.; MENINO, A.R. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.101–110, 2002.
- AMORIM C.A.; LUCCI C.M.; RODRIGUES A.P.R. et al. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v.53, p.1251-1262, 2000.
- AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A.P.R. et al. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. **Theriogenology**, v.60, p.735–742, 2003a.
- AMORIM, C.A. **Criopreservação de oócitos incluídos em folículos primordiais isolados a partir de ovários ovinos**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 2003. 182p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).
- AMORIM, CA.; RONDINA, D.; RODRIGUES, APR. et al. A. Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. **Fertility and Sterility**, 81:735-740, 2004.
- AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M. et al. Affect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, vol.37, p.269-277, 2000.
- ANDRADE, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. et al. Short term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0.9% saline and Braun-Collins solutions. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 141-143, 2001.

- ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. *et al.* Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Ruminant Research**, V. 43, p. 235-243, 2002.
- ASADA, M.; HORRI, M.; MOGO, T.; FUKUI. *et al.* In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). **Biology. Reproduction**. v. 62, p. 253-259, 2000.
- ATTARAN, M.; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T. *et al.* The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the out come of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility*, v.45, p.314-320, 2000.
- BARROSO, M.P.; GÓMEZ, D.C.; LÓPEZ, L.G. *et al.* Ascorbate and α -Tocopherol prevent apoptosis induced by serum removal independent of Bcl-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.343, p.243-248, 1997.
- BASSO, A.C. **Análise ultraestrutural da viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos e vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) isolados mecanicamente**. 2001. 82p. Dissertação (Mestrado em Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BASSO, A.C.; ESPER, C.R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal. Veterinary Research Animal Science**, v.39, p.311-319, 2002.
- BEARDEN, H. J.; FUQUAY, J. W. **Applied Animal Reproduction**. 4^a ed. Prentice Hall. 351p. 1997.
- BECKER, J.F.; DRION, P.V.; FIGUEIREDO, J.R. *et al.* The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reproduction Domestic Animal**. v.31, p.543-548, 1996.

- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBING, R. B. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1998.
- BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; OLIVEIRA, L. C. et al. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8 p. 47-56, 1998.
- BEZERRA I.L. **utilização de substâncias antioxidantes (a-tocoferol e tetratina) no cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos**, dissertação Mestrado (ciência veterinária). Universidade federal rural de Pernambuco-Recife-PE, 2006.
- BOLAMBA, D.; RUSS, K.R.; OLSON, M.A. et al. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.
- CANDY, C.J.; WOOD M.J.; WHITTINGHAM DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal Reproduction Fertility**, v.110, p.11-19, 1997.
- CARAMBULA, S. F.; GONÇALVES, P.B D.; COSTA, L.F.S. et al. Períodos de digestão enzimática para o resgate de folículos pré-antrais em ovários de fetos bovinos. **Ciência Rural**, v.28, p. 659-663, 1998.
- CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R. et al. Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. **Arquivos da Faculdade de medicina veterinaria**, v.24, p.235, 1996.
- CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J. Effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. **Journal Reproduction Fertility**, v.92, p.197-207, 1991a.

- CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **Journal Reproduction Fertility**, v.93, p.71-79, 1991b.
- CARVALHO, F.C.A.; LUCCI, C.M.; SILVA, J.R.V. et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra structure after cooling and freezing of ovarian tissue (in press). **Animal Reproduction Science**, v.108, p.309-318, 2008.
- CELESTINO, J.J.H.; SANTOS, R.R.; MARTINS, F.S. et al. Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.591-599, 2007.
- CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **Lancet**, v. 1, p. 884-886, 1986.
- COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L. et al. Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. **Brazilian Journal. Veterinary Research Animal Science**, v.39, p.324-30, 2002.
- COX, S.L.; SHAW, J.; JENKIN, G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipient in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.107, p.315-322, 1996.
- DANIEL, S.A.J.; ARMSTRONG, D.T.; GORELANGTON, R.E. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Research**, v.24, p.109-121, 1989.
- DE LA PEÑA E.C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S. et al. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, v.123, p.593-600. 2002.
- DHALI, A.; MANIK, R.S.; DAS, S.K. et al. Effect of ethylene glycol concentration and exposure time on post vitrification survival in vitro maturation rate of buffalo oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.253, 2000.

- DOBRINSKY, R.J. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology** v.45, p.17-26, 1996.
- DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R.; FRY, R.C. Does follicular dominance occur in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, p.63-70, 1991.
- DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.
- DUVALL, E.; WYLLIE A.H.; MORRIS, R.G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). **Immunology**, v.56, p.351-358, 1985.
- ELMOAZZEN, H.Y.; ELLIOTT, J.A.W.; MCGANN, L.E. Cryoprotectant equilibration in tissues. **Cryobiology**, v. 51, p.85-91, 2005.
- EPPIG, J.J. Analysis of mouse oogenesis in vitro. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. **Journal Experimental Zoology**, n.198, p.375, 1976.
- EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology Reproduction**, v.54, p.197-207, 1996.
- ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, V. 4, p. 233-254, 1986.
- FERNANDES R.A.R. **Caracterização Morfológica e Ultra-Estrutural de Folículos Pré-Antrais de Cabras Naturalmente Infectadas com o Vírus da Artrite Encefalite Caprina**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Estadual de Ceará, Fortaleza-Ceará.

FIGUEIREDO, J. R. Princípios básicos, abrangência e relação da bioética com as biotécnicas da reprodução. **Conselho Federal de Medicina veterinária**, v. 8, p. 17-24, 2003.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A.; Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 227-256.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOLF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p.789-799, 1993.

FIGUEIREDO, J. R. Effect of Braun- Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.195–208, 2001.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R.A.C.; WAHL, M. et al. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 163, p. 53-60, 2000.

FUKU, E.; KOJIMA, T.; SHIOYA, Y. et al. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 29, p. 485-92, 1992.

GANDOLFI, F.; PAFFONI, A.; BRAMBILLA, E.P. et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, n.1, v. 85, p.1150-1156, 2006.

GIGLI, DA.; BYRD, D.D.; FORTUNE, J.E. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles in vitro. **Theriogenology**, v.66, p.344-353, 2006.

- GORDON, I. Storage and criopreservation of oocytes and embryos. In: GORDON I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: Raven Press, 1994. p. 293-328.
- GOSDEN, R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Molecular Cell Endocrinology**, v.163, p.125-129, 2000.
- GOSDEN, R.G.; BOLAND, N.I. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. **Journal Reproduction Fertility**, v.101, p.369-374, 1994.
- GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **Journal Zoology**, v.211, p.169-175, 1987.
- GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p.561-571, 1989.
- GUNASENA, K.T.; VILLINES, P.M.; CRITSER, E.S. et al. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, v.12, p.101-106, 1997.
- GUPTA, P.S.P.; NANDI, S.; RAVINDRANATHA, R.M.; SARMA, P.V. In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology**, v.57, p.1839-1854, 2002.
- GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology Reproduction**, v. 62, p.1322-1328. 2000.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 6a ed, São Paulo, Manole, 582p. 1995.
- HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M. et al. In vitro growth on maturation of pig oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v.100, p.333-339, 1994.

- HIRSHFIELD A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. (Ed) **International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology**. San Diego: California, v.124, 1991. p. 43-101.
- HIRSHFIELD, A. N. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. **Biology Reproduction**, v. 40, p. 181-190, 1989.
- HOFFERT, K.A.; ANDERSON, G.B.; WILDT, D.E. et al. Transition from maternal to zygotic control of development in IVMrIVF domestic cat embryos. **Molecular Reproduction Development**,. v. 48, p.208-215, 1997.
- HOORNAERT, S.; HANON, J.; LYAKU, J. et al. The Use of Annexin for Concomitant Detection of Apoptosis and Cellular Phenotype. **Biochemica** v.3, p.19-20,1997.
- HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology Reproduction**, v.55, p.161-168, 1996.
- HOVATTA, O. Cryopreservation and culture of human primordial ovarian follicles. **Molecular Cell Endocrinology**. v.169, p.95-97, 2000.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**. v.2, p. 78-80, 1994.
- IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. *Journal Reproduction Fertility*, v.34, p.39-54, 1987.
- ISHIJIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; LEE, D-S. et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, n.2, p.293-299, 2006.

- JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v.45, p.889-895, 1996.
- JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v.39, p.527-535, 1993.
- KATSKA, L.; RYNSKA, B. The isolation and in vitro culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. **Theriogenology**, v.50, p. 213-222, 1998.
- KERR, J.R.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239, 1972.
- LAMAITA, R.N.; BAMBIRRA, E.A.; CAMARGOS, M.G. et al. Histological evaluation of the effects of cryopreservation in bovine ovarian tissue. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.22, n.2, p.105-106, 2005.
- LIM, J.M.; KO, J.J.; HWANG, W.S. et al. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.51, n.1303-1310, 1999.
- LIU, J.; VAN DER EL, S.T.J.; VAN DEN BROECKE, R. et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. **Biology Reproduction**, v.64, p.171-178, 2001.
- LIU, Q.A.; HENGARTNER, M.O. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. **The New York Academy of Sciences**. V.887, p.92-104. 1999.
- LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; RUMPF, R. et al. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v.61, p.461-472, 2004.

- LUCCI, C. M.; AMORIM, C.A.; BÃO, S.N. 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**, v.56, p.39-49, 1999.
- LUNA, H.S.; LIJERON, L.; COSTA, R. Diferentes concentrações de etileno-glicol na morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos. **Revista Brasileira da Saúde e Produção**, v.8, p.105-111, 2007.
- LUNA, H.S.; HÉLDER, S.; RIGO, A.L. et al. Morfometria e número de células da granulosa de folículos ovarianos pré -antrais de bovinos (*Bos indicus*) preservados a 4 °C em solução salina por diferentes períodos de tempo, **Revista Brasileira da Saúde e Produção**, v.9, n.1, p. 01-06, 2008.
- LUYET B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. **Biodynam**, v.1, p.1-14, 1937.
- MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F. et al. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, v.12, p. 83-91, 2002.
- MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; VAN LAN, G. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility sterilely**, v.82, p.1390-1394, 2004.
- MATOS, M.H. T.; FIGUEIREDO, J.R.; LIMA V,I.B. et al. Essencial role of Follicle Stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. **Zygote Cambridge**, v. 15, p. 173-182, 2007.
- MAZUR, P.; RALL, W.F.; LEIBO, S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophys**, v.6, p.197-213, 1984.
- MAZUR P. **Principles of cryobiology**. In: LANE, N.; FULLER. B.J.; BENSON, E.E. (Ed.). Life in the frozen state. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. p.3-65.

- MULDREY, K.; MCGANN, L.E.; Mechanisms of intracellular ice formation, **Biophys Journal**, v.57, p.525-532, 1990.
- NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1487-1491, 1996.
- NEWTON, H.; PICTON, H.; GOSDEN, R. In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 141-150, 1999.
- NICOSIA, S.V.; EVANGELISTA, I.; BATTA, S.K. Rabbit ovarian follicles. I- Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biology Reproduction**, v.13, p.423-447, 1975.
- NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology Reproduction**, v.67, p.1018-1024, 2002.
- NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P.M.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v.39, p.811-821, 1993.
- NUTTINCK, F.; MASSIP, A.; DESSY, F. In vitro effect of bFGF on isolated bovine preantral follicles: an autoradiographic study. **Annual conference of society for the study of fertility**, p.34, 1993.
- OKTAY, K.; NUGENT, D, NEWTON, H. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility Sterility**, v.67, p.481-486, 1997.

- OLSON, S.E.; SEIDEL, J.R.; PAYNTER, S.J. et al. Culture of in vitro-produced bovine embryos with Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction**, v.6, p.449-456, 2000.
- PAYNTER, S.J.; COOPER, A.; FULLER, B.J. et al. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology**, v.38, n.4, p.301–309, 1999.
- POVALISHEV, V.N.; POLOZOV, G.I.; SHADYRO, O.I. Effects of -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.1236-1239, 2006.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. Laboratory Methods in histotechnology-Armed Forces Institute of Pathology. **Raven Press**, p. 69-101, 1988.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.87-402, 1987.
- RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at – 196 degrees C by vitrification. **Nature**, v.24, p.387-402, 1985.
- RODGERS, R. J.; LAVRANOS, T. C.; VAN WEZEL, I. L. Development of the ovarian follicular epithelium. **Molecular Cell Endocrinology**. V.151, p.171-179, 1999.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.211-227, 2004b.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, M.M.B.; DOLMANS, M.M. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility Sterility**, v.82, p.1390-1394, 2004.

- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; et al. Folículos pré-antrais caprinos isolados mecanicamente em diferentes estágios reprodutivos e parâmetros morfométricos ovarianos. **Ciência Rural**, v.28, p.471-476, 1998a.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M. et al. Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**, v.28, p.477-482, 1998b.
- ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. **Biology Reproduction**, v.32, p.203-215, 1985.
- ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v.59, p.783-790, 1993.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p. 77-92, 1983.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 3.ed. Belo Horizonte – MG, 2002, 265p.
- SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, G.R. et al. criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinaria e zootecnia**, v.16, n.4, p. 561-574. 2009.
- SANTOS, R.R.; HURK, R.; RODRIGUES, A.P.R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 53-64, 2007.

- SANTOS, RR.; VAN DEN HURK, R.; THARASANIT, T. et al. Determination of the viability of cryopreserved goat preantral follicles. **Oxford Journal 'Mammalian Oogenesis and Folliculogenesis'**. p.1:9, 2005.
- SANTOS, R.; RODRIGUES, D.; RODRIGUES, A.P.R. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249-263, 2006.
- SCHWARTZMAN, R. A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocrine Reviews**. v.14, p.133-151, 1993.
- SEN, C.K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v.78, p.2026-2032, 2006.
- SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, M.; TROUNSON, A.O. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p. 59-72, 2000.
- SILVA, J.R.V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M.A. et al. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. **Journal Endocrinology**, v.189, p.113-125, 2006.
- SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T. et al. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **Journal Endocrinology**, v.183, p.405-415, 2004a.
- SILVA J.R.V.A.B.; VAN DEN HURKB R.; COSTA SONIA H.F.A. et al. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p.273–286, 2004b.
- SILVA, J.R.V.; HURK, R.; VAN TOL, H.T.A. et al. Expression of Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9), Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) and

- BMP Receptors in the Ovaries of Goats. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 11-19, 2005.
- SIRARD, M.A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotics resumption. **Theriogenology**, v.40, p.933-942, 1993.
- SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C.; CORTVRINDT, R.; A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. **Human Reproduction**, v.11, p.2648-2655. 1996.
- SOUSA, N.M.; GARBAYO, A.; FIGUEIREDO, J.R. et al. Pregnancy-associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and post-partum in native goats from the northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 32, p.137-147, 1999.
- SOUZA, M.F.; TOMÉ, A.R.; RAO, V.S.N. Cryopreservation and assisted human conception. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p.152-163, 2004.
- STACHECKI, J.J.; COHEN, J. Symposium: cryopreservation and assisted human conception. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p.152-163, 2004.
- SUGIMOTO, M.; MIYAMOTO, H.; KABASAWA, T. et al. Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification. **Genamics JournalSeek**, v. 17, p. 93-98, 1996.
- TILLY, J.L.; KOWALSKI, K.I.; SCHONBERG, D.W. et al. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decrease in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome p450 aromatase. **Endocrinology**, v.131, p.1670-1676, 1991.

- TORRANCE C.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. *J Reproduction Fertility*, v.87, p.367-374. 1989.
- TRABER, M.G.; SIES, H. Vitamin E in humans: demand and delivery. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.321-347, 1996.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA- UFV. Sistema de análise estatística e genética – **SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, M.G, 2000. 142p.
- VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E.E. et al. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Updated**, v.6, p.457-474, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; SPEK, E.R.; HAGE, W.J. et al. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction**, v.4, p.833-841, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; SPEK, E.R.; HAGE, W.J. et al. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction**, v.4, p.833–841, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.
- VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKER, J.F. In vivo and in vitro development of pré-antral follicles. **Theriogenology**, v. 47, p. 73-82, 1997.
- VENDOLA, K.A.; ZHOU, J.; ADESANYA, O.O. et al. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.2622-2629, 1998.
- WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; BOSS, A.K. et al. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology Reproduction**, v.55, p.942-948, 1996a.

- WANG, X.; Falcone, T.; Attaran M. et al. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p.1272-1277, 2002.
- WASSARMAN, P. Zona pellucida glyco proteins. **Annual Review Biochemica l.** v.57, p. 415 - 442,1988.
- WYLLIE, A.H. Cell Death: the significance of apoptosis. Int. **International Review of Cytology**, v.68, p.251-306, 1980.
- YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification Solutions. **Theriogenology**, v.67, p.81-89, 2007.
- ZHANG, J.; LIU, J.; XU, K.P. et al. Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. **Journal of Reproduction and Genetics**, v. 12, p. 361-368, 1995.
- ZING. J.M.; AZZI, A. Non-antioxidant activities of vitamin E. Current Medicinal Floxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.125-129, 1999.

8. ANEXO

Tabela 11. Análise quantitativa e percentual *in situ* das diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primordiais bons, regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis

TRATAMENTO	CONTROLE			SV1M			SV1S			SV2M			SV2S			SV3M			SV3S			SV4M			SV4S		
	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU
CONTROLE	489	159	61	395	233*	141**	311**	191	121*	338*	165	61	532	181	88	378	239*	154**	345	197	98	448	180	114*	308**	205	106
SV1M	0	0	0	0	0	0	311	191	121	338	165	61**	532	181	88	378	239	154	345	197	98	448	180	114	308	205	106
SV1S							0	0	0	338	165	61	532**	181	88	378	239	154	345	197	98	448*	180	114	308	205	106
SV2M										0	0	0	532**	181	88	378	239	154**	345	197	98	448	180	114**	308	205	106
SV2S													0	0	0	378*	239	154	345**	197	98	448	180	114	308**	205	106
SV3M																0	0	0	345	197	98	448	180	114	308	205	106
SV3S																			0	0	0	448	180	114	308	205	106
SV4M																						0	0	0	308*	205	106
SV4S																									0	0	0

TRATAMENTO	CONTROLE			SV1M			SV1S			SV2M			SV2S			SV3M			SV3S			SV4M			SV4S		
	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU	PBO	PRE	PRU
CONTROLE	13,8	9,1	6,5	11,1	13,3*	14,9**	8,8**	10,9	12,8*	9,5*	9,4	6,5	15,0	10,3	9,3	10,7	13,7*	16,3**	9,7	11,3	10,4	12,6	10,3	12,1*	8,7**	11,7	11,2
SV1M	0	0	0	0	0	0	8,8	10,9	12,8	9,5	9,4	6,5*	15,0	10,3	9,3	10,7	13,7	16,3	9,7	11,3	10,4	12,6	10,3	12,1	8,7	11,7	11,2
SV1S							0	0	0	9,5	9,4	6,5	15,0**	10,3	9,3	10,7	13,7	16,3	9,7	11,3	10,4	12,6*	10,3	12,1	8,7	11,7	11,2
SV2M										0	0	0	15,0**	10,3	9,3	10,7	13,7	16,3**	9,7	11,3	10,4	12,6	10,3	12,1**	8,7	11,7	11,2
SV2S													0	0	0	10,7*	13,7	16,3	9,7**	11,3	10,4	12,6	10,3	12,1	8,7**	11,7	11,2
SV3M																0	0	0	9,7	11,3	10,4	12,6	10,3	12,1	8,7	11,7	11,2
SV3S																			0	0	0	12,6	10,3	12,1	8,7	11,7	11,2
SV4M																						0	0	0	8,7*	11,7	11,2
SV4S																									0	0	0

*Significativo a 5 % (P<0,05), pelo teste de Kruskal-wallis, ** Significativo a 1 % (P<0,01), pelo teste de Kruskal-wallis primários bons (PBO), primordiais regulares (PRE), primordiais ruins (PRU), **SV1s**: DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m**: DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s**: DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m**: DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s**⁸: DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m**: DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s**: DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC.

Tabela 12. Análise quantitativa e percentual *in situ*, das diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primários bons, regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.

TRATAMENTOS	CONTROLE			SV1M			SV1S			SV2M			SV2S			SV3M			SV3S			SV4M			SV4S		
	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU
CONTROLE	330	258	125	276	218	198	335	287	223*	378	289	215	303	252	123	255	253	167	304	292	219*	278	239	192	255	323*	225*
SV1M	0	0	0	0	0	0	335	287	223	378	289	215	303	252	123	255	253	167	304	292	219	278	239	192	255	323	225
SV1S							0	0	0	378	289	215	303	252	123	255	253	167	304	292	219	278	239	192	255	323	225
SV2M										0	0	0	303	252	123	255	253	167	304	292	219	278	239	192	255	323	225
SV2S													0	0	0	255	253	167	304	292	219*	278	239	192	255	323	225*
SV3M																0	0	0	304	292	219	278	239	192	255	323	225
SV3S																			0	0	0	278	239	192	255	323	225
SV4M																						0	0	0	255	323	225
SV4S																									0	0	0

TRATAMENTOS	CONT			SV1M			SV1S			SV2M			SV2S			SV3M			SV3S			SV4M			SV4S		
	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU	PABO	PARE	PARU
CONTROLE	12,2	10,7	7,4	10,2	9,0	11,7	12,3	11,9	13,2*	13,9	12,0	12,7	11,2	10,5	7,3	9,4	10,5	9,9	11,2	12,1	13,0*	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4*	13,3*
SV1M	0	0	0	0	0	0	12,3	11,9	13,2	13,9	12,0	12,7	11,2	10,5	7,3	9,4	10,5	9,9	11,2	12,1	13,0	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4	13,3
SV1S							0	0	0	13,9	12,0	12,7	11,2	10,5	7,3	9,4	10,5	9,9	11,2	12,1	13,0	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4	13,3
SV2M										0	0	0	11,2	10,5	7,3	9,4	10,5	9,9	11,2	12,1	13,0	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4	13,3
SV2S													0	0	0	9,4	10,5	9,9	11,2	12,1	13,0*	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4	13,3*
SV3M																0	0	0	11,2	12,1	13,0	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4	13,3
SV3S																			0	0	0	10,2	9,9	11,4	9,4	13,4	13,3
SV4M																						0	0	0	9,4	13,4	13,3
SV4S																									0	0	0

*Significativo a 5% ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-wallis; ** Significativo a 1 % ($P < 0,01$) pelo teste de Kruskal-wallis primários bons (PBO), primordiais regulares (PRE), primordiais ruins (PRU), **SV1s**: DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m**: DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s**: DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m**: DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s**⁸: DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC e **SV4m**: DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s**: DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC.

Tabela 13. Análise quantitativa e percentual *in situ*, das diferenças estatísticas de folículos pré-antrais primários bons, regulares e ruins, entre os tratamentos analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-wallis.

TRATAMENTOS	CONTROLE			SV1M			SV1S			SV2M			SV2S			SV3M			SV3S			SV4M			SV4S		
	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU
CONTROLE	21	43	14	7	19	13	8	16	8	23	23	8	8	12	1	12	30	12	12	24	9	18	28	3	28	28	22
SV1M	0	0	0	0	0	0	8	16	8	23	23	8	8	12	1	12	30	12	12	24	9	18	28	3	28	28	22
SV1S							0	0	0	23	23	8	8	12	1	12	30	12	12	24	9	18	28	3	28	28	22
SV2M										0	0	0	8	12	1	12	30	12	12	24	9	18	28	3	28	28	22
SV2S													0	0	0	12	30	12	12	24	9	18	28	3	28	28	22
SV3M																0	0	0	12	24	9	18	28	3	28	28	22
SV3S																			0	0	0	18	28	3	28	28	22
SV4M																						0	0	0	28	28	22
SV4S																									0	0	0

TRATAMENTOS	CONTROLE			SV1M			SV1S			SV2M			SV2S			SV3M			SV3S			SV4M			SV4S		
	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU	SBO	SRE	SRU
CONTROLE	15,3	19,3	15,6	5,1	8,5	14,4	5,8	7,2	8,9	16,8	10,3	8,9	5,8	5,4	1,1	8,8	13,5	13,3	8,8	10,8	10,0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV1M	0	0	0	0	0	0	5,8	7,2	8,9	16,8	10,3	8,9	5,8	5,4	1,1	8,8	13,5	13,3	8,8	10,8	10,0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV1S							0	0	0	16,8	10,3	8,9	5,8	5,4	1,1	8,8	13,5	13,3	8,8	10,8	10,0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV2M										0	0	0	5,8	5,4	1,1	8,8	13,5	13,3	8,8	10,8	10,0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV2S													0	0	0	8,8	13,5	13,3	8,8	10,8	10,0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV3M																0	0	0	8,8	10,8	10,0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV3S																			0	0	0	13,1	12,6	3,3	20,4	12,6	24,4
SV4M																						0	0	0	20,4	12,6	24,4
SV4S																									0	0	0

*Significativo a 5% (P<0,05), pelo teste de Kruskal-wallis; ** Significativo a 1% (P<0,01), pelo teste de Kruskal-wallis primários bons (PBO), primordiais regulares (PRE), primordiais ruins (PRU),

SV1s: DMSO, com descongelamento em sacarose (SAC); **SV2m:** DMSO + SAC, com descongelamento em MEM; **SV2s:** DMSO + SAC, com descongelamento em SAC; **SV3m:** DMSO + SAC + tocoferol (TOC) 5 mM, com descongelamento em MEM; **SV3s⁸:** DMSO + SAC + TOC 5 mM, com descongelamento em SAC; e **SV4m:** DMSO + SAC + TOC 10 mM, com descongelamento em MEM; **SV4s:** DMSO + SAC + TOC 10 Mm, com descongelamento em SAC.