

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE ZEBRAFISH
UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL**

LIS SANTOS MARQUES
Médica Veterinária/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Outubro, 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Marques, Lis Santos
Vitrificação de tecido ovariano de zabrafish
utilizando uma cápsula de metal / Lis Santos
Marques. -- 2014.
84 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..
Coorientador: Leandro Cesar de Godoy.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. Criopreservação de tecido ovariano. 2.
Vitrificação de folículos de zebrafish. 3. Utilização
de uma cápsula de metal para a vitrificação. I.
Streit Jr., Danilo Pedro, orient. II. Godoy,
Leandro Cesar de, coorient. III. Título.

LIS SANTOS MARQUES
Médica Veterinária

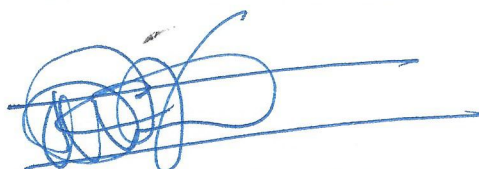
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRA EM ZOOTECNIA

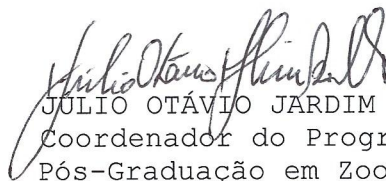
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.10.2014
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JUNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

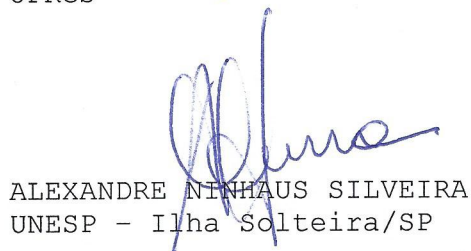
Homologado em: 22.12.2014
Por



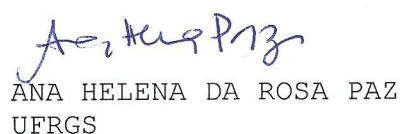
JULIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



ADRIANA BOS-MIKICH
UFRGS



ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA
UNESP - Ilha Solteira/SP



ANA HELENA DA ROSA PAZ
UFRGS



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, sem os quais eu não teria conseguido alcançar essa conquista e ser a pessoa que sou hoje, minha mãe Ieda, meu pai Wilmar, meu irmão Gabriel e ao meu marido Charlie.

AGRADECIMENTOS

Aos membros do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, em especial à Ione Borcelli Gonçalves pela atenção e ao colega Daniel Maschio pelo suporte nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Danilo P. Streit Jr. pela confiança, mas acima de tudo por acreditar no meu potencial e me proporcionar a oportunidade de conhecer um novo modelo de pesquisa animal.

Ao Prof. Dr. Leandro Cesar de Godoy pela ajuda na elaboração e execução desse trabalho.

A Profa. Dra Adriana Bos Mikich por todo apoio e amizade.

A Profa. Dra. Júlia Giora pela atenção e disposição.

Ao Setor de Patologia Veterinária da FAVET/UFRGS pela confecção das lâminas histológicas.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para colaborar com este trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Às colegas Laura Arnt e Maira Corso por serem mais do que amigas, me fazendo sorrir nos momentos difíceis e dar boas risadas nos momentos de descontração.

A todos os meus colegas de pós-graduação e bolsistas da faculdade de zootecnia e agronomia da UFRGS.

Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei, pois se não fossem elas eu não teria saído do lugar.

Agradeço a Deus pela oportunidade de mais uma conquista.

EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

(Albert Einstein)

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL¹

Autor: Lis Santos Marques
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.
Co-orientador: Leandro Cesar de Godoy

RESUMO

O zebrafish (*Danio rerio*) tem se destacado na pesquisa biomédica por sua homologia fisiológica e genética aos humanos. No entanto, há poucos relatos sobre a criopreservação ovariana desta espécie. Assim, pesquisamos a utilização de um recipiente de metal na vitrificação de tecido ovariano de zebrafish. O objetivo foi avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos de zebrafish após a vitrificação de fragmentos ou ovários inteiros usando a cápsula de metal. Primeiro, testamos quatro soluções de vitrificação (VS1 – 1,5 M metanol + 4,5 M propilenoglicol; VS2 – 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO; VS3 – 1,5 M metanol + 4,5 M propilenoglicol + 0,5 M sacarose; VS4 – 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO + 0,5 M sacarose) e cinco estágios de desenvolvimento folicular utilizando o teste de coloração supravital iodeto de propídio combinado com diacetato de fluoresceína. Estes resultados mostraram que os folículos em estágio I, imaturos, apresentaram as maiores taxas de sobrevivência celular e que VS1 foi a melhor solução em termos de viabilidade. No Experimento 2, utilizou-se VS1 para vitrificar o tecido ovariano em diferentes dimensões (fragmentos ou ovários inteiros) e em dois diferentes recipientes (palheta de plástico ou cápsula de metal). Para avaliar a sobrevivência e o crescimento folicular dos folículos em estágio I, o diâmetro dos folículos foi mensurado antes e depois de cultivo *in vitro* por 24 horas. A morfologia folicular foi analisada por microscopia de luz após vitrificação utilizando a cápsula de metal. Os dados mostraram que a morfologia de folículos imaturos foi bem preservada após a criopreservação. A taxa de sobrevivência folicular foi maior ($P < 0,05$) em fragmentos vitrificados, quando comparados com a vitrificação de ovários inteiros. Não houve diferenças significativas na sobrevivência e crescimento folicular entre os dois recipientes de vitrificação, palheta de plástico ou cápsula de metal. No entanto, a cápsula de metal diminui os riscos de contaminação, pois é hermeticamente fechada evitando contato com nitrogênio líquido e poder ser esterilizada, em vista que é manufaturada em aço inoxidável. Por essas razões, acreditamos que a cápsula de metal tem um uso potencial em reprodução humana para a vitrificação em grau clínico de tecido ovariano.

Palavras-chave: zebrafish, folículos ovarianos, vitrificação, recipiente de metal.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (84 p.). Outubro, 2014.

VITRIFICATION OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*) OVARIAN TISSUE USING A METAL CAPSULE ¹

Author: Lis Santos Marques

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Co-supervisor: Leandro Cesar de Godoy

ABSTRACT

Zebrafish (*Danio rerio*) has excelled in biomedical research for its physiological and genetic homology to humans. However, there are few reports on ovarian cryopreservation of this specie. Thus, we studied the use of a metal capsule to vitrify zebrafish ovarian tissue. The aim of this study was to assess the survival and in vitro development of zebrafish follicles after vitrification of fragmented or whole ovaries using the metal capsule. First, we tested four vitrification solutions (VS1 - 1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol; VS2 - 1.5 M methanol + 5.5 M Me₂SO; VS3 - 1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol + 0.5 M sucrose; VS4 - 1.5 M methanol + 5.5 M Me₂SO + 0.5 M sucrose) and five follicular developmental stages using fluorescein diacetate and propidium iodide supravital staining test. These results showed that immature follicles, stage one, presented the highest survival rates and VS1 the best vitrification solution in terms of viability. In Experiment 2, we used VS1 to vitrify ovarian tissue in different dimensions (fragments or whole ovaries) and tested two different carriers (plastic straw or metal capsule). To evaluate follicular survival and growth of stage I, we measured follicle diameter before and after twenty-four-hour *in vitro* culture. The follicular morphology was analyzed by light microscopy after vitrification using the metal capsule. Data showed that the immature follicles morphology was well preserved after cryopreservation. Follicular survival rate was higher ($P < 0.05$) on vitrified fragments, when compared to whole ovaries. There were no significant differences on follicular survival and growth between the two vitrification devices, plastic straw or metal capsule. However, the metal capsule being tightly sealed and manufactured in stainless steel avoids contact with liquid nitrogen and can be sterilized reducing contamination risk. These reasons lead us to believe that the metal capsule has a potential use in human reproduction for the clinical grade vitrification of ovarian tissue.

Keywords: zebrafish, ovarian follicles, vitrification, metal capsule.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (84 p.). Outubro, 2014.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Criopreservação na reprodução assistida	16
2.2. Porque criopreservar tecido ovariano	17
2.2.1. Criopreservação de fragmentos de tecido ovariano	17
2.2.2. Criopreservação de ovário inteiro	18
2.2.3. Avaliação de folículos ovarianos após criopreservação	19
2.3. Métodos e etapas da criopreservação	19
2.3.1. Vitrificação	20
2.3.2. Agentes crioprotetores	22
2.3.3. Danos celulares causados pela criopreservação	24
2.3.4. Sistema aberto versus sistema fechado	27
2.4. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo biológico	28
2.5. Estrutura e fisiologia do ovário do zebrafish	29
2.5.1. Morfologia ovariana	29
2.5.2. Oogênese	30
2.5.3. Controle hormonal da maturação oocitária	32
3. HIPÓTESES	33
4. OBJETIVOS	34
CAPÍTULO II	35
Survival and development of zebrafish (<i>Danio rerio</i>) ovarian tissue after vitrification in a clinical grade metal capsule	36
CAPÍTULO III	53
1. CONCLUSÕES	54
2. PERSPECTIVAS FUTURAS	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICES	72

APÊNDICE 1 - Relação dos químicos utilizados nos experimentos	72
APÊNDICE 2 – <i>Plos one</i> instruções para autores	73
VITA	84

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABLE 1. Follicular viability of the five development stages within each group after vitrification	45
TABLE 2. Follicular viability of stage I and II among groups	46

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Arranjos dos estados físicos da matéria	23
FIGURA 2. Cápsula de metal.....	30
FIGURA 3. Dimorfismo sexual em zebrafish, macho (A) e fêmea (B).....	31
FIGURA 4. Estádios de desenvolvimento oocitário em zebrafish. (I) crescimento primário; (II) cortical-alveolar; (III) vitelogênese; (IV) maturação; e (V) maturo..	33

CAPÍTULO II

FIGURE 1. Vitrification procedures of zebrafish ovaries. Equilibrium solution (ES) and vitrification solutions (VS).....	42
FIGURE 2. Fluorescein diacetate and propidium iodide assays. Bright green fluorescent follicles, stage I, are viable (A) and bright red fluorescent follicles, stage V, are non-viable (B). Bar=200 μ m.....	43
FIGURE 3. Survival rate of vitrified/rewarmed stage I ovarian follicles after 24 h <i>in vitro</i> culture. Group 1 (whole ovary in 5 mL plastic straw), Group 2 (whole ovary in metal capsule), Group 3 (ovarian fragments in 5 mL plastic straw), Group 4 (ovarian fragments in metal capsule). Bars labelled with common letters do not differ significantly ($P < 0.05$) from each other (mean \pm SD).....	47
FIGURE 4. Average diameter growth of vitrified/rewarmed stage I follicles after 24 h <i>in vitro</i> culture. Group 1 (whole ovary in 5 mL plastic straw), Group 2 (whole ovary in metal capsule), Group 3 (fragments in 5 mL plastic straw), Group 4 (fragments in metal capsule). Bars labelled with common letters do not differ significantly ($P < 0.05$) from each other (mean \pm SD).....	48
FIGURE 5. Control group (A) and vitrified ovarian tissue (B). Primary growth stage (Pg), cortical alveolus stage (Ca), vitellogenic stage (V) e mature stage (M). Lipid droplet breakdown (arrow in B). Light microscope 10x. Stain: HE. Bar=150 μ m..	49
FIGURE 6. Control group (A) and vitrified ovarian tissue (B). In B condensed chromatin (arrow) and intact follicular membrane layer (arrowhead). Primary growth stage (Pg). Light microscope 100x. Stain: HE. Bar=50 μ m.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

%	percentagem
±	mais ou menos
=	igual a
<	menor que
>	maior que
µg	micrograma(s)
µm	micrômetro(s)
µL	microlitro(s)
°C	graus célsius
17β-20α DHP	17β, 20α dihidroxi-4-pregnen-3-one
ATP	adenosina trifosfato
Ca	cortical alveolus (cortical alveolar)
CGPs	células germinativas primordiais
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
dpf	dias pós-fecundação
DAF	diacetato de fluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
E2	17β estradiol
ERO	espécies reativas de oxigênio
ES	equilibrium solution
FBS	fetal bovine sérum
FDA	fluorescein diacetate
FSH	follicle stimulating hormone (hormônio folículo estimulante)
g	grama(s)
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
GV	vesícula germinativa
GVBD	quebra da vesícula germinativa
h	hora
HE	hematoxilina-eosina
IVC	<i>in vitro</i> culture (cultivo <i>in vitro</i>)

IP	iodeto de propídio
LH	hormônio luteinizante
LN2	liquid nitrogen (nitrogênio líquido)
M	molar
Me ₂ SO	dimetilsulfóxido
mg	miligrama(s)
min	minuto(s)
MIS	esteróides indutores da maturação
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
MPF	fator promotor da maturação
NL	nitrogênio líquido
P	probabilidade de erro
PBS	phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
Pg	primary growth (crescimento primário)
pH	potencial hidrogeniônico
PI	propidium iodide
RNA	ácido ribonucleico
RT	room temperature (temperatura ambiente)
s	segundo(s)
V	vitellogenic (vitelogênico)
VS	vitrification solutions

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criobiologia vem se destacando na medicina reprodutiva, visto que é uma tecnologia importante na formação de bancos de células germinativas para a estocagem de DNA de genótipos valiosos. Diversos trabalhos vêm obtendo resultados satisfatórios em criobiologia reprodutiva, incluindo nascimentos após o transplante de ovários previamente congelados. Assim, com a finalidade de preservar a fertilidade feminina, a criopreservação de tecido ovariano vem tendo cada vez mais destaque na área de biotecnologia animal e humana, com aplicações médicas e científicas.

A criopreservação é definida como a preservação da viabilidade das células ou dos tecidos armazenados em baixas temperaturas, em estado de quiescência, induzindo à parada das reações enzimáticas, possibilitando, após o aquecimento do sistema, a restauração da atividade metabólica (Cheuiche et al., 2011).

A criopreservação de embriões é uma ferramenta consagrada com taxas de sobrevivência e gestação aceitáveis, de 96,9% e 40,5% na vitrificação e de 82,8% e 21,4% no congelamento lento, respectivamente (Valojerdi et al., 2009). E a criopreservação de oócitos tem evoluído, especialmente com o uso de novos protocolos (Kuwayama, 2007; Dondorp et al., 2012). No entanto, em ambas as técnicas a coleta de oócitos maduros requer estimulação hormonal (Wang et al., 2009), o qual demanda tempo e, infelizmente, na maioria das neoplasias malignas, não é possível aguardar esse tempo antes de iniciar o tratamento. Assim, a criopreservação de tecido ovariano é uma alternativa para a preservação da fertilidade de mulheres que necessitam de tratamentos tóxicos às gônadas, como quimioterapia, ou com problemas de infertilidade que possa causar falha ovariana prematura (Andersen et al., 2008; Zhou et al., 2010). Na medicina veterinária, a implantação de um banco de tecido ovariano pode ser aplicada para a estocagem de DNA de animais de alto valor zootécnico, transgênicos ou espécies em perigo de extinção (Santos et al., 2010).

O zebrafish (*Danio rerio*) tornou-se um importante modelo no estudo de genética, biologia do desenvolvimento e biomedicina (Kalueff et al., 2014). Ele tem um papel cada vez mais expressivo na área da pesquisa médica uma vez que o genoma do zebrafish possui semelhanças com o genoma humano (Howe et al., 2013). Assim, o zebrafish é uma alternativa promissora como modelo biológico para otimizar os protocolos de criopreservação para uso humano. No entanto, apesar de inúmeras tentativas de criopreservar embriões e oócitos de peixes terem sido conduzidas (Guan et al., 2008, Zhang et al., 2008), um protocolo bem sucedido ainda permanece inexistente. A grande maioria das pesquisas utilizou a técnica de resfriamento lento, a qual requer um procedimento controlado e gradual redução de temperatura, entretanto, ocorre o risco de cristalização da água intracelular que está correlacionada com danos de membrana. A vitrificação, em contraste, na presença de soluções crioprotetoras altamente concentradas, permite a redução brusca de temperatura proporcionando a passagem do líquido para um estado vítreo amorfo, evitando a formação de cristais de gelo.

Nos últimos anos, uma variedade de procedimentos e recipientes de transporte têm sido desenvolvidos para aumentar a eficiência da vitrificação, no entanto, a maioria desses recipientes são confeccionados de polipropileno, composto caracterizado por apresentar baixa condutibilidade térmica. Assim, buscando alcançar uma alta taxa de resfriamento nas amostras, pesquisadores têm desenvolvido técnicas colocando o material em contato direto com o nitrogênio líquido (NL). Entretanto, esse procedimento pode acarretar a contaminação do material biológico, inutilizando a amostra para transplante.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de tecido ovariano de zebrafish após vitrificação utilizando um recipiente manufaturado em aço inoxidável que, além de evitar o contato direto com o vapor ou o próprio NL, é um excelente condutor de calor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Criopreservação na reprodução assistida

A criobiologia (do grego *kryos* = frio, *bios* = vida, e *logos* = ciência) é o ramo da biologia que estuda os efeitos de baixas temperaturas em sistemas biológicos. A partir dos conhecimentos obtidos da criobiologia, desenvolveu-se a criopreservação.

A criopreservação é definida como a preservação da viabilidade das células ou dos tecidos armazenados em baixas temperaturas, em estado de quiescência, induzindo à parada das reações enzimáticas, possibilitando, após o aquecimento do sistema, a restauração da atividade metabólica (Cheuiche et al., 2011). Assim, essa biotecnologia vem sendo estudada por muitos pesquisadores devido ao seu potencial no tratamento da infertilidade humana, estocagem de DNA de animais de alto valor zootécnico, transgênicos ou espécies em perigo de extinção (Santos et al., 2010). Recentemente, também vem sendo empregada para preservação de células-tronco destinadas à medicina regenerativa (He et al., 2008).

Os primeiros sucessos obtidos na criopreservação foram primeiramente relatados por Whittingham et al. (1972) e Wilmut (1972) para embriões de camundongos e por Trounson & Mohr (1983) para embriões humanos. Desde então, a criopreservação de embriões tornou-se uma ferramenta consagrada com taxas de sobrevivência e gestação aceitáveis, de 96,9% e 40,5% na vitrificação e de 82,8% e 21,4% no congelamento lento, respectivamente (Valojerdi et al., 2009). E a criopreservação de oócitos tem evoluído, especialmente com o uso de novos protocolos (Kuwayama, 2007; Dondorp et al., 2012; Al-Azawi et al., 2013). No entanto, em ambas as técnicas a coleta de embriões e oócitos maduros requer estimulação hormonal (Wang et al., 2009), a qual demanda tempo e, infelizmente, na maioria das neoplasias malignas, não é possível aguardar esse tempo antes de iniciar o tratamento. Estima-se que mais de um terço das mulheres jovens expostas à terapia contra o câncer desenvolvem falência ovariana prematura (Chung et al., 2013). Assim, a criopreservação de tecido ovariano é uma alternativa para a preservação da fertilidade de mulheres que necessitam de tratamentos tóxicos às gônadas, como quimioterapia, ou com problemas de infertilidade que possam causar falha ovariana prematura (Andersen et al., 2008; Ting et al., 2011). Porém, essa tecnologia também pode ser utilizada para qualquer mulher que deseja prolongar o seu tempo de vida reprodutiva. Por outro lado, um fator que deve ser avaliado é a idade da paciente. Considerando que a criopreservação destrói certo número de folículos e que mulheres em torno da menopausa têm significativa perda de folículos, após o congelamento/aquecimento é improvável que se consiga folículos suficientes para uma gestação (Aubard et al., 2001). Assim, para mulheres acima de 40 anos, a criopreservação de tecido ovariano pode ser ineficaz.

Na medicina veterinária, a grande vantagem na criopreservação do tecido ovariano é não precisar de estimulação hormonal (Zhou et al., 2010),

permitindo a coleta do material independente da idade ou fase do ciclo estral (Saraiva et al., 2010). Essa particularidade é muito interessante, sobretudo para animais de alto valor genético, científico ou sentimental que venham a óbito de forma inesperada (Shaw et al., 2000).

2.2. Porque criopreservar tecido ovariano

O sucesso da criopreservação de tecido ovariano tem sido amplamente demonstrado. Em animais, a criopreservação de tecido ovariano mostrou-se eficiente em diversas espécies incluindo murinos (Liu et al., 2001; Liu et al., 2008; Wang et al., 2009), ovinos (Bordes et al., 2005; Onions et al., 2007), caprinos (Santos et al., 2009), bovinos (Celestino et al., 2008), suínos (Borges et al. 2009) e primatas não humanos (Ting et al., 2011; Lu et al., 2014). Em humanos, estudos recentes relatam nascimentos após transplante de tecido ovariano que havia sido criopreservado (Donnez et al., 2004; Meiorow et al., 2005; Demeestere et al., 2007; Andersen et al., 2008; Roux et al., 2010; Dittrich et al., 2012; Donnez et al., 2012), comprovando o avanço da criopreservação e do transplante ovariano.

Pesquisas têm demonstrado por análise histológica, que folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano após a congelação e descongelação apresentam-se morfológicamente inalterados (Martinez-Madrid et al., 2004; Thomaz et al., 2005; Amorin et al., 2012; Bos-Mikichi et al., 2012). Os oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais, especialmente nos primordiais, possuem características que os tornam mais tolerantes a criopreservação do que os oócitos maduros (Shaw et al., 2000). Dentre as quais, pode-se destacar: a) o menor tamanho do oócito, bem como das células da granulosa (células de suporte); b) baixa taxa metabólica; c) estágio do ciclo celular (núcleo em prófase I); d) número restrito de células de suporte; e) ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais e f) pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis às baixas temperaturas (Shaw et al., 2000; Kagawa et al., 2009; Hornick et al., 2012). Um experimento congelando tecido ovariano ovino relatou que os folículos imaturos podem ser criopreservados sem danos irreversíveis ao seu DNA (Merdassi et al., 2011). Salehnia et al. (2012) relataram que a vitrificação de tecido ovariano humano não afetou a morfologia de folículos primordiais ou primários e que não houve sinal de apoptose nessas células.

A criopreservação do córtex ovariano também evita conflitos éticos, religiosos e legais que pode haver na criopreservação de oócitos e embriões, principalmente quando esse procedimento é realizado na espécie humana (Zhang et al., 2009). Desse modo, a criopreservação de tecido ovariano tem despertado um grande interesse na reprodução clínica assistida em humanos, especialmente para pacientes que necessitam de tratamento imediato contra o câncer (Silber et al., 2012).

2.2.1. Criopreservação de fragmentos de tecido ovariano

A criopreservação de tecido ovariano é principalmente realizada utilizando fragmentos pequenos com dimensão menor ou igual a 2 mm

(Ferreira et al., 2010). Em tecidos mais espessos poderia não ocorrer adequada penetração do agente crioprotetor, assim não haveria completa proteção contra os danos causados pelo procedimento de criopreservação. Ferreira et al. (2010) observaram uma maior ocorrência de alterações morfológicas quando o tecido ovariano bovino foi congelado em dimensão superior à 2 mm. Em outro trabalho desenvolvido recentemente, Lu et al. (2014) avaliaram os efeitos de diferentes tamanhos de tecido ovariano de babuínos sobre a eficiência da vitrificação. Os níveis de 17- β estradiol, bem como a porcentagem de folículos primordiais morfolologicamente normais, foram significativamente mais elevados em cortes de 0,5-1,5 mm do que em cortes de 2 mm, os autores sugeriram, portanto, que fragmentos menores e mais finos seriam mais adequados na vitrificação de tecido ovariano. Entretanto, além do tamanho dos fragmentos, o tempo de exposição, o tipo e a concentração do crioprotetor desempenham um papel importante para o sucesso da criopreservação (Sheikhi et al., 2013).

A criopreservação de fragmentos de tecido ovariano seguida de transplante tem obtido sucessos com nascimento de bebês saudáveis (Donnez et al., 2004; Meiorow et al., 2005; Demeestere et al., 2007; Andersen et al., 2008; Roux et al., 2010; Dittrich et al., 2012; Donnez et al., 2012), no entanto, a eficiência desse método ainda é baixa (Milenkovic et al., 2012). Após a reimplantação dos enxertos avasculares há uma alta perda folicular causada pela isquemia (Kim, 2010). Além disso, a distribuição de folículos pré-antrais no córtex ovariano humano é desigual, dificultando a avaliação quantitativa e qualitativa da população folicular em fragmentos de ovário (Vanacker et al., 2013).

2.2.2. Criopreservação de ovário inteiro

De acordo com Milenkovic et al. (2012) a maior parte da perda folicular não acontece durante o procedimento de criopreservação, e sim durante o processo isquêmico. Deste modo, a criopreservação de ovário inteiro tem sido investigada com o objetivo de alcançar anastomoses vasculares e o funcionamento do órgão após o transplante (Martinez-Madrid et al., 2004; Kim, 2010). Além de evitar o longo período de isquemia, e a consequente perda folicular, um grande pool de folículos é transplantado quando se mantém o ovário intacto, ao contrário do que ocorre nos fragmentos de tecido ovariano (Brännström & Milenkovic, 2010).

A criopreservação de ovário inteiro mostrou restaurar a fertilidade em ratas (Milenkovic et al., 2012) e ovelhas (Courbiere et al., 2009), porém uma alta taxa de perda folicular foi observada. Arav et al. (2010) relataram seis anos de função ovariana após congelamento e transplante, realizado por meio de anastomose microvascular, de ovários intactos. Em humanos, as pesquisas em criopreservação e transplante de ovário inteiro ainda estão nos estágios iniciais (Rodriguez-Wallberg & Oktay, 2012).

No entanto, o transplante vascular de ovários inteiros criopreservados tem duas limitações principais: a dificuldade técnica em proceder a reanastomose e o desafio de criopreservar um órgão intacto

(Brännström & Milenkovic, 2010). Estas questões devem ser resolvidas em pesquisas com modelos experimentais antes de chegarem à clínica humana como um procedimento experimental.

2.2.3. Avaliação de folículos ovarianos após criopreservação

A eficiência da criopreservação do tecido ovariano pode ser avaliada através de diferentes parâmetros, entre eles: a viabilidade celular, por meio de corantes vitais e/ou marcadores fluorescentes (Chambers et al., 2010); a manutenção da morfologia dos folículos e do estroma ovariano, analisados por microscopia de luz e eletrônica de transmissão (Sheikhi et al., 2011; Sheikhi et al., 2013); e pelo desenvolvimento folicular *in vitro* (cultivo *in vitro*) ou *in vivo* (transplante) (Telfer & Zelinski, 2013).

Sheikhi et al. (2013) relatam que a microscopia eletrônica permitiu a visualização detalhada das alterações ultra-estruturais em folículos e no estroma, após criopreservação de tecido ovariano.

Autores afirmam que a análise histológica apresenta limitações, pois nem sempre a capacidade de desenvolvimento folicular pode ser correlacionada com a manutenção da morfologia celular (Martinez-Madrid et al., 2004). Sabe-se que a criopreservação pode acarretar ruptura da membrana celular, ocasionando a morte das células. Assim, corantes vitais como azul de Trypan (Zampolla et al., 2011) ou marcadores fluorescentes, como o diacetato de fluoresceína (DAF) e o iodeto de propídio (PI) (Tsai et al., 2009b; Zampolla et al., 2009) têm sido usados para análise da viabilidade celular dos folículos após isolamento do tecido ovariano. As moléculas apolares de DAF entram na célula e são hidrolisadas por esterases produzindo um composto polar de fluoresceína. Em células viáveis, a fluoresceína é incapaz de atravessar a membrana intacta, que se acumula no citoplasma da célula, enquanto que em células danificadas ocorre perda de fluoresceína através da membrana celular. Células vivas com membranas intactas são distinguidas pela sua capacidade de excluir o PI que facilmente penetra em células mortas ou danificadas e se liga às fitas de DNA e/ou RNA, gerando uma fluorescência vermelha brilhante (Zampolla et al., 2009). Assim, no teste DAF + IP, os folículos fluorescentes verdes brilhantes são considerados viáveis e os vermelhos brilhantes inviáveis.

Além dessas técnicas, o cultivo *in vitro* dos folículos pode ser uma ferramenta importante na avaliação da eficiência da criopreservação (Anil et al., 2012), bem como o transplante do tecido ovariano pós-descongelamento (Liu et al., 2008; Santos et al., 2009; Lee et al., 2014).

2.3. Métodos e etapas da criopreservação

Os protocolos de criopreservação podem ser classificados em dois grandes grupos como "protocolos de equilíbrio" ou lentos e "protocolos sem-equilíbrio" ou super-rápidos (vitrificação), conforme a curva de resfriamento e os agentes crioprotetores utilizados (Rosato & Iaffaldano, 2013). Ambos os protocolos baseiam-se nos mesmos princípios de proteger as células dos danos devido à formação de gelo intracelular, da desidratação célula excessiva

e das alterações nas concentrações de solutos. O congelamento lento é considerado o método convencional de criopreservação, no entanto, a vitrificação surgiu como um método alternativo ao congelamento lento (Rall & Fahy, 1985), e atualmente vem sendo amplamente utilizada para a conservação de tecido ovariano (Zhou et al., 2010).

O congelamento lento requer um procedimento controlado e gradual de temperatura, através do uso de congeladores programáveis, entretanto, ocorre o risco de cristalização que está correlacionada com danos de membrana. A vitrificação, em contraste, na presença de soluções crioprotetoras altamente concentradas, permite a redução brusca de temperatura proporcionando a passagem do líquido para um estado vítreo amorfo, evitando a formação de cristais de gelo (Rodriguez et al., 2011). No entanto, a ausência de cristalização, não exclui a possibilidade da ocorrência de danos celulares, como por exemplo, de origem tóxica ou osmótica. As lesões tóxicas são comuns no processo de vitrificação, devido à necessidade do uso de altas concentrações de soluções crioprotetoras, porém o grau de toxicidade vai depender das propriedades dos crioprotetores, somadas ao tempo e à temperatura de exposição (Bertolini et al., 2005). O método de vitrificação, além de ser um procedimento extremamente rápido, apresenta a vantagem do custo reduzido, já que não requer a utilização de um equipamento programável de congelamento (Yavin et al., 2009).

O processo de criopreservação, independente de congelamento lento ou vitrificação, é constituído basicamente pelas seguintes etapas: 1) exposição à solução crioprotetora (período de equilíbrio); 2) resfriamento e redução gradual da temperatura ou vitrificação; 3) estocagem em NL; 4) descongelamento ou aquecimento e 5) remoção da solução crioprotetora (Santos et al., 2008).

2.3.1. Vitrificação

A matéria em condições normais existe em um dos três estados: gás, líquido ou sólido. Mas, e o estado vítreo ou amorfo? É um estado de matéria que combina a estrutura ordenada dos materiais sólidos cristalinos, com a estrutura desordenada, característica dos líquidos (Wowk, 2010). O resultado do "líquido sólido" é chamado de vidro. Os átomos no estado vítreo, embora apresentem um arranjo desordenado, apresentam uma posição fixa (Figura 1). O vidro resulta de um arrefecimento rápido de materiais que foram fundidos, tornando-se rígidos, sem adquirirem uma estrutura sólida cristalina. O processo inverso da fusão é a cristalização, que ocorre através do arrefecimento do líquido à mesma temperatura que ocorre a fusão. Esse processo de tornar-se vidro por arrefecimento é chamado de vitrificação (do grego *vitri* = vidro). Assim, para que ocorra vitrificação é necessário que o arrefecimento seja rápido, não havendo tempo para que ocorra a reorganização da estrutura atômica dos materiais, requerida pela cristalização (Zarzycki et al., 1991).

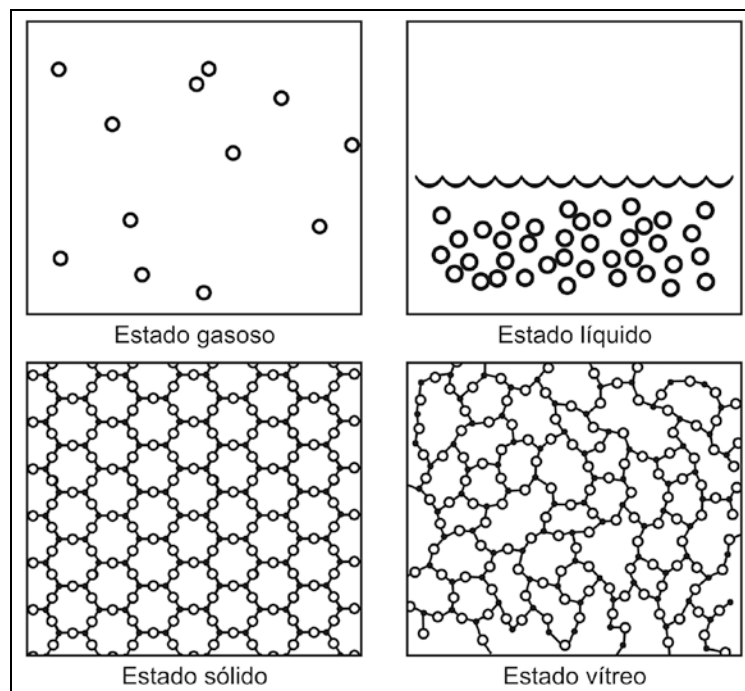


FIGURA 1. Arranjos dos estados físicos da matéria.

A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido (Wowk, 2010).

A vitrificação, em criobiologia, pode ser definida como o processo no qual um líquido solidifica sem cristalização, mas também, de acordo com Taylor-Robinson et al. (2014), pode ser considerada pelo aumento extremo na viscosidade das soluções a baixas temperaturas. De modo a induzir o fenômeno em condições práticas, existem duas exigências: concentrações relativamente elevadas de agentes crioprotectores (4 a 8 mol/L) e altas velocidades de resfriamento e aquecimento ($> 20.000 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou superior) (Vajta, 2013).

De acordo com Sharma et al. (2010) a vitrificação poderia minimizar as crioinjúrias no citoesqueleto e nas membranas celulares devido as altas taxas de resfriamento obtidas por essa técnica.

Essa metodologia tem se tornado popular por dispensar equipamentos, já que a exposição ao NL pode ser feita de maneira eficiente em uma pequena caixa de isopor (Vajta, 2010). Outra vantagem dessa técnica é ser extremamente rápida quando comparada ao congelamento lento que tem duração de aproximadamente 3 h enquanto que a vitrificação requer apenas alguns minutos (Al-Azawia et al., 2013).

Bos-Mikich et al. (1995) mostraram que a vitrificação de oócitos murinos, não ocasiona danos cromossômicos após o aquecimento, e que o desenvolvimento fetal se assemelha àqueles obtidos de fertilização *in vitro*.

Trabalhos têm relatado, ainda, que a vitrificação não aumenta a incidência de apoptose das células do estroma ou dos folículos primordiais ou primários em tecido ovariano humano (Salehnia et al., 2012; Sheikhi et al., 2013). Além disso, Dominguez et al. (2013) relataram não haver distúrbios no metabolismo de embriões desenvolvidos a partir de oócitos vitrificados.

Recentemente, um experimento avaliou o efeito da vitrificação de oócitos murinos sobre o comportamento da prole adulta, e os resultados mostraram que a vitrificação dos oócitos não causou alterações significativas, quer na locomoção ou na coordenação motora dos descendentes (Liu et al., 2013). Além disso, a prole de oócitos vitrificados não apresentaram alterações no comportamento emocional.

Assim, a vitrificação vem sendo amplamente utilizada, em mamíferos, para a conservação de células, tecidos e órgãos reprodutivos, como o ovário (Zhou et al., 2010; Carvalho et al., 2013; Fathi et al., 2013), e tem mostrado resultados promissores na preservação dos folículos e do estroma de diversas espécies, incluindo os seres humanos (Isachenko et al., 2009; Keros et al., 2009; Sheikhi et al., 2011; Sheikhi et al., 2013).

As principais desvantagens relacionadas à vitrificação são o estresse osmótico e a toxicidade causada pela solução crioprotetora, os quais têm efeitos deletérios às células (Lee et al., 2010). De acordo com Vajta (2010) é possível minimizar os danos através da utilização de rápidas taxas de resfriamento, que reduzem a toxicidade dos crioprotetores e diminuem o tempo de exposição da célula às temperaturas críticas. O aumento da velocidade da curva reduz as lesões da porção lipídica das membranas celulares e do citoesqueleto, por passar rapidamente pelas zonas térmicas críticas (Arav, 2014).

Segundo Arav (2014) quanto menor o volume da amostra, maior a probabilidade de vitrificação, pois volumes menores permitem uma melhor transferência de calor, facilitando assim uma maior taxa de resfriamento.

2.3.2. Agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores são compostos químicos naturais ou sintéticos utilizados a fim de proteger as células das injúrias causadas durante o congelamento e descongelamento. Entre as funções dos crioprotetores, a principal é remover e/ou substituir o líquido intracelular (Ebertz & McGann, 2004). Rosato & Iaffaldano (2013) ressaltaram que os crioprotetores são necessários para aumentar a permeabilidade da membrana e a desidratação parcial da célula, diminuindo o ponto de congelamento, e reduzindo assim a formação de cristais de gelo intracelulares.

As características ideais descritas por Fahy (2010) para um agente crioprotetor foram baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta capacidade de atravessar a membrana celular.

Os crioprotetores intracelulares são substâncias orgânicas bastante

solúveis e de baixo peso molecular capazes de penetrar nas células e conduzir sua ação protetora por todo o citoplasma e organelas, por isso, também são chamados de crioprotetores permeáveis (Hubálek, 2003). Merino et al., (2011) citou o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (Me_2SO), o propilenoglicol e o glicerol como os crioprotetores intracelulares mais utilizados. O glicerol é usado frequentemente na criopreservação de sêmen de diferentes espécies e tem baixa toxicidade. No entanto, o glicerol não é recomendado para a criopreservação de oócitos e tecido ovariano devido à sua baixa solubilidade (Rodriguez-Wallberg & Oktay, 2012). Já o etilenoglicol, o propilenoglicol e o Me_2SO , por outro lado, possuem alta solubilidade na água e penetram rapidamente nas células. O Me_2SO tem peso molecular 78 e é rapidamente permeável através das membranas (Hubálek, 2003). O propilenoglicol tem peso molecular 76 e é caracterizado por uma baixa toxicidade, sendo considerado atualmente como um composto não-genotóxico ou carcinogênico (Aye et al., 2010), bem como o etilenoglicol que possui peso molecular 62 e é um diálcool com rápida capacidade de difusão (Baudot & Odagescu, 2004).

O uso de álcoois monovalentes é pouco frequente, devido à sua alta toxicidade. No entanto, o metanol e, em menor concentração, o etanol, podem ser eficazes na criopreservação de algumas células procarióticas e eucarióticas (Hubálek, 2003). Zhang et al. (2005) sugeriram que o metanol, devido ao seu baixo peso molecular (32) tem uma alta taxa de permeabilidade, superando significativamente o Me_2SO . Além disso, em um teste de exposição por 30 min, o metanol foi menos tóxico que o Me_2SO para embriões de zebrafish (Zhang et al., 1996).

Os crioprotetores extracelulares são açúcares ou polímeros de alto peso molecular e, portanto, não conseguem penetrar no interior das células, assim, são denominados também de não permeáveis (Hubálek, 2003). Por serem compostos hidrofílicos, eles se ligam às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução e diminuindo a formação de cristais de gelo (Fahy, 2007).

Frequentemente os crioprotetores extracelulares são associados aos crioprotetores intracelulares para controlar a reidratação celular durante o aquecimento (Yavin et al., 2009). A adição de sacarose, por exemplo, à solução crioprotetora ou solução de aquecimento leva a retenção de água no meio extracelular de forma que a saída de crioprotetor seja mais rápida que a entrada de água na célula, diminuindo o estresse osmótico e a cristalização no meio intracelular (Fahy, 2007). Godoy et al. (2013) relatou que presença de sacarose na solução de vitrificação aumentou a viscosidade e a temperatura de transição vítrea, conseqüentemente, melhorando a vitrificação. Os açúcares também podem reduzir a toxicidade química dos crioprotetores, pois o aumento da viscosidade permite que se reduza a concentração de crioprotetor e, portanto, a toxicidade (Rodrigues et al., 2008; Godoy et al., 2013). Estudos relataram que elevadas concentrações de sacarose em soluções crioprotetoras e de aquecimento aumentam as taxas de sobrevivência oocitária em termos de fertilização e desenvolvimento embrionário (Bianchi et al., 2005; Borini et al., 2006; Bianchi et al., 2007).

Ambos crioprotetores, intracelulares e extracelulares, interagem com os fosfolipídios na membrana celular conferindo uma maior estabilidade à membrana (Dong et al., 2009). Assim, os crioprotetores agem diminuindo a fragilidade das membranas e reduzindo danos.

De acordo com Fahy et al. (2004) os efeitos tóxicos dos crioprotetores são os próprios de cada agente, efeito físico-químico e osmótico. Estratégias, como o uso de crioprotetores menos tóxicos e a combinação de dois ou três, tem sido utilizadas nos procedimentos de criopreservação (Vajta & Nagy 2006).

2.3.3. Danos celulares causados pela criopreservação

Apesar dos sucessos recentes em criobiologia reprodutiva, com nascimentos de descendentes saudáveis tanto por congelamento lento quanto por vitrificação (Setti et al., 2014), sabe-se que a exposição aos crioprotetores, a redução de temperatura e o posterior aquecimento da amostra criopreservada ocasionam danos celulares estruturais e metabólicos (Kopeika et al., 2005; Vajta & Kuwayama, 2006; Gosden, 2011). Por outro lado, de acordo com Vajta & Nagy (2006) os oócitos e os embriões possuem capacidade de reparar parcial ou totalmente os danos, possibilitando a retomada do desenvolvimento.

O congelamento é resultado de duas fases chamadas de nucleação e crescimento dos cristais. A nucleação consiste na associação de moléculas para formar uma pequena partícula ordenada e estável, a qual servirá de base para a formação do cristal. A adição organizada de moléculas de água aos núcleos formados faz aumentar o tamanho dos cristais, e os solutos concentram-se no meio extracelular, criando um gradiente osmótico. Esses dois fenômenos, a formação de cristais de gelo e o aumento da concentração de soluto, são as principais causas de lesão e morte celular associadas à criopreservação (Wong et al., 2014). Assim, os protocolos de criopreservação visam desidratar o espaço intracelular, conseqüentemente minimizando a formação de gelo intracelular e mantendo a concentração de soluto baixa (Smith & Silva e Silva, 2004). O agente crioprotetor, por exemplo, atua durante o processo de desidratação provocando a saída de água do citoplasma para diluir a alta concentração de soluto extracelular. A água, então, congela externamente, conseqüentemente evitando a formação de cristais de gelo intracelular.

Ao contrário do congelamento lento, a velocidade de resfriamento durante a vitrificação é extremamente rápida (> 20.000 °C/min ou superior) (Vajta, 2013). Conseqüentemente, água passa do estado líquido para um estado vítreo, sem exposição ao estágio cristalino (Rall & Fahy, 1985). Assim, as taxas de resfriamento ultra-rápidas reduzem as lesões decorrentes do resfriamento, da porção lipídica das membranas celulares e do citoesqueleto, por passar rapidamente pelas zonas térmicas críticas (Vajta & Kuwayama, 2006).

A sobrevivência da célula, durante a criopreservação, está

fortemente relacionada com a integridade da membrana plasmática, pois essa atua como uma barreira semipermeável entre o citoplasma e o meio externo. Muldrew & McGann (1994) presumem que o gelo se forma através da membrana plasmática após uma lesão, resultante de um gradiente de pressão osmótica e efluxo de água causados pelo resfriamento. Os danos de membrana também parecem estar relacionados com a composição lipídica da membrana, que influencia diretamente suas propriedades bioquímicas e biofísicas, inclusive a resistência ao estresse térmico (Zeron et al., 2002; Arav & Zvi, 2008). A composição lipídica da membrana parece variar de acordo com o desenvolvimento e tipo celular. Tsai et al. (2009a) mostraram, em zebrafish, que a sensibilidade ao resfriamento dos folículos ovarianos variou de acordo com o estágio de desenvolvimento. Provavelmente, essa variação está, em parte, relacionada com a composição fosfolipídica e concentração de colesterol da membrana (Zeron et al., 2002).

A presença de lipídios, seja na forma de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas ou na composição da membrana celular, parece ser um fator limitante no sucesso da criopreservação, principalmente em suínos (Dobrinisky, 2001), felinos (Luvoni, 2006; Galiguis et al., 2014) e peixes (Isayeva et al., 2004). Embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis ao resfriamento do que os produzidos *in vivo*, e essa característica tem sido atribuída à quantidade de lipídios no interior da célula (Pryor et al., 2011). Assim, procedimentos experimentais, tais como a centrifugação (Galiguis et al., 2014) e a remoção por micromanipulação (Men et al., 2011; Higaki et al., 2013), têm sido propostos visando reduzir o alto teor lipídico de oócitos e embriões, aumentando a sobrevivência após a vitrificação.

As gotículas lipídicas intracitoplasmáticas estão fortemente ligadas aos filamentos intermediários do citoesqueleto (Okada et al., 2014) e acredita-se que essa interação esta relacionada à manutenção da morfologia celular (Bodin et al., 2005). As mudanças de estado físico, além de alterarem as propriedades físico-químicas dos lipídios intracelulares, podem causar deformação e ruptura do citoesqueleto (Isachenko et al., 2001).

Durante a criopreservação, o estresse osmótico pode alterar as propriedades físico-químicas e a integridade do citoesqueleto dos oócitos, conduzindo a progressão anormal da divisão meiótica e o retardamento do desenvolvimento embrionário (Wong et al., 2014). Além disso, a ruptura da arquitetura do citoesqueleto pode causar anomalias cromossômicas, bem como a citocinese anormal, e conseqüentemente falhas na fertilização e no desenvolvimento (Eroglu et al., 1998).

Danos no fuso meiótico já foram relatados após a vitrificação de oócitos de bovinos (Hyttel et al., 2000), suínos (Rojas et al., 2004), ovinos (Succu et al., 2007), camundongos (Gomes et al., 2008) e humanos (Martínez-Burgos et al., 2011). A preservação do fuso meiótico de oócitos em metáfase II (maturados) é a principal dificuldade da criopreservação destas estruturas. Nesta fase, os cromossomos estão alinhados sobre a placa equatorial e os microtúbulos ligados aos cromossomos estão estendidos (Rodríguez-Wallberg

& Oktay, 2012), tornando-se mais vulneráveis as crioinjúrias. Rojas et al. 2004 propôs que a criopreservação de oócitos imaturos seria uma alternativa para essa questão, pois nesta fase o fuso meiótico não está organizado ainda.

A formação de cristais de gelo intracelular acarreta danos nas cristas e na matriz das mitocôndrias (Bonetti et al., 2011). Mazoochi et al. (2008) ao vitrificarem tecido ovariano murino observaram redução de cristas mitocondriais e alterações na morfologia mitocondrial. No entanto, em um estudo de vitrificação de oócitos humanos, verificou-se matriz elétron-densa e cristas bem preservadas (Bonetti et al., 2011). A preservação da morfologia e da atividade mitocondrial é essencial para o desenvolvimento oocitário e embrionário, uma vez que essa organela é responsável pela produção de energia celular (Shahedi et al., 2013). As mitocôndrias também têm sido investigadas em embriões criopreservados, pois o ATP produzido pelas mitocôndrias é fundamental na regulação do desenvolvimento durante a embriogênese inicial, incluindo a divisão celular e replicação do DNA genômico (Van Blerkom, 2011). Em embriões de zebrafish, após congelamento lento, foi observado um aumento do nível de mutação no DNA mitocondrial (Kopeika et al., 2005).

As células são submetidas a uma série de fatores durante a criopreservação que podem causar danos ao DNA, entre eles: efeitos específicos e inespecíficos de crioprotetores; alterações da pressão osmótica; redistribuição nos compostos iônicos; alterações do pH; desidratação; transição de fase de biopolímeros; sobrecarga mecânica causada pelos cristais de gelo; efeito do aumento da pressão hidrostática e a ação de radicais livres (Kopeika et al., 2005; Sharma et al., 2010; Riesco et al., 2012). Apesar de haverem muitos estudos sobre os danos da criopreservação na morfologia e viabilidade celular, ainda são poucos os estudos que investigam os efeitos que a criopreservação pode causar ao DNA. Trabalhos tem citado a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como principais responsáveis, direta ou indiretamente, pelos danos às proteínas, lipídios e DNA (Riesco et al., 2012; Zhang et al., 2013). Um estudo em ratas mostrou que o processo de criopreservação de células da granulosa de tecido ovariano, ocasionou estresse oxidativo, fragmentação de DNA e apoptose (Zhang et al., 2013). A apoptose, morte celular programada, é ativada por mecanismos intrínsecos e extrínsecos, como estresse oxidativo e dano no DNA. Morfologicamente é caracterizada pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA, perda de volume celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática e de corpos celulares condensados (Hussein, 2005). A apoptose do tecido ovariano causada pelo processo de criopreservação acarreta a redução do número de folículos sobreviventes. Assim, estudos tem avaliado a ocorrência de apoptose após criopreservação de tecido ovariano. Trabalhos relataram aumento do processo apoptótico nas células foliculares após congelamento/descongelamento de tecido ovariano humano (Rimon et al., 2005; Fauque et al., 2007).

Tanto o resfriamento quanto o aquecimento aumentam a produção de ERO causando alterações no metabolismo oxidativo. O aumento das ERO está relacionado com o estresse osmótico ocasionado pelas concentrações elevadas de crioprotetores e as alterações físico-químicas da célula durante os

procedimentos de criopreservação (Tatone et al., 2010). A produção desequilibrada de ERO resulta em peroxidação de grande quantidade de lipídios da membrana plasmática acarretando perda de fluidez e alteração de permeabilidade (Li et al., 2010).

2.3.4. Sistema aberto versus sistema fechado

A vitrificação pode ser realizada por contato direto (sistema aberto) ou indireto (sistema fechado) com o nitrogênio líquido (NL). Os sistemas abertos possibilitam o resfriamento mais rápido, no entanto, esses sistemas podem apresentar risco de contaminação e transmissão de doenças. De acordo com Bielanski (2012), o NL é uma fonte potencial de contaminação microbiana, portanto, as amostras biológicas devem ser protegidas em recipientes hermeticamente fechados e de alta qualidade. Uma adicional precaução sugerida pelo autor é a desinfecção periódica dos recipientes, evitando assim a ocorrência de contaminação cruzada.

Os criotubos são os recipientes mais populares em laboratórios para a criopreservação e armazenamento de tecido ovariano em NL. No entanto, o NL pode se infiltrar para dentro desses frascos, podendo acarretar contaminação microbiana, e inclusive explosões acidentais após a retirada do frasco do NL (Chen et al., 2006). Portanto, a contaminação pode ocorrer durante os procedimentos de criopreservação ou durante o armazenamento em recipientes indevidamente selados ou danificados (Parmegiani et al., 2010).

Neste contexto, novas abordagens para a prevenção do risco de contaminação estão sendo investigadas, tais como evitar o contato direto com NL, e a esterilização do NL por filtração (McBurnie et al., 2002; Lin et al., 2011) ou por radiação ultravioleta (Parmegiani et al., 2010). Entretanto, os tratamentos por filtração e radiação não garantem a ausência de contaminação do material biológico por vírus (Hawkins et al., 1996). A atenção à segurança do material biológico criopreservado aumentou significativamente após uma transmissão de hepatite B humana através do transplante de medula óssea criopreservada em NL (Tedder et al., 1995).

A utilização de sistemas fechados, tais como o criotubo (Tsang & Chow, 2010), o Cryo Tip (Kuwayama et al., 2005), o Cryopette (Keskintepe et al., 2009) e o VitriSafe (Vanderzwalmen et al., 2009), apesar de eliminarem os riscos de contaminação durante a vitrificação e o armazenamento, apresentam uma redução muito lenta da temperatura (<2.000°C/min) quando comparados aos sistemas abertos (>20.000°C/min) (Vanderzwalmen et al., 2009). Em um estudo comparativo, a taxa de sobrevivência de oócitos após vitrificação foi significativamente maior no sistema aberto (91%) em comparação com o fechado (82%) (Papatheodorou et al., 2013). Os protocolos de vitrificação em sistema fechado requerem o transporte das amostras em um recipiente selado antes do contato com o NL. Deste modo, o isolamento térmico, retarda a taxa de resfriamento na amostra, podendo ocorrer danos pela formação de cristais de gelo (Panagiotidis et al., 2013). No intuito de acelerar a redução de temperatura em um sistema fechado asséptico, Aquino et al. (2014) desenvolveram um recipiente manufaturado em aço inoxidável (Figura 2), que

além de ser um excelente condutor de temperatura, evita o contato direto com o vapor ou o próprio NL. Após a vitrificação de tecido ovariano bovino neste recipiente de metal, os autores observaram elevadas taxas de folículos primordiais e primários morfológicamente normais.



FIGURA 2. Cápsula de metal desenvolvida por Aquino et al. (2014)

2.4. Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo biológico

O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae e é caracterizada pelo pequeno tamanho, podendo atingir em torno de 4-5 cm de comprimento (Spence et al., 2008). Essa espécie possui dimorfismo sexual, no qual os machos são mais afilados e geralmente dourados na região ventral (Figura 3A), e as fêmeas são mais prateadas e arredondadas na região ventral (Figura 3B), o que é mais evidente no período próximo da desova.



FIGURA 3. Dimorfismo sexual em zebrafish, macho (A) e fêmea (B)

O zebrafish é um peixe ovíparo, ou seja, a fertilização e o desenvolvimento são externos. A maturidade sexual é atingida por volta de 10-12 semanas de vida e as fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias, sendo que cada desova pode conter centenas de oócitos (Lawrence, 2007). Entre as vantagens dessa espécie, está o fato de os embriões serem translúcidos, permitindo aos pesquisadores visualizar em tempo real todos os estágios do desenvolvimento embrionário.

Recentemente, foi descrita à semelhança genética de 70% entre humanos e zebrafish, apresentando 12.719 genes em comum (Howe et al., 2013), tornando possível o estudo de doenças e fenômenos de forma extremamente controlada, com resultados científicos detalhados e relevantes.

A popularidade do zebrafish como modelo biológico deve-se as suas características de alta fecundidade, pequeno tamanho, tempo de geração rápido, transparência óptica durante a embriogênese e homologia genética com humanos (Lawrence, 2007). Todas essas vantagens o tornaram um importante modelo vertebrado em várias áreas de investigação, tais como a biologia do desenvolvimento, a fisiologia, a genética e a criobiologia. Além disso, o custo de criação e manutenção é inferior a de outros animais utilizados na pesquisa, por exemplo, na criação de camundongos é cerca de três vezes maior que a de zebrafish (Lieschke & Currie, 2007).

2.5. Estrutura e fisiologia do ovário do zebrafish

O ovário, além da sua função endócrina, é responsável por garantir o desenvolvimento dos folículos e possibilitar a ovulação de oócitos aptos a serem fecundados. Os ovários de peixes foram classificados em três tipos, sincrônico, grupo sincrônico e assincrônico, de acordo com o padrão de desenvolvimento folicular (Wallace & Selman, 1981). No ovário síncrono, os folículos crescem, maturam e ovulam simultaneamente. O ovário do tipo grupo síncrono apresenta pelo menos duas populações de folículos em diferentes fases de desenvolvimento. Os teleósteos com esse tipo de ovário, geralmente ovulam uma vez por ano e os oócitos são liberados num intervalo de tempo relativamente curto. Já os chamados assíncronos, possuem folículos em diferentes fases de desenvolvimento, os quais são liberados à medida que se tornam maduros. Estudos histológicos da estrutura ovariana do zebrafish descreveram o ovário do zebrafish como assíncrono (Çakıcı & Üçüncü, 2007; Koç & Akbulut, 2012; Connolly et al., 2014).

2.5.1. Morfologia ovariana

O zebrafish apresenta um par de ovários alongados, cada um com aproximadamente um centímetro, localizados bilateralmente entre a parede abdominal e a bexiga nadatória. A estrutura é suspensa por um mesovário vascularizado e um curto oviduto conduz os oócitos para o exterior (Menke et

al., 2011). No corte histológico é possível visualizar os folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento (Connolly et al., 2014).

Apesar de o zebrafish possuir sexos separados (gonocorísticos), eles são classificados como hermafroditas transitórios, pois no período larval entre 10 a 25 dias pós-fecundação (dpf), as gônadas inicialmente desenvolvem-se em ovários (Dranow et al., 2013). Em aproximadamente metade da população, o tecido ovariano posteriormente se degenera e é invadido por células somáticas, produzindo um estágio gonadal intersexual que resulta em um testículo (Devlin & Nagahama, 2002).

Em ovários de mamíferos, a divisão mitótica das células germinais se completa antes do nascimento. Assim, o número de oócitos a ser ovulado é limitado ao número de folículos primordiais que são gerados durante a embriogênese. Em contraste, em vertebrados não mamíferos com elevada fecundidade, como o zebrafish, o número de oócitos pode ser infinito (Draper et al., 2007). No ovário adulto destas espécies, as células germinativas mitóticas têm características citológicas de oogônias, assim a formação de oócitos ocorre continuamente ao longo da vida (Nakamura et al., 2011).

2.5.2. Oogênese

A oogênese em teleósteos é um processo dinâmico, no qual ocorre a formação, crescimento e maturação dos oócitos.

As principais etapas do desenvolvimento folicular são a formação de células germinativas primordiais (CGPs), a transformação de CGPs em oogônias e, posteriormente, a sua transformação em oócitos primários, com o início da meiose (Lubzens et al., 2010). O desenvolvimento de CGPs está associado à deposição de genes maternos na forma de transcritos de RNA em regiões específicas do oócito durante o seu desenvolvimento (Hashimoto et al., 2004). Em zebrafish, as CGPs são identificadas oito dpf e são essenciais para a determinação do sexo feminino através da manutenção da expressão de genes específicos do ovário (Okuthe et al., 2014). A transformação de CGPs em oogônias envolve mudanças estruturais e cada oogônia multiplica-se por mitose. Nesta etapa, as oogônias tornam-se rodeadas por uma monocamada de células da granulosa que secretam a lâmina basal, separando o estroma ovariano. Ao redor da lâmina basal está a camada tecal que se associa aos vasos sanguíneos. O oócito formado pela camada interna da granulosa, a lâmina basal e a camada externa de células da teca constitui o folículo ovariano e da origem ao oócito primário (Lubzens et al., 2010). De acordo com Selman et al. (1993) a transição de oogônia para oócito primário é também caracterizada pelo início da primeira divisão meiótica.

Selman et al. (1993) classificaram o desenvolvimento dos oócitos em zebrafish em cinco estádios baseados em critérios morfológicos e em eventos fisiológicos e bioquímicos (Figura 4).

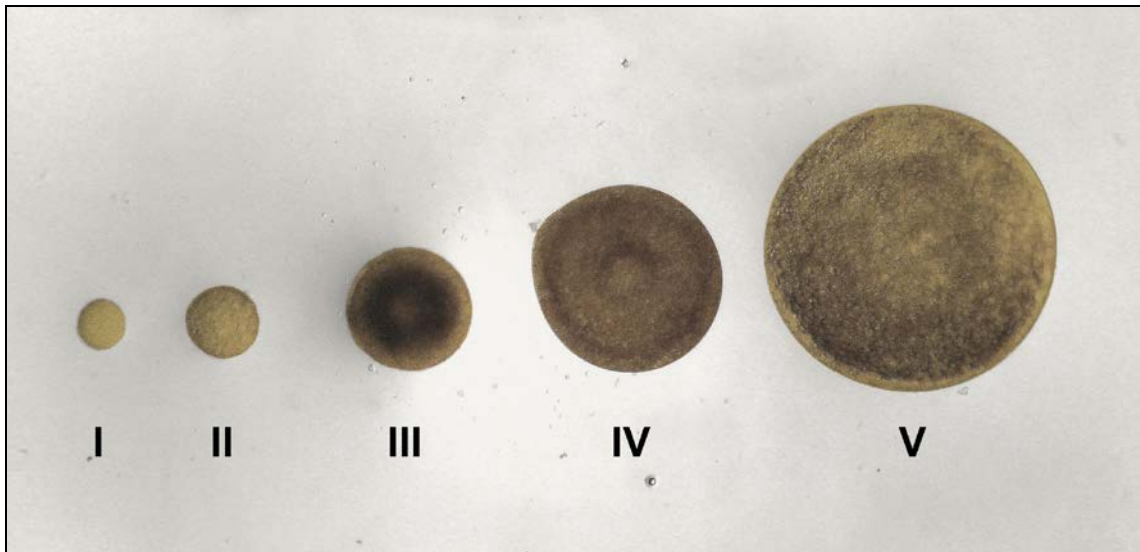


FIGURA 4. Estádios de desenvolvimento oocitário em zebrafish. (I) crescimento primário; (II) cortical-alveolar; (III) vitelogênese; (IV) maturação; e (V) maturo.

O estágio I (fase de crescimento primário) é dividido em duas fases: pré-folicular (diâmetro entre 7 e 20 μm) e folicular (diâmetro entre 20 e 140 μm). Na fase pré-folicular, oócito encontra-se rodeado por uma única camada de células pré-foliculares e o núcleo deste oócito é grande em relação ao citoplasma. Em leptóteno, a cromatina apresenta um aspecto filamentososo e numerosos pequenos nucléolos são visíveis. Devido a essa configuração, alguns autores classificam essa fase como cromatina-núcleo (Lubzens et al., 2010). Com o avanço da meiose, com os oócitos em zigóteno prosseguindo para paquíteno, os cromossomos se tornam mais visíveis. Na fase folicular, no início de diplóteno, os oócitos são individualizados pelas células pré-foliculares que rompem os cistos, formando os folículos ovarianos. Os oócitos se desenvolvem dentro de folículos ovarianos e apresentam múltiplos nucléolos, que se dispõem periféricamente, junto ao envoltório nuclear. Essa conformação, também confere a fase outra nomenclatura chamada perinuclear (Lubzens et al., 2010). Durante esta fase ocorre uma intensa proliferação de organelas, diferenciação das células foliculares e tecais e o citoplasma se apresenta levemente basofílico devido ao acúmulo de RNA (Selman & Wallace, 1989).

No estágio II (fase alvéolo cortical), os oócitos são distinguidos pelo aparecimento de alvéolos corticais de tamanhos variáveis. Esta fase também foi denominada como vitelogênese primária. Os alvéolos corticais são vesículas de glicoproteínas limitadas por membranas e eles se localizam próximos aos complexos de Golgi, que se acredita participarem da síntese de seu conteúdo. À medida que o oócito aumenta, os alvéolos corticais aumentam em número e tamanho, preenchendo o citoplasma. Células especializadas aparecem na teca e pressupõe-se que elas secretam os esteróides necessários para o crescimento do oócito.

No estágio III (vitelogênese), vitelogeninas hepáticas induzidas por esteróides são sequestradas pelos oócitos através de endocitose. As vitelogeninas são glicoproteínas de fosfolípidos que contribuem para a produção de proteínas que são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Connolly et al., 2014). O oócito continua perdendo sua basofilia, o folículo se torna mais opaco e a vesícula germinal é completamente invisível (Wallace & Selman, 1989). Os lípidos que se acumulam no citoplasma do oócito originam de lipoproteínas do plasma e das vitelogeninas (Lubzens et al., 2010).

No estágio IV (maturação), a vesícula germinal (GV) migra para a periferia do oócito, ocorre a quebra da vesícula germinativa (GVBD) e o envelope nuclear rompe-se (Lessman, 2009).

No estágio V (maduro), os oócitos maduros são liberados no lúmen do ovário e estão prontos para serem fertilizados.

2.5.3. Controle hormonal da maturação oocitária

O hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que atua na hipófise estimulando a secreção do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). As gonadotrofinas, por sua vez, regulam a foliculogênese e subsequentemente, a produção de hormônios e fatores de crescimento a partir do ovário. A fase de crescimento está sob o controle de FSH e a fase de maturação ocorre principalmente sob a influência de LH. So et al. (2005) sugeriram que o FSH e o LH exercem os seus efeitos sobre as funções ovarianas através de receptores de membrana localizados nas células da granulosa e da teca. O FSH regula a secreção de 17β estradiol (E2) e a incorporação de vitelogenina nos oócitos (Kwok et al., 2005). O LH estimula a produção de 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α , 20β -DHP).

O FSH se liga aos receptores acoplados nas células da teca estimulando a produção de E2. Durante vitelogênese, o E2 produzido pelas células foliculares estimula os hepatócitos a produzirem vitelogenina. A vitelogenina é levada via corrente sanguínea até o ovário, onde participam da formação de vitelo e da zona pelúcida (Clelland & Peng, 2009).

Em zebrafish, como em muitos teleósteos, a maturação oocitária é desencadeada pelo hormônio 17α , 20β -DHP, que atua sobre um receptor de esteróides na membrana plasmática do oócito (Hanna et al., 2006). O LH se liga aos seus receptores nas células foliculares e induz a secreção de esteróides indutores da maturação (MIS) pelas células da granulosa. Em consequência ocorre retomada da meiose no oócito, a migração da GV e sua posterior quebra (GVBD). O MIS mais comum identificado em várias espécies de peixe, inclusive no zebrafish, é o 17α , 20β -DHP (Ge, 2005). O 17α , 20β -DHP atua ativando o fator promotor da maturação (MPF).

Lister & Van Der Kraak (2008) revelaram que as prostaglandinas, em zebrafish, podem induzir a ovulação e também atuar como feromônios para estimular o comportamento de desova.

3. HIPÓTESES

3.1. A vitrificação pode ser eficiente na criopreservação de tecido ovariano de zebrafish;

3.2. Todas as etapas do processo de vitrificação podem ser realizadas em um sistema fechado, garantindo maior segurança à amostra a ser criopreservada;

3.3. A utilização de um recipiente manufaturado em aço inoxidável que possibilite a vitrificação fragmentos ovarianos ou um ovário inteiro não altera a morfologia e viabilidade folicular;

3.4. A vitrificação de fragmentos de tecido ovariano ou ovário inteiro realizada em um recipiente fechado de metal não afeta a capacidade de desenvolvimento folicular;

3.5. A cápsula de metal pode ser mais eficiente na vitrificação de tecido ovariano de zebrafish do que a palheta de plástico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de tecido ovariano de zebrafish (*Danio rerio*) após vitrificação utilizando um recipiente manufaturado em aço inoxidável, que permite a criopreservação de vários fragmentos de folículos ovarianos ou ovário inteiro.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito de quatro soluções de vitrificação (VS1 – 1,5 M metanol + 4,5 M propilenoglicol; VS2 – 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO; VS3 – 1,5 M metanol + 4,5 M propilenoglicol + 0,5 M sacarose; VS4 – 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO + 0,5 M sacarose) após aquecimento sobre a viabilidade folicular, através das sondas fluorescentes diacetato de fluoresceína (DAF) e iodeto de propídio (IP);

Avaliar a capacidade de desenvolvimento folicular *in vitro*, através do cultivo *in vitro* (CIV) dos folículos em estágio I, após vitrificação de fragmentos e ovário inteiro em palheta de plástico e no novo recipiente de metal;

Avaliar a morfologia dos folículos, por meio da histologia, após vitrificação em sistema fechado utilizando o novo recipiente de metal.

CAPÍTULO II¹

¹ Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Plos One*

SURVIVAL AND DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*) OVARIAN TISSUE AFTER VITRIFICATION IN A CLINICAL GRADE METAL CAPSULE

Lis S. Marques^{1*}, Adriana Bos-Mikich², Leandro C. Godoy³, Laura A. Silva¹, Daniel Maschio¹, Danilo P. Streit Jr¹.

¹ Aquam Research Group, Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Department of Morphological Sciences, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

³ Aquaculture Graduate Program, Nilton Lins University, Manaus, AM, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: lismarx@gmail.com (LSM)

Abstract

Cryopreservation of ovarian tissue is an emerging area in human assisted reproduction and oncology. Zebrafish (*Danio rerio*) has excelled in biomedical research for its physiological and genetic homology to humans. Previous studies of our group has shown that the use of a metal capsule for the cryopreservation of bovine ovarian fragments results in very good primordial and primary follicle morphological integrity after vitrification. The aim of this study was to assess the survival and *in vitro* development of zebrafish follicles after vitrification of fragmented or whole ovaries using the same metal capsule. First, we tested four vitrification solutions (VS1 - 1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol; VS2 - 1.5 M methanol + 5.5 M Me₂SO; VS3 - 1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol + 0.5 M sucrose; VS4 - 1.5 M methanol + 5.5 M Me₂SO + 0.5 M sucrose) and five follicular developmental stages using fluorescein diacetate and propidium iodide supravital staining test. These results showed that immature follicles, stage one, presented the highest survival rates and VS1 the best vitrification solution in terms of viability. In Experiment 2, we used VS1 to vitrify ovarian tissue in different dimensions (fragments or whole ovaries) and tested two different carriers (plastic straw or metal capsule). To evaluate follicular survival and growth of stage I, we measured follicle diameter before and after twenty-four-hour *in vitro* culture. The follicular morphology was analyzed by light microscopy after vitrification using the metal capsule. Data showed that the immature follicles morphology was well preserved after cryopreservation. Follicular survival rate was higher ($P < 0.05$) on vitrified fragments, when compared to whole ovaries. There were no significant differences on follicular survival and growth between the two vitrification devices, plastic straw or metal capsule. However, the metal capsule being tightly sealed and manufactured in stainless steel avoids contact with liquid nitrogen and can be sterilized reducing contamination risk. These reasons lead us to believe that the metal capsule has a potential use in human reproduction for the clinical grade vitrification of ovarian tissue.

Introduction

Ovarian tissue cryopreservation has been widely studied, due to its potential use in human fertility preservation. Zebrafish (*Danio rerio*) has become an important model in the study of human genetics and physiology, developmental biology and biomedicine [1, 2]. Thus, zebrafish is a valid alternative as a biological model to optimize cryopreservation protocols for human use.

To date, the two traditional cryopreservation methods are slow-rate freezing and vitrification. Slow-rate freezing is the most commonly used method for the cryopreservation of human ovarian tissue and embryos [3, 4]. Traditional slow-rate freezing requires a controlled and gradual cooling rate. However, there is the risk of ice formation inside the cell, which may be correlated with membrane damage and cell death. In contrast, vitrification uses highly concentrated cryoprotectant solutions, allowing fast rates of cooling and resulting a glassy state, therefore avoiding ice crystals formation inside the cells. In humans, studies have suggested that the vitrification could be more effective than slow-rate freezing in terms of morphological integrity, particularly the ovarian stroma [5, 6, 7]. However, to date there is only one baby born from vitrification of human ovarian tissue [8].

The advantage of cryopreserving ovarian samples is that it does not need hormonal stimulation [9], allowing the collection of material regardless of age or stage of estrous cycle. This feature is very positive, particularly for women who need gonadotoxic treatment [10] as for oncologic patients. Cryopreservation is predominantly performed with small tissue fragments [11], which, after warming, can be used for follicle *in vitro* maturation [12], xenotransplantation [13] or autotransplantation, both orthotopic or heterotopic [14]. Nevertheless, in different species of animals cryopreservation and transplantation of whole ovaries proved to be effective including mice [15, 16], rabbit [17], canine [18] and sheep [19, 20].

In recent years, a variety of carrier and procedures have been developed to increase the efficiency of vitrification, and majority of these devices aim to achieve a very high cooling rate [21]. Among them, we can mention the cryoloop [22], nylon mesh [23], hemi-straw [24], cryotop [25], vitrification spatula [26] and plastic blade [27]. Researchers have achieved satisfactory results in cell viability using these devices to vitrify embryos and oocytes. However, these devices are open systems that allow the contact of the biological material with the liquid nitrogen (LN2) with the potential risk of contamination. Among the closed systems, there are the cryotube [28] and plastic straw [29]. However, these devices present some problems: cryotube has a relatively thick wall with low thermal conductivity, and the plastic straw, during the sample recovery after cryopreservation, must have its ends cut off, which may lead to material loss.

In 2012, with the purpose of accelerating temperature reduction in the sample, our group developed a vitrification technique in a metal closed system [30]. The technique consists in placing the sample in a handmade aluminium foil shell. The bottom of the shell comes in contact with the LN2 before being stored in a cryotube. In order to improve the technique, our group

created a metal capsule manufactured in stainless steel, which is an excellent thermal conductor. Moreover, it is a closed system that prevents direct contact with vapor or liquid nitrogen. Recently, a protocol for cryopreservation of bovine ovarian tissue was reported [31], on which high rates of primordial (93%) and primary (80%) follicle viability were obtained using this metal capsule. However, the authors presented only light microscopy analysis of tissue viability and no post-cryopreservation follicle survival in terms of *in vitro* or *in vivo* development.

The main objective of the present study was to assess the survival rate and *in vitro* development of vitrified-rewarmed zebrafish ovarian tissue cryopreserved in a stainless steel capsule.

Our results showed that the morphology and viability of immature follicles were preserved after ovarian tissue cryopreservation using the metal capsule. The survival rate and follicular growth in the cryopreserved groups were significantly lower than the control group. However, there was no difference between the plastic straw and the metal capsule. Taken together, our data suggests that the metal capsule has the potential to be used for therapeutic human ovarian tissue cryopreservation, because it protects the sample against a possible contaminant in the liquid nitrogen.

Materials and Methods

Chemicals

Unless otherwise stated, the chemicals used were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

Animals and Ethics

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained in filtered and aerated 40 L aquaria at 27°C under a 14/10 h (light/dark) photoperiod. Fish were fed four times a day with TetraMin® dry flake fish food (Tetra, Germany).

All the experimental procedures and protocols described in this study were approved by the Ethics Committee of our Institution (Federal University of Rio Grande do Sul). Permit Number: 25676.

Ovaries collection

Ovaries were collected from six-month-old adult females, euthanized with a lethal dose of tricaine methane sulfonate (0.6 mg/mL) for 5 min and decapitated. Ovaries were collected and placed in a Petri dish containing 90% Leibovitz L-15 medium (pH 9.0) supplemented with L-glutamine.

Experiment 1 - Ovarian follicles using four different vitrification solutions viability after vitrification.

The aim of Experiment 1 was to test the effects of four different vitrification solutions on ovarian follicle viability.

The cryopreservation procedures are an adaptation of two published vitrification protocols [31, 32]. All cryoprotectants and warming solutions were prepared in Leibovitz L-15 medium (pH 9.0) supplemented with L-glutamine. Ovaries were carefully removed from the Leibovitz L-15 medium and exposed to the equilibrium solution (ES) for 15 minutes at room temperature (RT). Vitrification procedures are illustrated in Figure 1. The ES1 contained 1.5 M of methanol and 2.25 M of propylene glycol, and in ES2 contained 1.5 M of methanol and 2.75 M of dimethyl sulfoxide (Me₂SO). Next, ovaries were divided into four different vitrification solutions (VS): VS1 (1.5 M of methanol and 4.5 M of propylene glycol), VS2 (1.5 M of methanol and 5.5 M of Me₂SO), VS3 (1.5 M of methanol, 4.5 M of propylene glycol and 0.5 M of sucrose) and VS4 (1.5 M of methanol, 5.5 M of Me₂SO and 0.5 M of sucrose). The ovaries were kept in the different vitrification solutions for 90 sec, and then gently transferred with a minimum volume of medium to the metal capsule [31]. The bottom of the metal capsule was placed in contact with LN₂, tightly sealed and immediately plunged in LN₂ for storage. After two to seven days, the metal capsule was removed from the LN₂ for rewarming. The metal capsule remained at RT for 30 sec, exposed to water bath at 28°C and then opened. Ovaries were removed and transferred to the first warming solution containing 1 M sucrose for 1 min, then to the second solution containing 0.5 M sucrose for 3 min and finally to the third solution of 0.25 M sucrose for 5 min, at RT.

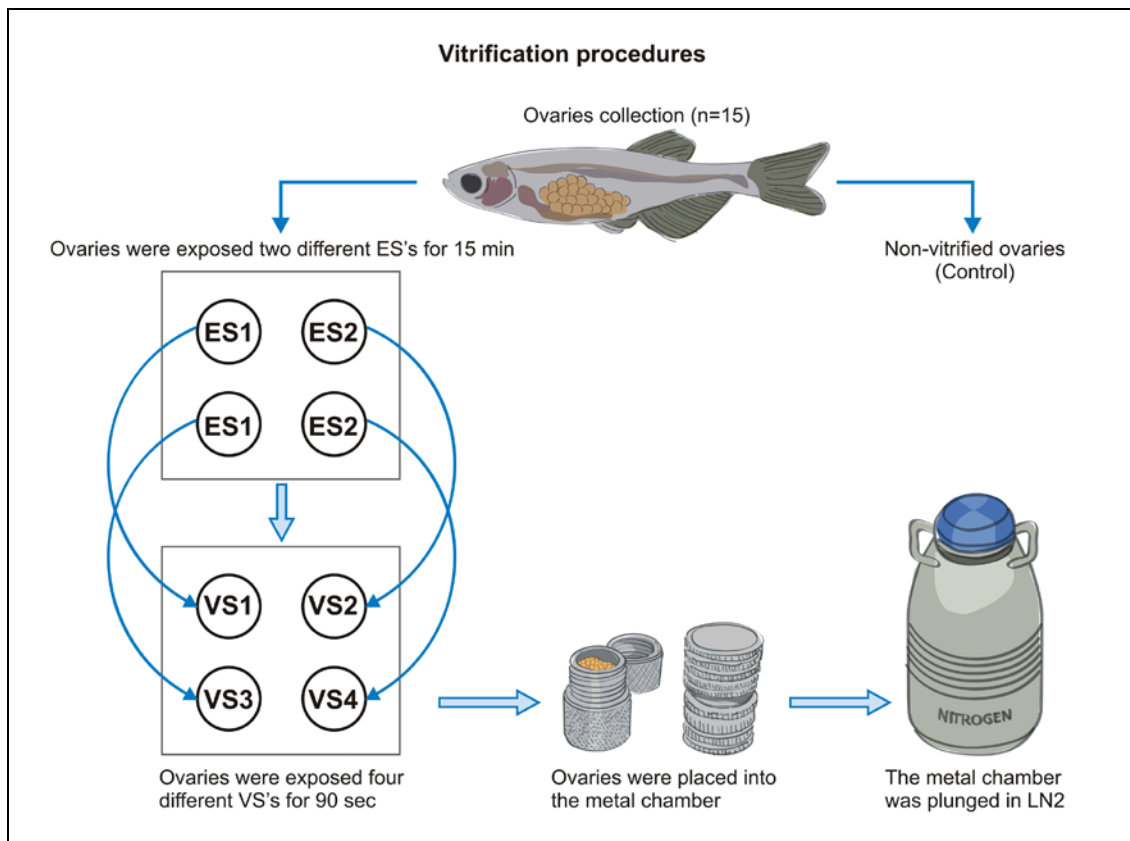


Figura 1. Vitrification procedures of zebrafish ovaries. Equilibrium solution (ES) and vitrification solutions (VS).

Control fresh ovaries were maintained in L-15 medium (pH 9.0) at RT (23-25°C) until staining. Cryopreserved and control follicles were isolated by gentle pipetting in Leibovitz L-15 medium and washed three times in phosphate buffered saline (PBS) (pH 9.0). Five developmental stages were selected: stage I (primary growth); stage II (cortical alveolus); stage III (vitellogenic); stage IV (maturation) and stage V (mature) according to Selman et al. [33]. Ovarian follicle viability was assessed by the method described by Jones and Senft [34]. A stock solution of fluorescein diacetate (FDA) was prepared by dissolving 5 mg/mL FDA in acetone. The FDA working solution was prepared by adding 20 µL of stock solution in 5 mL of PBS. The propidium iodide (PI) solution was prepared by dissolving 1 mg of PI in 50 mL PBS. Ovarian follicles were incubated in drops containing 100 µL (2 µg) FDA working solution and 30 µL (0.6 µg) PI solution in the dark for 3-4 min at RT. Cell viability assessment was performed on an inverted fluorescence microscope (Opton, TNI-51-IMU). The bright green fluorescent follicles were considered viable (Figure 2A) and the bright red stained follicles were considered non-viable (Figure 2B). Experimental and control groups were composed by at least 100 ovarian follicles in each group, and the experiments were repeated three times.

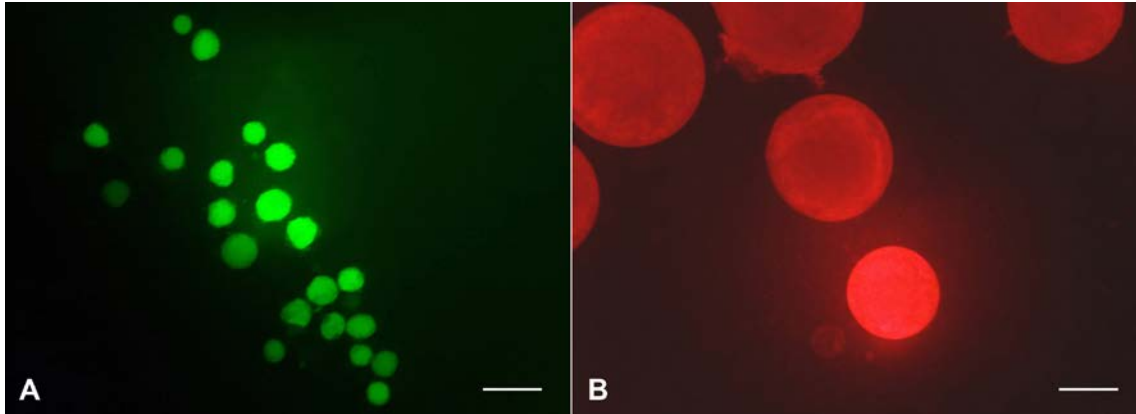


Figure 2. Fluorescein diacetate and propidium iodide assays. Bright green fluorescent follicles, stage I, are viable (A) and bright red fluorescent follicles, stage V, are non-viable (B). Bar=200 μ m.

Experiment 2 – *In vitro* culture of ovarian follicles after vitrification using two different dimensions and cryopreservation systems.

The aim of Experiment 2 was to evaluate the effect of two different tissue sizes (fragment or whole ovary) vitrified in two different devices (metal capsule or plastic straw) on follicular survival and growth.

Fragments containing stage I follicles were carefully dissected from the ovaries and cut into thin slices (2 mm) using syringe needles. The ovarian pieces were stretched so that stage I follicles could easily be observed. Dissections of ovarian fragments were performed within a maximum of 20 min at RT.

Vitrification and rewarming protocols were the same as described in Experiment 1. VS1 from Experiment 1, which showed the highest stage I follicle viability was selected to be used in Experiment 2. In all groups, the samples were vitrified with minimum volume of vitrification solution.

Four vitrification treatments were tested: whole ovary in 5 mL plastic straw (Minitüb, Tiefenbach, Germany) (Group 1), whole ovary in metal capsule (Group 2), ovarian fragments in 5 mL plastic straw (Group 3) and ovarian fragments in metal capsule (Group 4). Groups 3 and 4 were performed with tissue fragments of 0.4-0.5 mm long and 2 mm thick containing stage I ovarian follicles.

After vitrification/rewarming, stage I follicles were isolated and classified as described before (Experiment 1) and the follicles were selected according to their diameter (between 90-140 μ m). Using an *in vitro* culture protocol based on previously published protocols [35, 36, 37] with some modifications, the selected follicles were washed three times with L-15 medium 90% (pH 9.0),

before being randomly distributed into 96 well plates containing 200 μ L of L-15 medium 90% (pH 9.0) supplemented with 0.5 mg/mL follicle stimulating hormone (FSH), 20% fetal bovine serum (FBS) and 100 μ g/mL gentamycin. All follicles, including fresh controls were individually cultured in the wells for 24 h at 28°C. Survival was assessed in terms of follicular diameter increase. Further, growth was evaluated by measuring diameters, before and after *in vitro* culture (IVC), on an ocular micrometer under an inverted light microscope (Carl Zeiss, Axiovert 135, Germany).

The experimental and control groups were composed by 96 ovarian follicles and experiment was repeated three times.

Histological analysis of ovarian follicles

The aim was to assess morphological integrity of ovarian follicles after vitrification in VS1 using the metal capsule by light microscopy.

Whole ovaries were fixed in 10% buffered formalin and prepared for histological analysis, as described by Prophet et al. [38].

The histological evaluation of the control group and the vitrified ovaries was descriptive, and based on criteria described by Selman et al. [33].

Statistical Analysis

Variables between groups in Experiments 1 and 2 were analyzed using the statistical package SAS 9.2 (2009), passing the normality test, followed by analysis of variance, with mean comparison by Duncan test ($P < 0.05$).

Results

Experiment 1 - Ovarian follicles viability assessment using four different vitrification solutions after vitrification.

Table 1 shows follicular viability among the five stages within each group. Stage I follicles showed the highest viability percentage in VS1 after rewarming (Table 1). Therefore, VS1 was chosen to be used in Experiment 2. Stage II follicular viability was superior than observed in stages III, IV and V in groups VS1, VS3 and VS4 ($P < 0.05$).

Table 1. Follicular viability of the five development stages within each group after vitrification.

Stage	Control	VS1	VS2	VS3	VS4
	V (%)	V (%)	V (%)	V (%)	V (%)
I	95.74±2.44	76.84 ^a ±2.28	49.40 ^a ±36.46	54.62 ^a ±13.30	64.17 ^a ±16.34
II	96.66±3.05	43.14 ^b ±12.05	20.27 ^{ab} ±16.34	40.50 ^a ±4.76	45.66 ^a ±19.33
III	91.82±11.70	8.68 ^c ±4.25	6.67 ^b ±4.89	9.36 ^b ±8.16	13.24 ^b ±10.13
IV	90.95±5.34	1.29 ^c ±1.52	7.06 ^b ±36.46	2.30 ^b ±3.18	0.98 ^b ±0.98
V	88.98±3.32	0.30 ^c ±0.52	0.00 ^b	0.59 ^b ±1.03	0.30 ^b ±0.52

V: viable. Control (fresh ovaries), VS1 (1.5 M of methanol and 4.5 M of propylene glycol), VS2 (1.5 M of methanol and 5.5 M of Me₂SO), VS3 (1.5 M of methanol, 4.5 M of propylene glycol and 0.5 M of sucrose) and VS4 (1.5 M of methanol, 5.5 M of Me₂SO and 0.5 M of sucrose). Averages followed by different letters in the same column indicate significant difference. Duncan (P<0.05).

Table 2 compares follicular viability of stages I and II among groups. In stage I, the results showed no significant difference among the control group (95.74%), VS1 (76.84%) and VS4 (64.17%). In stage II, there was significant difference among control and vitrified groups.

Table 2. Follicular viability of stage I and II among groups.

Stage	Control	VS1	VS2	VS3	VS4
	V (%)	V (%)	V (%)	V (%)	V (%)
I	95.74 ^a ±2.44	76.84 ^{ab} ±2.28	42.45 ^b ±36.46	54.62 ^b ±13.30	64.17 ^{ab} ±16.34
II	96.66 ^a ±3.05	43.13 ^{bc} ±12.05	20.27 ^c ±16.34	40.50 ^{bc} ±4.76	45.66 ^b ±19.33

V: viable. V: viable. Control (fresh ovaries), VS1 (1.5 M of methanol and 4.5 M of propylene glycol), VS2 (1.5 M of methanol and 5.5 M of Me₂SO), VS3 (1.5 M of methanol, 4.5 M of propylene glycol and 0.5 M of sucrose) and VS4 (1.5 M of methanol, 5.5 M of Me₂SO and 0.5 M of sucrose). Averages followed by different letters in the same row indicate significant difference. Duncan (P<0.05).

Experiment 2 – *In vitro* culture of ovarian follicles after vitrification using two different dimensions and cryopreservation systems.

Follicular survival rate in control group (86.11%) was significantly higher compared with all four vitrified groups (Figure 3). Among the vitrified groups, Group 3 had the highest rate of follicle survival, however, there was no difference between Group 3 and Group 4 (31.25%; $P < 0.05$). Figure 3 shows that Group 2 had the lowest follicular survival (12.85%) but, there is no significant difference between Group 2 and Group 1 (23.61%; $P < 0.05$). These results suggest that vitrification of ovarian tissue fragments increase the chances of follicular survival in stage I, when compared with whole ovary.

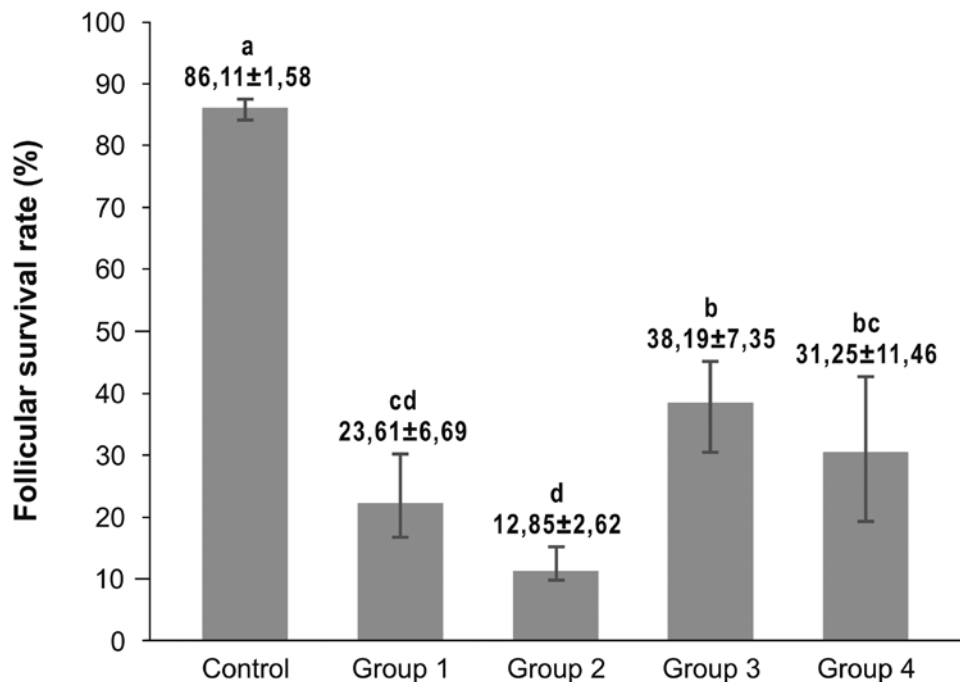


Figure 3. Survival rate of vitrified/rewarmed stage I ovarian follicles after 24 h *in vitro* culture. Group 1 (whole ovary in 5 mL plastic straws), Group 2 (whole ovary in metal capsule), Group 3 (fragments in 5 mL plastic straws), Group 4 (fragments in metal capsule). Bars labelled with common letters do not differ significantly ($P < 0.05$) from each other (mean \pm SD).

Control group showed a greater increase in follicular diameter (40.71 μm), when compared with vitrified groups (Figure 4). However, there was no significant difference between the controls and Group 1 (29.27 μm ; $P < 0.05$).

Among the vitrified groups, there was no significant difference in diameter increase, suggesting that neither the device nor the dimension of the sample had an effect on *in vitro* follicular growth after vitrification/rewarming.

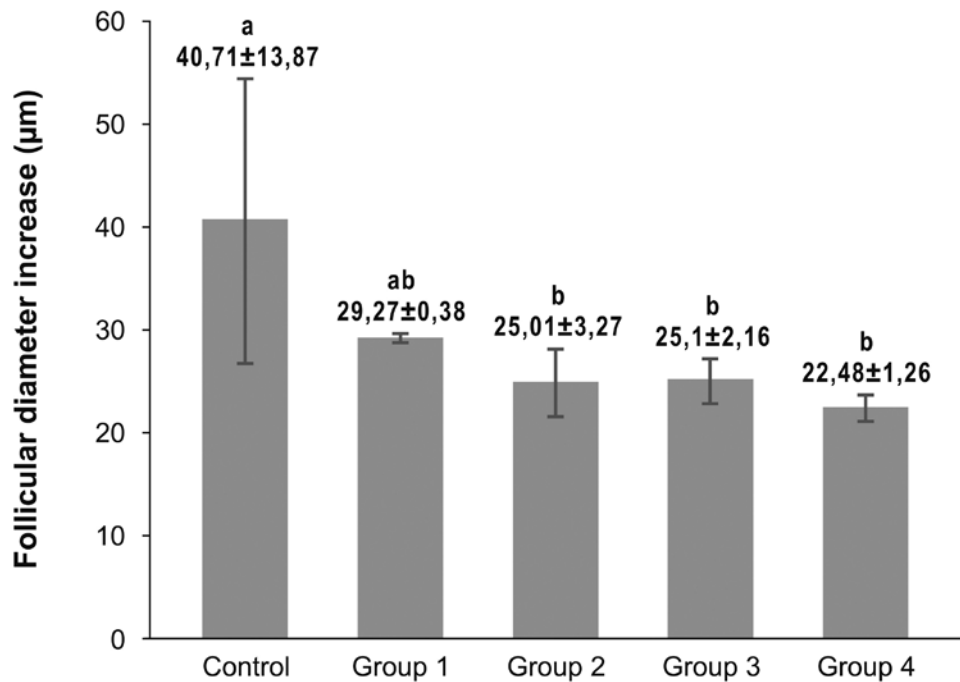


Figure 4. Average diameter growth of vitrified/rewarmed stage I follicles after 24 h *in vitro* culture. Group 1 (whole ovary in 5 mL plastic straws), Group 2 (whole ovary in metal capsule), Group 3 (fragments in 5 mL plastic straws), Group 4 (fragments in metal capsule). Bars labelled with common letters do not differ significantly ($P < 0.05$) from each other (mean \pm SD).

Histological analysis of ovarian follicles

Zebrafish follicular development was divided into four stages (primary growth, cortical alveolus, vitellogenic and mature, Figure 5A), based on morphological characteristics described by Selman et al. [33].

Cortical, vitellogenic and mature stage follicles presented the major cytoplasmic alterations mainly concerning the distribution and integrity of lipid droplets after cryopreservation. Follicle membrane layers appeared detached in a few instances (Figure 5B). However, in higher resolution we could notice that the membrane remained intact (Figure 6B, arrowhead).

The best preserved follicles were the primary growth stage. These follicles showed intact follicular layers and homogeneous cytoplasm. Condensed chromatin was the main alteration observed in primary growth stage (Figure 6B, arrow). All together, these observations suggest that lipid droplets are the most affected cell components during vitrification, potentially making the follicle more susceptible to cryoinjuries.

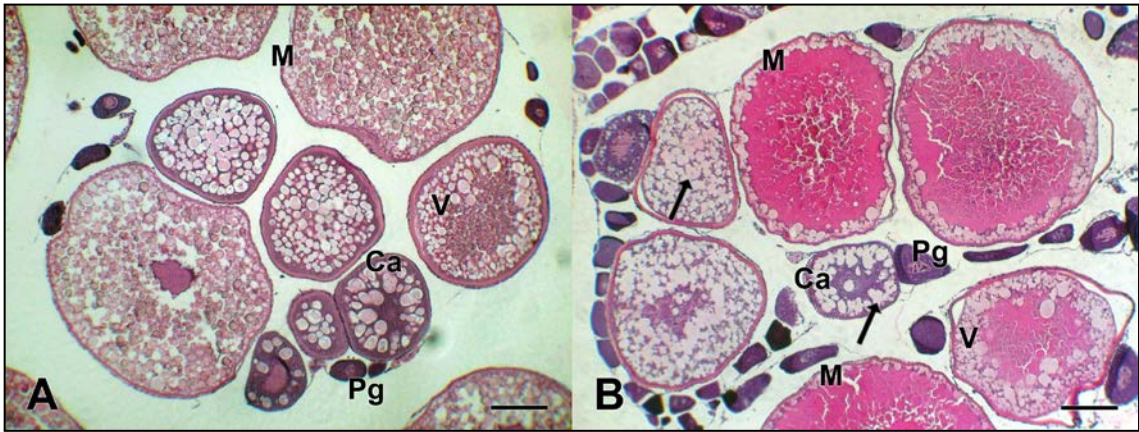


Figure 5. Control group (A) and vitrified ovarian tissue (B). Primary growth stage (Pg), cortical alveolus stage (Ca), vitellogenic stage (V) e mature stage (M). Lysed lipid droplet (arrow in B). Light microscope 10x. Stain: HE. Bar=150 μ m.

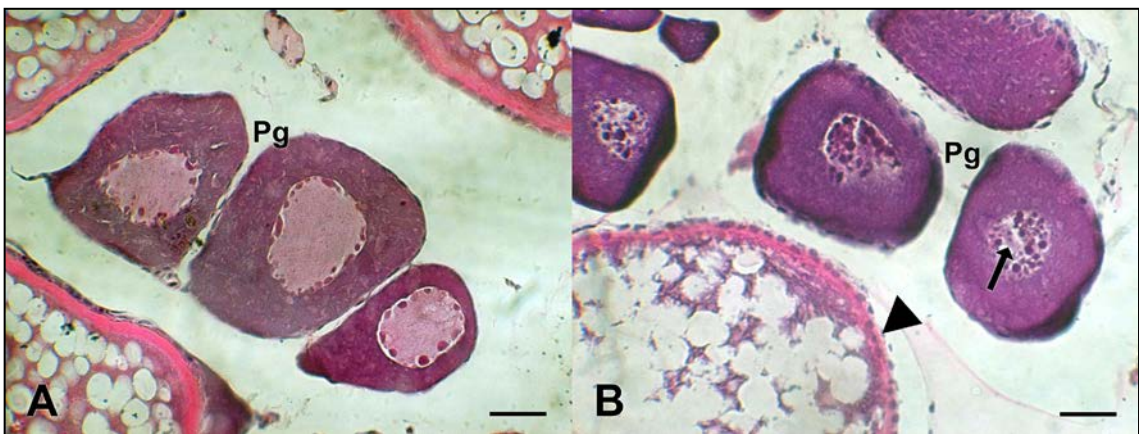


Figure 6. Control group (A) and vitrified ovarian tissue (B). In B condensed chromatin (arrow) and intact follicular membrane layer (arrowhead). Primary growth stage (Pg). Light microscope 100x. Stain: HE. Bar=50 μ m.

Discussion

Cryopreservation of human ovarian tissue is of paramount importance for fertility preservation of oncologic patients. Vitrification has been shown to be an effective mean of cryopreservation resulting in very good stromal and follicular integrity [7, 31, 38] and a recent report of the first baby born after the vitrification of ovarian fragments [8]. Our group has developed a clinical grade metal capsule for the vitrification of ovarian tissue [37] using the bovine model as tissue donor. In that study, despite the very good survival rate measured in terms of stromal, primordial and primary follicle integrity, for technical reasons, we were not able to show *in vitro* or *in vivo* tissue survival in terms of follicular growth. In the present study, we used the zebrafish model to vitrify ovarian

follicles in the same metal capsule and cultured them after rewarming to assess *in vitro* follicular survival and growth.

In Experiment 1, Fluorescein Diacetate and Propidium Iodide assays showed that there were no significant differences between fresh controls and the cryopreserved groups VS1 and VS4. However, in Experiment 2, stage I follicular survival was significantly lower in all four vitrification groups, when compared to fresh controls after *in vitro* culture. The FDA + PI assay is based on the living cells ability to eliminate the PI stain through their intact membranes and in the intracellular esterases to hydrolyze FDA. Although FDA+ PI test demonstrates cell viability, it does not necessarily reflect the oocyte developmental competence. Therefore, IVC is a more accurate procedure to assess follicular viability, because IVC shows cell functional competence.

High rates of primary growth (stage I) follicular viability were obtained after vitrification of whole ovaries using the metal capsule (Experiment 1). This result is in agreement with other studies that used metal devices to vitrify ovarian tissue and reported a good rate of primordial and primary follicle recovery after rewarming [30, 31, 39, 40]. Fish ovarian follicles, as well as mammalian follicles have a smaller size in early stages, which results in a higher surface / volume ratio. Therefore, early follicles are more permeable to water and solutes, increasing survival chances after cryopreservation. Histological analysis and FDA+PI assay showed very few vitellogenic (stage III), maturing (stage IV) and mature (stage V) intact follicles. Possibly, the main reasons for follicular loss on these stages were the high lipid content of the oocytes and low membrane permeability, limiting cell dehydration and cryoprotectant penetration. In addition, during maturation, oocytes of freshwater fish become less permeable, acquiring resistance to hypotonic environment before being spawned in the water [41].

VS1 (1.5 M of methanol and 4.5 M of propylene glycol) and VS4 (1.5 M of methanol, 5.5 M and 0.5 M of Me₂SO of sucrose) did not significantly differ from the control group in terms of follicular viability for stage I. Seki et al. [42] had already suggested that the combination of methanol and propylene glycol might be more effective in reducing damage caused by cryopreservation of zebrafish immature follicles. In addition, in an extensive survey on the toxicity of several cryoprotectants, it was found that methanol and propylene glycol were the least toxic agents for zebrafish follicular survival after cryopreservation [32].

On the other hand, it has already been shown that dimethyl sulfoxide (Me₂SO) is a more permeable [41] and less toxic [43] cryoprotectant than propylene glycol to zebrafish follicles and embryo cryopreservation. Also, it was reported that the addition of sucrose enhanced the Me₂SO cryoprotectant action [43]. This observation is in agreement with our data, wherein sucrose addition to the cryoprotectant solution containing methanol and Me₂SO (VS4), increased immature follicle survival (stages I and II). Unlike Me₂SO, sucrose does not penetrate the cell membrane and acts only in the extracellular medium by increasing its osmolarity. Consequently, contact between the outside of the cell membrane and the water molecules decreases, reducing intracellular crystallization during cryopreservation. According to this phenomenon, Godoy et al. [32] suggested that sucrose present in vitrification solutions acted as an osmotic buffer stabilizing the follicular membrane. Therefore, it may be

suggested that sucrose supplementation in cryoprotectant solutions containing Me₂SO lead to an increased follicular viability.

In order to increase the efficiency of ovarian cryopreservation protocols, the cryopreservation of whole ovary has been suggested as an alternative option [44]. After avascular transplantation of ovarian tissue fragments, the tissue undergoes significant damage caused by ischemia [6, 45]. Thus, vascular transplant of intact ovaries would be an answer to this problem [46, 47]. Moreover, when the whole ovary is cryopreserved, a larger pool of follicles is transplanted back to the patient, unlike the situation that occurs when small fragments are used. However, vascular transplantation of whole cryopreserved ovary has two major limitations: the technical difficulty in proceeding reanastomosis [45] and the challenge to cryopreserve an intact organ [47]. These issues must be addressed in studies with experimental animal models, before they be put through human clinical trials. Therefore, the effect of the tissue dimension (ovarian fragment or whole ovary) was also here evaluated in terms of follicular survival after vitrification. We observed that the survival rate after vitrification was higher on tissue fragments when compared to whole ovary. The reasons for these results may be because the ovary is a bulky organ made from a group of different cell types, which hinders the easy diffusion of cryoprotectants into cells and stromal components.

The plastic straw is the most popular carrier device in laboratories for vitrification of biological samples. However, the use of plastic straws, even sealed, carries the risk of contamination from the liquid nitrogen and sample loss during rewarming process [21]. Liquid nitrogen is a well-known contamination source [48, 49] and the processes to eliminate pathogens would be costly and time consuming. Cryotubes have also been used for vitrification of ovarian samples [7]. However, these devices have a relatively thick wall which may result in low thermal conductivity when exposed to the liquid nitrogen. Consequently cryotubes may not have a fast temperature drop during vitrification [21] potentially leading to tissue damage. Furthermore, liquid nitrogen can seep into the cryotube increasing contamination risk [50]. Therefore, contamination can occur during cryopreservation procedures or storage [51]. Thus, the metal capsule manufactured in stainless steel represents a high cooling rate system and no contamination risk, which may potentially be employed for the clinical grade cryopreservation and storage of human tissues.

Finally, a point to emphasize from this study is the fact that after vitrification in the metal capsule, primary stage I follicles presented the highest survival rates in all vitrification groups (Experiment 1). Zebrafish primary growth follicles are similar to mammalian primordial or primary follicle, in the sense that it represents the female gamete surrounded by a single layer of cells. Considering that the ovarian reserve and fertility potential of a woman is directly related to the number of primordial and primary follicles, the main concern when ovarian tissue cryopreservation is considered is the maintenance of the integrity of these follicular populations together with the surrounding stroma. Our results of zebrafish follicular survival and growth after vitrification suggest that human ovarian tissue may be safely vitrified using the metal capsule for fertility

preservation in oncologic patients.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Júlia Giora for her advices concerning histological analysis and the Department of Veterinary Clinical Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul for histological procedures.

References

1. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 35:63-75.
2. Howe, K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498–503.
3. Liu XJ, Jia GH, Zhang G, Tian KY, Wang HX, et al. (2013) Effect of vitrification of mouse oocyte on the behavior of adult offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 169:279-282.
4. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O. (2013) Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. *Fertil Steril* 100:170-177.
5. Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, et al. (2009) Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 24:1670-1683.
6. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. (2010) Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril* 94:2191-2196.
7. Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson B, Lundqvist M, Hovatta O. (2011) Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Hum Reprod* 26:594-603.
8. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, et al. (2013) Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17474-17479.
9. Lee JR, Youm HW, Kim SK, Jee BC, Suh CS, et al. (2014) Effect of necrostatin on mouse ovarian cryopreservation and transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 178:16-20.
10. Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevade S, le Parco S, Fanchin R, et al. (2012) Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril* 97:1260-1268.
11. Ferreira M, Bos-Mikich A, Frantz N, Rodrigues JL, Brunetto AL, et al.

- (2010) The Effects of Sample Size on the Outcome of Ovarian Tissue Cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 45:99-102.
12. Fathi R, Valojerdi MR, Salehnia M. (2013) Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification of whole rat ovary. *CryoLetters* 34:228-238.
 13. Soleimani R, Heytens E, Van den Broecke R, Rottiers I, Dhont M, et al. (2010) Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine backmuscle. *Hum Reprod* 25:1458-1470.
 14. Kim, SS. (2010) Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod Biomed Online* 20:171-174.
 15. Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, et al. (2002) Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 415:385.
 16. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, et al. (2003) Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 18:1165-1172.
 17. Chen CH, Chen SG, Wu GJ, Wang J, Yu CP, et al. (2006) Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after frozen banking at -196 degrees C. *Fertil Steril* 86:1059-1066.
 18. Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, et al. (2006) Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev* 52:293-299.
 19. Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, et al. (2006) Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril*, 85:1208–1215.
 20. Arav A, Gavish Z, Elami A, Natan Y, Revel A, et al. (2010) Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries. *Reprod Biomed Online* 20:48–52.
 21. Tsang WH, Chow KL. (2010) Cryopreservation of mammalian embryos: Advancement of putting life on hold. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90:163-175.
 22. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. (1999) Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72:1073-1078.
 23. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. (2001) Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42:139-144.
 24. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, Bollen N, et al. (2003) Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: Application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 18:1504-1511.
 25. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. (2005) Highly efficient

- vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11:300-308.
26. Tsang WH, Chow KL. (2009) Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques* 46:550-552.
 27. Sugiyama R, Nakagawa K, Shirai A, Sugiyama R, Nishi Y, et al. (2010) Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *J Assist Reprod Genet* 27:161-167.
 28. Nakao K, Nakagata N, Katsuki M. (1997) Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim* 46:231-234.
 29. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. (1998) Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology* 37:77-85.
 30. Bos-mikich A, Marques L S, Rodrigues JL, Lothhammer N, Frantz N. (2012) The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries, as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation, after different times and temperatures of transport. *J Assist Reprod Genet* 29:1267-1271.
 31. Aquino D, Danielli L, Rigon P, Lothhammer N, Frantz N, et al. (2014) Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. *JBRA assisted reproduction* 18:12-15.
 32. Godoy LC, Streit DP, Zampolla T, Bos-Mikich A, Zhang T. (2013) A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology* 67:347-354.
 33. Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X. (1993) Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachio rerio*. *J Morphol* 218:203-224.
 34. Jones KH, Senft JA. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 33:77-79.
 35. Seki S, Kouya T, Tsuchiya R, Valdez Jr DM, Jin B, et al. (2008) Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes. *Reproduction* 125:285-292.
 36. Tsai S, Rawson DM, Zhang T. (2010) Development of *in vitro* culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. *Theriogenology* 74:290-303.
 37. Anil S, Zampolla T, Zhang T. (2011) Development of *in vitro* culture method for zebrafish ovarian tissue fragment. *Cryobiology* 63:311-312.
 38. Prophet E B, Mills B, Arrington J B, Sobin L H. (1992) *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington: American Registry of Pathology. 279p.
 39. Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lopes CA, et al. (2013)

- Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Anim Reprod Sci* 138:220-227.
40. Khosravi F, Reid RL, Moini A, Abolhassani F, Valojerdi MR, et al. (2013) *In vitro* development of human primordial follicles to preantral stage after vitrification. *J Assist Reprod Genet* 30:1397-1406.
 41. Seki S, Kouya T, Valdez DM, Jin B, Hara T, et al. (2007) The permeability to water and cryoprotectants of immature and mature oocytes in the zebrafish. *Cryobiology* 54:121-124.
 42. Seki S, Kouya T, Tsuchiya R, Valdez DM Jr, Jin B, et al. (2011) Cryobiological properties of immature zebrafish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. *Cryobiology* 62:8-14.
 43. Lahnsteiner F. (2008) The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 69:384–396.
 44. Maffei S, Hanenberg M, Pennarossa G, Silva JR, Brevini TA, et al. (2013) Direct comparative analysis of conventional and directional freezing for the cryopreservation of whole ovaries. *Fertil Steril* 100:1122-1131.
 45. Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG. (2008) Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. *N Engl J Med* 359:2617-2618.
 46. Hovatta O. (2005) Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. Reprod Biomed Online* 10:729-734.
 47. Kim, SS. (2010) Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod Biomed Online* 20:171-174.
 48. Isachenko V, Isachenko E, Kreienberg R, Woriedh M, Weiss J. (2010) Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of effectiveness. *Reprod Biomed Online* 20:441-442.
 49. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. (2012) Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26:391-405.
 50. Chen HI, Tsai CD, Wang HT, Hwang SM. (2006) Cryovial with partial membrane sealing can prevent liquid nitrogen penetration in submerged storage. *Cryobiology* 53: 283-287.
 51. Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, et al. (2010) Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril* 94:1525-1528.

CAPÍTULO III

1. CONCLUSÕES

A utilização da cápsula de metal mantém a viabilidade e a morfologia dos folículos ovarianos de zebrafish em estágio I (crescimento primário).

A vitrificação de fragmentos de tecido ovariano garante maiores taxas de sobrevivência folicular que a vitrificação de ovários inteiros.

A utilização da cápsula de metal na vitrificação de tecido ovariano apresenta taxas de sobrevivência e crescimento folicular similares ao da palheta de plástico, porém, é um sistema fechado que garante maior segurança a amostra durante a criopreservação e o armazenamento.

2. PERSPECTIVAS FUTURAS

A técnica de criopreservação desenvolvida nesse trabalho foi eficiente e segura na criopreservação de fragmentos de tecido ovariano de zebrafish. No entanto, a metodologia para a vitrificação de ovário inteiro ainda precisa ser aprimorada. O transplante de ovário intacto criopreservado evita os danos foliculares causados pela hipóxia durante a isquemia. Além disso, o transplante vascular do órgão permite que um grande *pool* de folículos ovarianos seja transplantado, ao contrário do que ocorre com fragmentos de tecido. Assim, são necessários mais estudos visando aperfeiçoar os protocolos de exposição e perfusão de soluções crioprotetoras, pois é possível que em função do ovário ser muito volumoso e composto por diferentes tipos de células, a difusão do agente crioprotetor não ocorre de modo uniforme.

Os nossos dados na vitrificação de tecido ovariano de zebrafish em um sistema fechado asséptico utilizando a cápsula de metal mostraram-se promissores, e reforçam as perspectivas para o uso desta técnica para a criopreservação de tecido ovariano humano.

REFERÊNCIAS

AL-AZAWIA, T.; TAVUKCUOGLUA, S.; KHAKIB, A. A. Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: A comparison study between slow freezing and ultra rapid (vitrification) methods. **Middle East Fertility Society Journal**, Cairo, v. 18, n. 4, p. 223-232, 2013.

AMORIM, C. A. et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 98, p. 1291-1298, 2012.

ANDERSEN, C. Y. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v. 23, p. 2266-2272, 2008.

ANIL, S.; ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T. 65. Development of molecular markers for stage II and stage III zebrafish ovarian follicles after *in vitro* culture. **Cryobiology**, Rockville, v. 65, n. 3, p. 360, 2012.

ANIL, S.; ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T. Development of *in vitro* culture method for zebrafish ovarian tissue fragment. **Cryobiology**, Rockville, v.63, n.3, p.311-312, 2011.

AQUINO, D. et al. Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. **Jornal brasileiro de reprodução assistida**, São Paulo, v.18, n.1, p.12-15, 2014.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 81, p.96–102, 2014.

ARAV, A. et al. Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v.20, n.1, p.48-52, 2010.

ARAV, A.; ZVI, R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? **Molecular and cellular endocrinology**, Amsterdam, v.282, n.1-2, p.150-152. 2008.

AUBARD, Y. et al. Ovarian tissue cryopreservation and gynecologic oncology: a review. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, Amsterdam, v.97, n.1, p.5-14, 2001.

AYE, M. et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v.48, n.7, p.1905-1912, 2010.

BAUDOT, A.; ODAGESCU, V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. **Cryobiology**, Rockville, v.48, n.3, p.283–294, 2004.

BERTOLINI, M.; LANGE, M. C.; RODRIGUES, J. L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, p.245-251, 2005.

BIANCHI, V. et al. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/L) and rehydration (0.3 mol/L) increases the implantation rate of frozen human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v.14, n.1, p.64-71, 2007.

BIANCHI, V. et al. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. **Human Reproduction**, Oxford, v.20, n.4, p.1078-83, 2005.

BIELANSKI, A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. **Theriogenology**, Los Altos, v.77, n.3, p.467-482, 2012.

BODIN, S. et al. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. **Journal of cell science and therapy**, Los Angeles, v.118, n.4, p.759-769, 2005.

BONETTI, A. et al. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. **Fertility and Sterility**, New York, v.95, n.3, p.928-935, 2011.

BORDES, A. et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, Oxford, v.20, n.10, p.2745-2748, 2005.

BORGES, E. N. et al. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, Rockville, v.59, n.2, p.195–200, 2009.

BORINI, A. et al. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. **Human Reproduction**, Oxford, v.21, n.2, p.512-517, 2006.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAM, D. G. Analysis of the chromosome complement of frozen-thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. **Molecular reproduction and development**, New York, v.42, p.254-260, 1995.

BOS-MIKICH, A. et al. The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries, as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation, after different times and temperatures of transport. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdam, v.29, n.11, p.1267-1271, 2012.

BRÄNNSTRÖM, M.; MILENKOVIC, M. Whole ovary cryopreservation with

vascular transplantation – A future development in female oncofertility. **Middle East Fertility Society Journal**, Cairo, v.15, n.3, p.125–138, 2010.

ÇAKICI, O.; ÜÇÜNCÜ, S. I. Oocyte Development in the Zebrafish, *Danio rerio* (*Teleostei: Cyprinidae*). **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Faisalabad, v.24, n.1-2, p.137–141, 2007.

CARVALHO, A. A. et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.138, n.3-4, p.220-227, 2013.

CELESTINO, J. J. H. et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.108, n.3-4, p.309-318, 2008.

CHAMBERS, E. L. et al. *In situ* identification of follicles in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and developmental potential in strategies to preserve female fertility. **Human Reproduction**, Oxford, v.25, n.10, p.2559-2568, 2010.

CHEN, H. I. et al. Cryovial with partial membrane sealing can prevent liquid nitrogen penetration in submerged storage. **Cryobiology**, Rockville, v.53, n.2, p.283-7, 2006.

CHEUICHE, Z. et al. Princípios da crioconservação de embriões mamíferos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.31, n.181, p.53-59, 2011.

CHUNG, K. et al. Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation: decision making in fertility preservation for female cancer patients. **Fertility and sterility**, New York, v.99, n.6, p.1534-1542, 2013.

CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and cellular endocrinology**, Amsterdam, v.312, n.1-2, p.42-52, 2009.

CONNOLLY, M. H. et al. Temporal dynamics of oocyte growth and vitellogenin gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, Larchmont, v.11, n.2, p.107-114, 2014.

COURBIERE, B. et al. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. **Fertility and Sterility**, New York, v.91, n.6, p.2697-2706, 2009.

DEMEESTERE, I. et al. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for hodgkin's disease. **Oncologist**, Daytonv, v.12, n.12, p.1437-1442, 2007.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in

fish: an overview of genetics, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v.208, n.3-4, p.191-367, 2002.

DITTRICH, R. et al. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. **Fertility and Sterility**, New York, v.97, n.2, p.387-390, 2012.

DOBRINSKY, J. R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. **Theriogenology**, Los Altos, v.56, n.8, p.1333-1344, 2001.

DOMINGUEZ, F. et al. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. **Fertility and Sterility**, New York, v.99, n.2, p.565-572, 2013.

DONDORP, W. et al. Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss. **Human Reproduction**, Oxford, v. 27, n.5, p.1231-1237, 2012.

DONG, Q.; HILL, D.; VANDEVOORT, C. A. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Cryobiology**, Rockville, v.59, n.3, p.268-274, 2009.

DONNEZ, J. et al. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. **Fertility and Sterility**, New York, v.98, n.3, p.720–725, 2012.

DONNEZ, J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, London, v.364, n. 9443, p.1405–1410, 2004.

DRANOW, D. B.; TUCKER, R. P.; DRAPER, B. W. Germ cells are required to maintain a stable sexual phenotype in adult zebrafish. **Developmental biology**, New York, v.376, n.1, p.43-50, 2013.

DRAPER, B. W.; MCCALLUM, C. M.; MOENS, C. B. Nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. **Developmental biology**, New York, v.305, n.2, p.589-598, 2007.

EBERTZ, S. L.; MCGANN, L. E. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. **Cryobiology**, Rockville, v.49, n.2, p.169-180, 2004.

EROGLU, A.; TOTH, T. L.; TONER, M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. **Fertility and Sterility**, New York, v.69, n.5, p.944-57, 1998.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, Rockville, v.60, n.3, p.45-53, 2010.

FAHY, G. M. et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, Rockville, v.48, n.1, p.22-35, 2004.

FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v.14, n.6, p.709-714, 2007.

FATHI, R.; VALOJERDI, M. R.; SALEHNIA, M. Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification of whole rat ovary. **CryoLetters**, London, v.34, n.3, p.228-238, 2013.

FAUQUE, P. et al. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. **Fertility and Sterility**, New York, v.87, n.5, p.1200–1207, 2007.

FERREIRA, M. et al. The effects of sample size on the outcome of ovarian tissue cryopreservation. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v.45, n.1, p.99-102, 2010.

GALIGUIS, J. et al. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized *in vitro* matured oocytes. **Cryobiology**, Rockville, v.68, n.3, p.459–466, 2014.

GE, W. Intrafollicular paracrine communication in the zebrafish ovary: the state of the art of an emerging model for the study of vertebrate folliculogenesis. **Molecular and cellular endocrinology**, Amsterdam, v.237, n.1-2, p.1-10, 2005.

GODOY, L. C. et al. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, Rockville, v.67, n.3, p.347-354, 2013.

GOMES, C. M. et al. Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte spindle dynamics and chromatin alignment. **Fertility and Sterility**, New York, v.90, n.4, p.1396-1404, 2008.

GOSDEN, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. **Fertility and Sterility**, New York, v.96, n.2, p.264-268, 2011.

GOSWAMI, M. et al. Development of cell culture system from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Molecular biology reports**, Dordrecht, v.37, n.4, p.2043-2048, 2010.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from ovary tissue masses. **Theriogenology**, Los Altos, v.69, n.3, p.269-275, 2008.

HANNA, R. et al. Cell-surface expression, progesterin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progesterin receptors alpha and beta in transfected cells. **The Journal of endocrinology**, Bristol, v.190, n.2, p.247-260, 2006.

HASHIMOTO, Y. et al. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. **Developmental biology**, New York, v.268, n.1, p.152-61, 2004.

HAWKINS, A. E. et al. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. **Journal of Virological Method**, Amsterdam, v.60, n.1, p.81-88, 1996.

HE, X. et al. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. **Cryobiology**, Rockville, v.56, n.3, p.223-232, 2008.

HIGAKI, S. et al. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. **Cryobiology**, Rockville, v.67, n.3, p.374–382, 2013.

HORNICK, J. E. et al. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow *in vitro*. **Human Reproduction**, Oxford, v.27, n.6, p.1801-1810, 2012.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v.496, n.7446, p.498–503, 2013.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, Rockville, v.46, n.3, p.205–229, 2003.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction**, Oxford, v.11, n.2, p.162-177, 2005.

HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. **Molecular reproduction and development**, New York, v.56, n.1, p.80-88, 2000.

IMHOF, M. et al. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. **Fertility and Sterility**, New York, v.85, n.1, p.1208–1215, 2006.

ISACHENKO, V. et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, Cambridge, v.138, n.2, p.319–327, 2009.

ISACHENKO, V. et al. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v.30, n.6, p.333-338, 2001.

ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, Rockville, v.49, n.2, p.114-122, 2004.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.18, n.4, p.568-577, 2009.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.35, n.2, p.63-75, 2014.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v.24, n.7, p.1670–1683, 2009.

KESKINTEPE, L. et al. Effective human and mouse blastocyst vitrification system: introducing Cryopette. **Fertility and Sterility**, New York, v.92, n.3, p.24, 2009.

KIM, S. S. Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v.20, n.2, p.171-174, 2010.

KOÇ, N. D.; AKBULUT, C. Electron and Light Microscopic Investigations of Follicular Epithelium in Vitellogenic Oocyte of Zebrafish (*Danio rerio*). **Pakistan journal of zoology**, Lahore, v.44, n.6, p.1581-1586, 2012.

KOPEIKA, J. et al. Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. **Mutation research**, Amsterdam, v.570, n.1, p.49-61, 2005.

KUWAYAMA, M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.11, n.5, p.608-614, 2005.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. **Theriogenology**, Los Altos, v.67, n.1, p.73-80, 2007.

KWOK, H. F. et al. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development. **Biology of reproduction**, New York, v.72, n.6, p.1370-1381, 2005.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, New York, v.269, n.1-4, p.1-20, 2007.

LEE, H. J. et al. Ultra-rapid vitrification of mouse oocytes in low cryoprotectant concentrations. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.20, 201-208, 2010.

LEE, J. R. et al. Effect of necrostatin on mouse ovarian cryopreservation and transplantation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v.178, p.16-20, 2014.

LESSMAN, C. A. Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v.161, n.1, p.53–57, 2009.

LI, P. et al. Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. **Biology of Reproduction**, New York, v.83, n.5, p.852-858, 2010.

LIAO, T. W.; HU, E.; TIERSCH, T. R. Metaheuristic approaches to grouping problems in high-throughput cryopreservation operations for fish sperm. **Applied Soft Computing**, [S.l.], v.12, n.8, p. 2040-2052, 2012.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews**, London, v.8, n.5, p.353-367, 2007.

LIN, L. et al. Aseptic minimum volume vitrification technique for porcine parthenogenetically activated blastocyst. **Cryo Letters**, London, v.32, n.1, p.62-68, 2011.

LISTER, A. L.; VAN DER KRAAK, G. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. **General and comparative endocrinology**, New York, v.159, n.1, p.46-57, 2008.

LIU, J. et al. Live offspring by *in vitro* fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, New York, v.64, n.1, p.171-178, 2001.

LIU, L. et al. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. **Human Reproduction**, Oxford, v.23, n.1, p.122-128, 2008.

LIU, X. J. et al. Effect of vitrification of mouse oocyte on the behavior of adult offspring. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, Amsterdam, v.169, n.2, p.279-282, 2013.

LU, X. L. et al. Effects of varying tissue sizes on the efficiency of baboon ovarian tissue vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v.69, n.1, p.79-83, 2014.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and comparative endocrinology**, New York, v.165, n.3, p.367-389, 2010.

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, Los Altos, v.66, n.1, p.101–111, 2006.

MARTINÉZ-BURGOS M. et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes:

effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. **Fertility and Sterility**, New York, v.95, n.1, p.374-377, 2011.

MARTINEZ-MADRID, B. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility and Sterility**, New York, v.82, n.5, p.1390-1394, 2004.

MAZOOCHI, T. et al. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v.90, n.4, p.1480-1486, 2008.

MCBURNIE, L. D.; BARDO, B. Validation of sterile filtration of liquid nitrogen. **Pharmaceutical Technology North America**, Duluth, v.26, n.10, p.74–82, 2002.

MEIROW, D. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.353, n.3, v.318-321, 2005.

MEN, H. et al. Birth of piglets from *in vitro*-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. **Theriogenology**, Los Altos, v.76, n.2, p.280-289, 2011.

MENKE, A. L. et al. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v.39, n.5, p.759-775, 2011.

MERDASSI, G. et al. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 9, p.78, 2011.

MERINO, O. et al. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.124, n.1-2, p.125-131, 2011.

MILENKOVIC, M. et al. Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow-freezing and vitrification. **Fertility and Sterility**, New York, v.97, n.5, p.1176-82, 2012.

MULDREW, K.; MCGANN, L.E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, v.66, n.2, p.532-541, 1994.

NAKAMURA, S. et al. Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v.7, n.4, p.403–409, 2011.

NEVES, P. R. et al. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, Cambridge, v.22, n.1, p.25-31, 2012.

OKADA, Y. et al. Role of lipid raft components and actin cytoskeleton in fibronectin-binding, surface expression, and de novo synthesis of integrin subunits in PGE₂- or 8-Br-cAMP-stimulated mastocytoma P-815 cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.88, n.3, p.364-371, 2014.

OKUTHE, G. E.; HANRAHAN, S.; FABIAN, B. C. Early gonad development in zebrafish (*Danio rerio*). **African journal of biotechnology**, Nairobi, v.13, n.33, p.3433-3442, 2014.

ONIONS, V. J. et al. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. **Human Reproduction**, Oxford, v.23, n.3, p.606-618, 2007.

PANAGIOTIDIS, Y. et al. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.26, n.5, p.470-6, 2013.

PAPATHEODOROU, A. et al. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.26, n.6, p.595-602, 2013.

PARMEGIANI, L. et al. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. **Fertility and Sterility**, New York, v.94, n.4, p.1525-1528, 2010.

PRYOR, J. H. et al. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, Los Altos, v.75, n.1, p.24-33, 2011.

RAHMAN, S. M. et al. Electroporation enhances permeation of cryoprotectant (dimethyl sulfoxide) into Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.79, n.5, p.853-858, 2013.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, London, v.24, n. 6003, p.387-402. 1985.

RIESCO, M. F. et al. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. **Theriogenology**, Los Altos, v.77, n.1, p.122-130, 2012.

RIMON, E. et al. Apoptosis in cryopreserved ovarian tissue—a tool of evaluation cryopreservation utility. **Fertility and Sterility**, New York, v.80, n.3, p.149, 2003.

RODRIGUES, J. P. et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. **Cryobiology**, Rockville, v.56, n.2, p.144-151, 2008.

RODRIGUEZ, P. et al. Survival rates of mouse blastocyst vitrified in dimethylformamide based solutions associated with ethylene glycol or 1-2 propanediol. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.11, p.1985-1990, 2011.

RODRIGUEZ-WALLBERG, K. A.; OKTAY, K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, Amsterdam, v.26, n.3, p.391-405, 2012.

ROJAS, C. et al. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, Rockville, v.49, n.3, p.211-220, 2004.

ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, Los Altos, v.79, n.3, p.508-516, 2013.

ROUX, C. et al. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. **Fertility and Sterility**, New York, v.93, n.2413, p.15–19, 2010.

SALEHNIA, M. et al. Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.25, n.5, p.492-499, 2012.

SANTOS, R. R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v.122, n.3-4, p.151-163, 2010.

SANTOS, R. R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of *in situ* and isolated ovine early-stage follicles. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v.99, n.1-2, p.53–64, 2007.

SANTOS, R. R. et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and tissue research**, Berlin, v.325, n.3, p.523–531, 2006.

SANTOS, R.R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility**, New York, v.91, n.4, p.1455-1458, 2009.

SARAIVA, M. V. A. et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks,

v.17, n.12, p.1135-1143, 2010.

SEKI, S. et al. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v.125, n.3, p.285-292, 2008.

SELMAN, K. et al. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachio rerio*. **Journal of morphology**, Philadelphia, v.218, p.203–224, 1993.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, v.6, p.211-231, 1989.

SETTI, P. E. L. et al. Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011. **Fertility and Sterility**, New York, v.102, n.1, p.90-95, 2014.

SHAHEDI, A. et al. The effect of vitrification on ultrastructure of human *in vitro* matured germinal vesicle oocytes. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v.167, n.1, p.69-75, 2013.

SHARMA, G. T.; DUBEY, P. K.; CHANDRA, V. Morphological changes, DNA damage and developmental competence of *in vitro* matured, vitrified-thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: A comparative study of two cryoprotectants and two cryodevices. **Cryobiology**, Rockville, v.60, n.3, p.315-321, 2010.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, Los Altos, v 53, n.1, p.59-72, 2000.

SHEIKHI, M. et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v. 26, n.3, p. 594–603, 2011.

SHEIKHI, M. et al. Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, New York, v.100, n.1, p.170-177, 2013.

SILBER, S. J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.18, n.2, p.59–67, 2012.

SMITH, G. D.; SILVA E SILVA, C. A. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.9, n.2, p.171-178, 2004.

SO, W. K.; KWOK, H. F.; GE, W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and

lutinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. **Biology of reproduction**, New York, v.72, n.6, p.1382-1396, 2005.

SPENCE, R. et al. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, London, v.83, n.1, p.13-34, 2008.

SUCCU, S. et al. Vitrification devices affect structural and molecular status of *in vitro* matured ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.74, n.10, p.1337-1344, 2007.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, London, v.26, n.8, p.563-567, 2010.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. et al. The potential for modification in cloning and vitrification technology to enhance genetic progress in beef cattle in Northern Australia. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.148, n.3-4, p.91-96, 2014.

TEDDER, R. S. et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. **Lancet**, London, v.15, n.346(8968), p.137-140, 1995.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, New York, v.99, n.6, p.1523-1533, 2013.

THOMAZ, B. A. C. et al. Histological aspects of rabbit ovarian tissue after cryopreservation. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia : revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v.27, n.11, p.642-649, 2005.

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

TROUNSON, A. O.; MOHR, L. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature**, London, v.305, n.5936 p.707-709, 1983.

TAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. **Theriogenology**, Los Altos, v.71, n.8, p.1226-1233. 2009b.

TAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of *in vitro* culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. **Theriogenology**, Los Altos, v.74, n.2, p.290-303,

2010.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, Rockville, v.58, n.3, p.279-286. 2009a.

TSANG, W. H.; CHOW, K. L. Cryopreservation of mammalian embryos: Advancement of putting life on hold. **Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews**, Hoboken, v.90, n.3, p.163-175, 2010.

VAJTA, G. Vitrification in ART? Getting closer? **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v.38, n.2, p.565-572, 2010.

VAJTA, G. Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.25, n.5, p.719-727, 2013.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, Los Altos, v.65, n.1, p.236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.12, n.6, p.779-796, 2006.

VALOJERDI, M. et al. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdam, v.26, n.6, p.347-354, 2009.

VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, Amsterdam, v.11, n.5, p.797-813, 2011.

VANACKER, J. et al. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? **Fertility and Sterility**, New York, v.99, n.5, p.1363-1368, 2013.

VANDERZWALMEN, P. et al. Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVF. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.19, n.5, p.700-707, 2009.

WALLACE, R; SELMAN, K. Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. **American Society of Zoologists**, Utica, v.21, n.2, p.325-343, 1981.

WANG, X. et al. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. **Reproduction: the official journal of the Society for the Study of Fertility**, Cambridge, v.138, n.3, p.527-535, 2009.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . **Science**, New York, v.178, n.4059, p.411-414, 1972.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life sciences. Pt. 2: Biochemistry, general and molecular biology**, Oxford, v.11, n.22, p.1071-1079, 1972.

WONG, K. M.; MASTENBROEK, S.; REPPING, S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to *in vitro* fertilization success rates. **Fertility and Sterility**, New York, v.102, n.1, p.19-26, 2014.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v.60, n.1, p.11-22, 2010.

YANG, H.; TIERSCH, T.R. Current Status of Sperm Cryopreservation in Biomedical Research Fish Models: Zebrafish, Medaka, and Xiphophorus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v.149, n.2, p.224-232, 2009.

YAVIN, S. et al. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, Oxford, v.1, n.4, p.1–8, 2009.

ZAMPOLLA, T. et al. Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v.76, n.6, p.1110-1119, 2011.

ZAMPOLLA, T. et al. Effect of methanol and Me_2SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). **Cryobiology**, Rockville, v.59, n.4, p.188-194, 2009.

ZARZYCKI, J. et al. (Ed.). **Glasses and the Vitreous State**. Cambridge University Press, 1991. 533 p. (Cambridge Solid State Science Series).

ZERON, Y. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, Rockville, v.45, n.2, 143-152, 2002.

ZHANG, J. M. et al. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v.166, n.1, p.52–55, 2013.

ZHANG, J. M. et al. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of Assisted Reproduction and**

Genetics, Amsterdam, v.26, n.2-3, p.137–142, 2009.

ZHANG, T. et al. Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to – 196°C using controlled slow cooling. **Cryobiology**, Rockville, v.56, n.2, p.138–143, 2008.

ZHANG, T. et al. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, Rockville, v.50, n.3, p.285-293, 2005.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, Rockville, v.33, n.1, p.1–13, 1996.

ZHOU, X. H. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v.60, n.2, p.101-105, 2010.

APÊNDICES**APÊNDICE 1 - Relação dos químicos utilizados nos experimentos**

Produto	Fornecedor	Código
Diacetato de fluoresceína	Sigma	F7378
Dimetilsulfóxido (M ₂ SO)	Sigma-Aldrich	472301
Hormônio foliculo estimulante (FSH)	Sigma	F4021
Gentamicina	Sigma	G1264
Hidróxido de potássio	Sigma-Aldrich	P4494
Hidróxido de sódio	Sigma-Aldrich	S-26-37/39-45
Iodeto de propídio	Sigma	P4170
Leibovitz (L-15)	Sigma	L4386
Metanol	Sigma-Aldrich	154903
Propilenoglicol	Sigma-Aldrich	W294004
Sacarose	Sigma	S5016
Soro fetal bovino (SFB)	Nutricell	8724
Tricaína metano sulfonato (MS-222)	Sigma	A5040

APÊNDICE 2 – *PLOS ONE* instruções para autores

***PLOS ONE* MANUSCRIPT GUIDELINES**

Format Requirements

PLOS ONE does not consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter
- Manuscript, including tables and figure legends
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the Figure and Table Guidelines)

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the *PLOS ONE* Publication Criterion for language standards may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature
- Briefly relates your study to previously published work
- Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describes any prior interactions with *PLOS* regarding the submitted manuscript
- Suggests appropriate *PLOS ONE* Academic Editors to handle your manuscript (view a complete listing of our academic editors)
- Lists any recommended or opposed reviewers

Your cover letter should not include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time. See *PLOS ONE* Editorial Policy for more information regarding publication fees.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will not consider monographs.

All manuscripts should be double-spaced and include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction

and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References
- Figure Legends
- Supporting Information Captions
- Tables

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found below.

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

PLOS articles do not support text footnotes. If your accepted submission contains footnotes, you will be asked to move that material into either the main text or the reference list, depending on the content.

Manuscript File Requirements

Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Word files must not be protected.

LaTeX Submissions. If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the *PLOS ONE* LaTeX template and BibTeX style sheet. Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files will be required. Please consult our LaTeX guidelines for a list of what will be required.

Microsoft Word Submissions with Equations. If your manuscript is or will be in Microsoft Word and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

1. Format display equations only in MathType (<http://www.dessci.com/en/products/mathtype/>).
2. Do not use Equations tools or Symbol font for any equation formatting. If your inline equations require special formatting, use MathType.
3. Do not use Graphic Objects.

If you have already composed your article in Microsoft Word and used its built-in equation editing tool, your equations will become unusable during the typesetting process. To resolve this problem, re-key your equations using MathType.

If you do not follow these instructions, *PLOS* will not be able to accept your file.

Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during

the online submission process.

The full title must be 250 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
- Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial

The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, one should contribute to all of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. Final approval of the version to be published
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

All authors must approve the final manuscript before submission. *PLOS ONE* will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission of the manuscript.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

See the *PLOS* Editorial and Publishing Policies for more information.

Abstract

- The abstract should:
- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Further information about formatting Supporting Information files, can be found [here](#).

Methods sections of papers on research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the Reporting Guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Methods sections of papers with data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication. A list of recommended repositories for different types of data can be found [here](#).

Methods sections of papers using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the Reporting Guidelines for cell line research for more information.

Methods sections of papers adding new taxon names to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact,

so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* Publication Criteria for more information.

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the *PLOS ONE* authorship criteria should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should not be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

References

General guidelines

- Authors may cite any and all available works in the reference list.
- Authors may not cite unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”).
- If an article is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print, the pre-print may be cited.
- If related work has been submitted to *PLOS ONE* or elsewhere, authors should include a copy with the submitted article as confidential supplementary information, for review purposes only.
- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

Reference formatting

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases. A number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

References should be formatted as follows:

- Published papers. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

- Accepted, unpublished papers. Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.
- Electronic journal articles. Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.
- Books. Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.
- Book chapters Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.
- Published media, not peer-reviewed. Examples: print or online newspapers and magazine articles. Fountain H (29 Jan 2014). For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. *The New York Times*. Available: <http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.
- New media, unregulated. Examples: blogs, websites, and other written works. Allen L (01 Sept 2010) Announcing PLOS Blogs. Available: <http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>. Accessed 17 March 2014.
- Master of Science and Doctor of Philosophy theses. Wells A (1999) Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. Available: <http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>. Accessed 17 March 2014.
- Databases and repositories. Examples: figshare, archive.com. Roberts SB (2013) QPX Genome Browser Feature Tracks. Database: figshare. http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214. Accessed 17 March 2014.
- Multimedia. Examples: videos, movies, and TV shows. Hitchcock A, producer and director (1954) *Rear Window* [Film]. Los Angeles: MGM.

Figure Legends

Figures should not be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found here.

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of

methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Further information about figure legends can be found in the Figure Guidelines.

Supporting Information Captions

Because Supporting Information is accessed via a hyperlink attached to its captions, captions must be listed in the article file. Do not submit a separate caption file. It is acceptable to have them in the file itself in addition, but they must be in the article file for access to be possible in the published version.

The file category name and number is required, and a one-line title is highly recommended. A legend can also be included but is not required. Supporting Information captions should be formatted as follows.

Text S1. Title is strongly recommended. Legend is optional.

Please see our Supporting Information guidelines for more details.

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- ArrayExpress
- BioModels Database
- Database of Interacting Proteins
- DNA Data Bank of Japan [DDBJ]
- DRYAD
- EMBL Nucleotide Sequence Database
- GenBank
- Gene Expression Omnibus [GEO]
- Protein Data Bank
- UniProtKB/Swiss-Prot
- ClinicalTrials.gov

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- Ensembl
- Entrez Gene
- FlyBase
- InterPro
- Mouse Genome Database (MGD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- PubChem

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Striking Images

Authors are encouraged to upload a "striking image" that may be used to represent their paper online in places like the journal homepage or in search results. The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the paper, ie. a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows. If no striking image is uploaded, a figure from the paper will be designated as the striking image.

Please keep in mind that *PLOS's* Creative Commons Attribution License applies to striking images. As such, do not submit any figures or photos that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CCAL license. Note that all published materials in *PLOS ONE* are freely available online, and any third party is permitted to read, download, copy, distribute, and use these materials in any way, even commercially, with proper attribution.

Care should be taken with the following image types in particular:

PLOS ONE is unable to publish any images generated by Google software (Google Maps, Street View, and Earth)

1. Maps in general are usually copyrighted, especially satellite maps
2. Photographs
3. Commercial or government images, slogans, or logos
4. Images from Facebook or Twitter

Authors must also take special care when submitting manuscripts that contain potentially identifying images of people. Identifying information should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual

has provided written consent by completing the Consent Form for Publication in a *PLOS* Journal (PDF).

For license inquiries, e-mail license [at] plos.org.

Tables

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as Supporting Information. Please ensure that table formatting conforms to our Guidelines for table preparation.

Specific Reporting Guidelines

Animal Research

Methods sections of manuscripts reporting results of animal research must include required ethics statements that specify:

- The full name of the relevant ethics committee that approved the work, and the associated permit number(s) (where ethical approval is not required, the manuscript should include a clear statement of this and the reason why)
- Relevant details for efforts taken to ameliorate animal suffering

For example:

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Minnesota (Permit Number: 27-2956). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The organism(s) studied should always be stated in the abstract. Where research may be confused as pertaining to clinical research, the animal model should also be stated in the title.

We ask authors to follow the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines for all submissions describing laboratory-based animal research and to upload a completed ARRIVE Guidelines Checklist to be published as supporting information. Please note that inclusion of a completed ARRIVE Checklist will be a formal requirement for publication at a later date.

VITA

Lis Santos Marques, filha de Ieda Lucila Santos Marques e Wilmar de Oliveira Marques, brasileira, nascida em Porto Alegre-RS, em 29 de novembro de 1984. Concluiu o ensino fundamental e o ensino médio na Escola Estadual Presidente Roosevelt em 2002. Em 2006 ingressou no curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução de 2009 a 2012. Realizou o estágio Curricular Obrigatório na multinacional Minitube's International Center for Biotechnology (ICB) no estado de Wisconsin/USA (2012). Em março de 2013 foi aprovada no processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, onde iniciou o curso de mestrado, como bolsista da CAPES.