

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ICTB
MPCAL



ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biomodelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE
LABORATÓRIO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Autor: Cristiano Magalhães Ferreira Sobrinho

**Título: Avaliação da técnica de vitrificação de ovários de camundongos da
linhagem B6D2F1 pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia em
Biomodelos – ICTB/Fiocruz-RJ**

Rio de Janeiro

2018

Cristiano Magalhães Ferreira Sobrinho

Título: Avaliação da técnica de vitrificação de ovários de camundongos da linhagem B6D2F1 pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz-RJ

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos–FIOCRUZ

Orientadora: Dr^a Isabella de Moura Folhadella Pires

Co-orientadora: Dr^a Janaína Barcelos Porto Ferreira

Rio de Janeiro

2018

Magalhães Ferreira Sobrinho, Cristiano .

Avaliação da técnica de vitrificação de ovários de camundongos da linhagem B6D2F1 pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB / Cristiano Magalhães Ferreira Sobrinho. - Rio de Janeiro, 2018.

79 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2018.

Orientador: Isabella de Moura Folhadella Pires.

Co-orientador: Janaína Barcelos Porto Ferreira.

Bibliografia: f. 61-73

1. Vitrificação de ovário. 2. Camundongo. 3. Maturação in vitro. 4. Fertilização in vitro. 5. Embrião. I. Título.

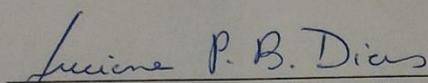
Cristiano Magalhães Ferreira Sobrinho

Título: Avaliação da técnica de vitrificação de ovários de camundongos da linhagem B6D2F1 pertencente ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz-RJ

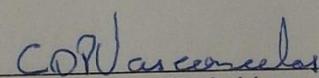
Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ

Aprovada em 02 de abril de 2018

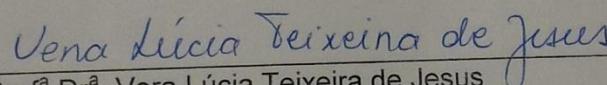
Banca Examinadora:



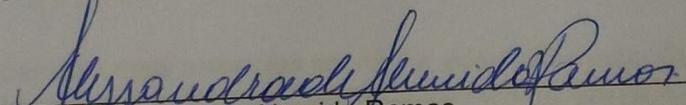
Dr^a. Luciene Paschoal Braga Dias
Tecnologista em Saúde Pública – FIOCRUZ (Presidente da Banca)



Prof. Dr. Carlos Otávio de Paula Vasconcelos
Universidade Federal Fluminense



Prof^a Dr^a. Vera Lúcia Teixeira de Jesus
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Dr^a. Alessandra de Almeida Ramos
Tecnologista em Saúde Pública – FIOCRUZ (suplente)

Rio de Janeiro
2018

Às pessoas mais presentes em minha vida: minha mãe, **Geralda**, pelo exemplo de vida que é. Meu pai **Carlos** (*in memoriam*), que do seu jeito mais tradicional, me ensinou a ser homem e formou o meu caráter. Meus irmãos, **Cláudio, Roberto e Angela**, pelo incentivo direto ou indireto. Aos grandes amores da minha vida, **Michelle**, por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos, **Manuela e Maria**, os melhores presentes que Deus me deu! **AMO MUITO VOCÊS!**

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a **DEUS**, primeiramente por me dar saúde para a batalha do dia-a-dia. Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais, certamente não teria dado conta. Sem Ele, nunca conseguiria forças para finalizar este Mestrado.

Aos **animais**, que desempenham papéis importantes em várias áreas do saber, contribuindo com desenvolvimento da humanidade, e sendo parte fundamental desse trabalho, obrigada pela sua grandiosa contribuição à ciência.

A meus pais, **Carlos** (*in memoriam*) e **Geralda**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade, e por terem me ensinado a ser nobre, na essência da palavra. Isso só me fortaleceu e me fez tentar não ser O MELHOR, mas fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

A minha querida esposa, **Michelle**, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, cuidando de mim, sendo paciente e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigado por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Às minhas queridas filhas **Manuela e Maria**, que, desde bebezinhas me acompanham na jornada diária da labuta, me engrandecendo com simples sorrisos ao despertar, gerando uma força interior e renovando as minhas energias, acreditando que tudo que fiz, faço e farei simplesmente é uma inspiração para que eu cada vez mais acredite em mim.

Aos meus irmãos **Cláudio, Roberto e Angela** e todos os meus **familiares, tios, primos, sobrinhos, cunhadas e sogros**.

Aos meus amigos de sempre, **Eugênio, João, Clésio e Paulo César**, pelo companheirismo, amizade, compreensão e por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Valeu mesmo! Obrigado pela amizade!

Às amigas **Isabella Folhadella e Janaína Barcelos**, que acreditaram em meu potencial, de uma forma, que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Sempre disponíveis e dispostas a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro

do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. Fizeram-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas. Vocês não foram somente orientadora e co-orientadora, mas, em alguns momentos, conselheiras, confidentes e amigas. Foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigado por estarem ao meu lado e acreditarem tanto em mim!

Aos **meus amigos do mestrado**, pelos momentos que passamos juntos. Foi bom poder contar com vocês! A todos os **professores** e **funcionários** do Mestrado Profissional em Ciências de Animais de Laboratório, especialmente as professoras **Maria Inês e a Joseli Nogueira**, que, com ensinamentos, orientações e amizade, me ajudaram ativa ou passivamente neste projeto. Vocês também foram referenciais para mim!

A todos os **funcionários** do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos que direta ou indiretamente proporcionaram a realização deste projeto. Obrigado pela ajuda!

Aos meus amigos e colaboradores do Serviço de Biotecnologia e Desenvolvimento Animal: **Alessandra Ramos, Luciene Paschoal, Paulo César e Thaís Malheiros** que me ajudaram neste trabalho, em especial, a **Isabella Folhadella e Janaína Barcelos**. Estas foram amigas que cooperaram ativamente neste trabalho e nunca me negaram ajuda quando precisei. Agradeço muito a vocês não só pela ajuda profissional, mas pela ajuda pessoal. Obrigado de verdade!

À Professora **Fabiana Knackfuss**, pela doação do seu tempo, colaborando nas compreensões das análises estatística do estudo. Obrigado pelo apoio!

Finalmente, gostaria de agradecer ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, especialmente à diretora Dra. **Carla Campos** e a vice-diretora de qualidade **Simone Ramos**, pela introdução do mestrado profissional em ciências em animais de laboratório, proporcionando e concedendo a realização desta dissertação. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, principalmente uma LIÇÃO DE VIDA. Ninguém vence sozinho.

OBRIGADO A TODOS!

“Comece fazendo o que é necessário, depois
o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis

RESUMO

Esta dissertação teve como objetivo testar o protocolo de vitrificação de fragmentos ovarianos de camundongos de linhagem híbrida, pertencentes ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)/Fiocruz. Para tanto, se estabeleceu o protocolo de coleta e maturação *in vitro* dos oócitos provenientes de ovários a fresco e vitrificados e avaliaram-se as estruturas após fertilização *in vitro*, com 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo embrionário. Fêmeas da linhagem B6D2F1 foram eutanasiadas para remoção dos ovários (n=60) e foram divididas em 3 grupos: Grupo 1- (n=30 animais) Oócito provenientes de ovários vitrificados, maturados e fertilizados *in vitro* de ovários fragmentados (metade) (n=120). Grupo 2 (n=15 animais) (controle 1)- Oócito provenientes de ovários coletados a fresco, maturados e fertilizados *in vitro*. Grupo 3 (n=15)(controle 2) – Oócitos maturados *in vivo* coletados no oviduto pós-ovulação e fertilizados *in vitro*. A viabilidade da técnica foi verificada pela desvitrificação dos ovários, coleta e seleção dos oócitos, maturação *in vitro* oocitária e fecundação *in vitro*. O resultado do desenvolvimento embrionário *in vitro* de cada grupo foi avaliado pelo teste de Qui-quadrado (BioStat 5.0). Recuperou-se 123, 224 e 328 oócitos nos G1, G2 e G3, respectivamente. Foram observadas diferenças significativas nas taxas de clivagem às 24 horas (embriões com 2 células ou mais) entre G1 (8%) e G2 (32%) ($p < 0.1$) e G1 e G3 (49%) ($p < 0.05$), mas não entre G2 e G3 ($p > 0.05$). Para as taxas de blastocistos, às 96 horas, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram respectivamente 6%, 11% e 46%, diferindo significativamente entre eles ($p < 0.05$). Concluiu-se que os protocolos de vitrificação e maturação oocitária *in vitro*, com posterior fertilização *in vitro* utilizados são alternativas para a produção de embriões de camundongos *in vitro*.

Palavras-chave: Vitrificação de ovário, murino, maturação *in vitro* e fertilização *in vitro*, embrião.

ABSTRACT

This work aimed test a protocol for ovarian fragments vitrification of a hybrid strain mouse, provided from Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)/Fiocruz. For this goal, a protocol for the collection and *in vitro* maturation of oocytes from fresh and vitrified ovaries was established and embryonic structures were evaluated after fertilization, at 24, 48, 72 and 96 hours of culture. Females of B6D2F1 strain were euthanized for ovarian removal (n = 60) and divided into 3 groups: Group 1 (n = 30) – ovaries were fragmented (half) (n = 120), vitrified, matured and fertilized; Group 2 (control 1/n = 15) - *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro* from fresh ovaries and Group 3 (control 2/n=15) - oocytes collected from the ampulla region and *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vivo*. The viability of the technique was verified by ovarian thawing, oocyte collection and selection, oocyte *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. *In vitro* embryo development of each group was evaluated by the Chi-square test (BioStat 5.0). A hundred twenty three, 224 and 328 oocytes were recovered from G1, G2 and G3, respectively. Significant differences were observed in the rates of cleavage at 24 hours (embryos with 2 cells or more) between G1 (8%) and G2 (32%) ($p < 0.1$) and G1 and G3 (49%) ($p < 0.05$) but not between G2 and G3 ($p > 0.05$). Blastocysts were observed at 96 hours and presented 6%, 11% and 46%, respectively for G1, G2 and G3, differing significantly ($p < 0.05$). It was concluded that the protocols of vitrification, *in vitro* maturation or oocyte maturation with subsequent *in vitro* fertilization used were available for the production of mouse *in vitro* embryos.

Key words: Ovary vitrification, mouse, *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization, embryo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: Estrutura morfológica do ovário região medular e região cortical21

Figura 2.: Estágios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral.....	23
Figura 3.: Fases da oogênese.....	24
Figura 4.: Protocolos de vitrificação de ovários, coleta de folículos pré-antrais e antrais, submetidos a maturação oocitária e taxas de desenvolvimento embrionário	28
Figura 5.: Foto representativa da palheta de OPS.....	34
Figura 6.: Foto representativa da haste de cryoloop.....	34
Figura 7.: Foto representativa da espátula de vitrificação	35
Figura 8.: Foto da palheta do cryotop.....	35
Figura 9.: Imagem representativo do esquema da determinação dos grupos experimentais.....	41
Figura 10.: Imagem representativa das placas contendo gotas de meio M2 com hemiovários numerados sequencialmente, conforme realizado	43
Figura 11.: Transferência das hemi-metades da gota de pré-vitrificação para gota de vitrificação	43
Figura 12.: A: Palhetas imersas no nitrogênio líquido, B: Placas de Petri identificadas contendo hemi-metades de ovários e C: Placa de Petri com 100 µL de meio de desvitrificação.....	45
Figura 13.: Imagem da fração do útero e oviduto com oócitos maduros na porção anatômica da ampola.	46
Figura 14.: Desenvolvimento embrionário.....	49
Figura 15.: Oócitos, espermatozoides e desenvolvimento embrionário: (A)Oócitos, (B)Meio de capacitação com espermatozoide, (C)Embriões 2 a 4 células, (D)Mórulas a blastocistos, (E) Blastocistos e Blastocistos expandidos e (F) Blastocistos eclodido	572
Figura 16.: Comparação entre os diferentes grupos das taxas de clivagem (%) em 24h	57
Figura 17.: Comparação entre os diferentes grupos das taxas de blastocistos (%) em 96h.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.: Principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões de camundongos e humanos	356
Tabela 2.: Resultados mais relevantes obtidos com a vitrificação de oócitos de camundongos.....	36
Tabela 3.: Principais resultados obtidos com a vitrificação de tecido ovariano	37
Tabela 4.: Número (n) e percentual (%) de estruturas embrionárias observadas durante 96h de cultivo <i>in vitro</i> dos G1, G2 e G3.....	51
Tabela 5.: Estruturas embrionárias observadas durante às 96 horas de cultivo <i>in vitro</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc - Adenosina Monofosfato Cíclica
°C- grau Celsius
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório
cm- centímetro
CGPs - células germinativas primordiais
CO₂- Dióxido de Carbono
dpc- dias pós-coito
TGF β- fator transformador de crescimento β
BMP-2, 4, 8B- Proteína Morfogenética Óssea
DMSO- Dimetilsufóxido
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
G- Gauges
ICTB - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
LH - Hormônio Luteinizante
M - Molar
μl - microlitro
mg - miligrama
mm – milímetros
mOsm- mili Osmolaridade
MPF- Fator Promotor da Maturação
mRNA - Ácido Ribonucleico mensageiro
mR1Ecm- meio de cultura *in vitro* de embriões de ratos

M16 - meio de cultivo de embriões de camundongos M16
M2 – meio de manutenção de células de camundongos M2
OPS - Open Pulled Straw
pH- potencial Hidrogeniônico
PM- Peso Molecular
UI- Unidades Internacionais

ZP1- Glicoproteína formadora de zona pelúcida 1

ZP2- Glicoproteína formadora de zona pelúcida 2

ZP3- Glicoproteína formadora de zona pelúcida 3

TMZ- Transição Materno-Zigótica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Modelo animal	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Fatores que contribuíram para o camundongo se tornar o organismo de escolha na pesquisa científica.....	18
2.1.3 Classificação do camundongo quanto ao Status Genético	19
2.2. Estrutura morfológica do ovário e ciclo estral.....	20
2.3 Fisiologia dos folículos ovarianos e oogênese	21
2.4 Maturação oocitária	24
2.5 Fertilização <i>in vitro</i>	27
2.6 Desenvolvimento embrionário no ambiente <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
2.7 Criopreservação de ovários.....	30
2.7.1 Agentes crioprotetores	31
2.7.1.1 Agentes crioprotetores intra-celulares	31
2.7.1.2 Agentes crioprotetores extra-celulares	32
2.7.2 Vitrificação.....	33
2.7.3 Crioinjúrias do tecido ovariano	37
2.7.4 Avaliação de folículos e oócitos após criopreservação	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Animais experimentais, licença e local do experimento	40
4.1.1 Determinação dos grupos experimentais	40
4.1.2 Estimulação ovariana das fêmeas dos grupos G1, G2 e G3.....	42
4.1.3 Coleta e vitrificação dos ovários.....	42
4.1.4 Descongelamento (desvitrificação ou reaquecimento) do tecido ovariano vitrificado do G1	44
4.2 Coleta dos oócitos.....	45
4.2.1 Maturação <i>in vitro</i>	45
4.2.2 Coleta dos ovidutos e oócitos maturados <i>in vivo</i>	46
4.2.3 Coleta, capacitação espermática e <i>swim up</i>	46

4.3 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	47
4.4 Cultivo embrionário	47
4.5 Avaliação do Desenvolvimento Embrionário	48
4.6 Análise estatística	49
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	51
5.1 Avaliação morfológica do desenvolvimento embrionário.....	51
5.2 Avaliação das Estruturas embrionárias observadas durante às 96h de cultivo <i>in vitro</i> dos G1, G2 e G3.	53
5.3 Comparação entre as taxas de clivagem e produção de blastocistos	56
5.3.1 Análise estatística das taxas de clivagem às 24 horas	56
5.3.2 Análise estatística das taxas de blastocistos às 96 horas	57
6. CONCLUSÕES	59
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO 1.....	74
ANEXO 2.....	75

1. INTRODUÇÃO

O Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB, unidade técnico científica da Fundação Oswaldo Cruz, produziu em 2017 cerca de 70 mil animais para atender a demanda interna, bem como a de outras instituições governamentais. Entre os modelos animais, os roedores são os mais utilizados em pesquisas biomédicas, sendo o camundongo (*Mus musculus*) o de maior demanda.

O surgimento de novas tecnologias em genética molecular tem possibilitado o desenvolvimento de novos modelos animais geneticamente modificados, favorecendo estudos básicos e aplicados (ONOS et al., 2016). Atualmente, mais de 15 mil linhagens de camundongos estão disponíveis para pesquisa (FRAJBLAT; AMARAL, 2017). Contudo, a manutenção das características destas linhagens é um ponto crucial dentro dos biotérios de criação e experimentação, haja vista que mutações podem ocorrer espontaneamente a cada geração. Associam-se a este risco, a possibilidade de acidentes, tais como: invasões por grupos ativistas, incêndios e contaminação genética e sanitária.

Neste contexto, bancos de germoplasma assumem um caráter estratégico nos biotérios, principalmente nos biotérios de criação, pois, permitem salvaguardar o patrimônio genético e manter padrões genéticos e sanitários adequados. Uma outra vantagem é a diminuição do custo de criação e manutenção de um elevado número de linhagens estocadas, somado a otimização do fornecimento de animais aos usuários solicitantes, facilitando, inclusive a importação/exportação. A formação desses bancos baseia-se inicialmente na criopreservação, que consiste na conservação de células, tecidos ou órgãos por meio da diminuição da temperatura, de forma a cessar as reações metabólicas nas células, permitindo a estocagem por tempo indeterminado (MULLEN; CRITSER, 2007; AMORIM et al., 2011a).

Sendo assim, a utilização de protocolos de criopreservação adequados a cada tipo celular ou tecido é de fundamental importância na implantação de bancos de germoplasma nos biotérios (BYERS et al., 2006; DINNYES et al., 1995). Espera-se que o processo de criopreservação não comprometa a viabilidade da célula ou tecido. Contudo, a diminuição e subsequente aumento na temperatura durante o

resfriamento e reaquecimento podem resultar em crioinjúrias e afetar a viabilidade (MULLEN; CRITSER, 2007; AMORIM et al., 2011b).

Estruturas em estado diploide são as mais preconizadas para o estabelecimento de bancos de germoplasma, assim sendo, os embriões são a primeira escolha, porém, as linhagens respondem de forma específica aos métodos de criopreservação, evidenciando que o genótipo influencia significativamente a sobrevivência *in vitro* dos embriões submetidos ao congelamento (DINNYES et al., 1995; BYERS et al., 2006).

Entre outros tipos celulares e teciduais, também utilizados, têm-se os espermatozoides e os ovários que preservam os gametas no estado haploide, e podem ser uma alternativa para superar a variabilidade nos resultados obtidos no congelamento embrionário de algumas linhagens. Além de ser, muitas vezes, a única possibilidade para recuperar linhagens de animais idosos com problemas reprodutivos (SZTEIN et al., 2010).

Variações nos resultados obtidos a partir do cultivo *in vitro* de embriões criopreservados também foram observadas em linhagens geneticamente modificadas do ICTB (comunicação pessoal). Logo, para a conservação do seu material genético torna-se necessária a criopreservação de gametas masculinos e tecido ovariano. Desta forma, acredita-se que o estabelecimento de um protocolo de criopreservação adequado para o tecido ovariano será uma alternativa para salvaguardar o material genético destes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelo animal

2.1.1 Histórico

A relação interespecífica harmônica e desarmônica entre homens e animais ocorre desde os primórdios da humanidade. O homem utiliza os animais em diversas atividades ao longo da sua existência, tais como na agropecuária, na locomoção, nos esportes e na ciência (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Na ciência, as primeiras regras para o uso de animais como modelo experimental para estudos de doenças humanas foram publicadas por Claude Bernard, em 1856 em "*Introdução ao Estudo da Medicina Experimental*" (apud FAGUNDES; TAHA, 2004).

Com o avanço das pesquisas, a utilização de modelos animais tem sido bastante descrita em áreas como: biomedicina, desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de diversas doenças, estabelecimento de técnicas de transplante de órgãos, biotecnologia, entre outros (FAGUNDES; TAHA, 2004; ANDRADE, 2006). A importância do uso de animais nas pesquisas aumenta à medida que eles proporcionam a compreensão dos fenômenos estudados, permitindo um ambiente favorável aos objetivos. Diversas espécies são utilizadas na pesquisa biomédica, entretanto, o camundongo vem se destacando como a espécie mais usada, devido ao seu pequeno porte, fácil manejo, prolificidade e curto período de gestação (CHORILLI et al., 2007; GUÉNET et al., 2015).

2.1.2 Fatores que contribuíram para o camundongo se tornar o organismo de escolha na pesquisa científica

O animal tem sido utilizado em pesquisas científica desde o século V, antes de Cristo A.C. (RAYMUNDO; GOLDIM, 2009). Os aspectos biológicos, anatômicos e fisiológicos são levados em consideração para escolha dos diversos modelos específicos similares aos seres humanos (DAMY et al., 2010). Para a escolha do modelo animal também é levado em consideração a definição e os objetivos do projeto, escolhendo a espécie adequada ou a variabilidade genética (linhagem) animal que corresponde a investigação do sistema biológico no estudo, podendo influenciar

diretamente na quantidade de animais a serem utilizados devidos aos resultados serem precisos ou não (BRASIL, 2016).

Em geral, o camundongo é o modelo mais utilizado no meio científico e mais bem conhecido atualmente, apresentando várias características favoráveis e destacando-se dos demais animais. Entre as principais vantagens estão: a sua capacidade de proliferação, o curto tempo de maturidade sexual (56 dias), o tamanho pequeno, o fácil manejo, o alto poder de perpetuação (multíparo), os curtos ciclos reprodutivos e ainda permite cruzamentos endogâmicos entre irmãos durante várias gerações, favorecendo um grau elevado de homozigose para todos os locus gênicos, definindo-se como isogênicos (ANDRADE et al., 2006; GODARD, 2018). Em adição, os camundongos apresentam uma oferta de variedades de linhagens isogênicas e heterogênicas, que ainda podem ser modificados gerando animais mais sofisticados como os mutantes e os animais transgênicos (FERREIRA et al., 2005).

Outro fator que contribuiu para o camundongo ser o modelo mais utilizado é a equivalência de 99% dos genes humanos, favorecendo assim os estudos dos mecanismos moleculares de diversas patologias e malformações (WEIDNER et al., 2016). Como podemos observar, diversas são as linhagens e suas utilidades na pesquisa científica: transplante de tecidos, biologia molecular, imunologia, embriologia, estudos sobre câncer, virologia, e controle de qualidade de produtos biológicos e farmacêuticos. Muitos deles, pela sua especificidade agregam um grande valor econômico e genético. A conservação deste material genético é primordial aos centros de criação de animais de laboratório, sendo importante criopreservar seus embriões e gametas (LLOYD et al., 2015).

2.1.3 Classificação do camundongo quanto ao Status Genético

Os camundongos são classificados geneticamente em dois grandes grupos: animais consanguíneos (inbred ou isogênicos) e não consanguíneos (outbred ou heterogênicos) (DOS SANTOS, 2006). Os isogênicos são originados através de acasalamentos consecutivos de 20 gerações entre irmãos, ou pais e filhos obtendo índice de homozigose de 99% de genes alelos, ex: C57BL/6. Os animais não consanguíneos ou outbred se caracterizam pela variabilidade genética, apresentando alto índice de genes alelos em heterozigose (99%). Sua obtenção é através de acasalamentos entre grupos, seguindo sistemas rotacionais.

Outras variedades obtidas de acasalamentos são os animais híbridos, que são originados pelos cruzamentos de duas linhagens isogênicas formando uma prole F1 com mais vigor híbrido e prolificidade, sendo utilizados em testes de controle de qualidade e pesquisa de transplantes (REPOLÉZ et al., 2017).

Em relação à formação das linhagens por alterações genéticas nas colônias, existem àquelas obtidas por mutação espontânea, como o NUDE (HFH11^{NU}) que possui um timo rudimentar ou ausente e sua aplicabilidade se dá na área de imunologia. E àquelas obtidas por manipulação em laboratório, que tem como base o *background* isogênico, originando animais transgênicos, *knockouts* e mutantes induzidos (FEIJÓ et al., 2010). Suas aplicabilidades são diversas e relacionadas a várias patologias ligadas aos seres humanos, devido a sua similaridade para com o qual foi criado. Temos como exemplos: CCg-Tg (DO11.10) 10Dlo/J (transgênico para estudo de linfócitosT) (THE JACKSON LABORATORY, 2018), B6.129S2-Cd28^{tm1Mak}/J usado em imunologia, inflamação e autoimunidade (THE JACKSON LABORATORY, 2018).

2.2. Estrutura morfológica do ovário e ciclo estral

O ovário mamífero é um órgão endócrino complexo, que possui entre outras funções, a produção de esteroides. Os hormônios esteroides favorecem o desenvolvimento do indivíduo na fase adulta, preparando para reprodução e auxiliando na gestação, formação e liberação das células germinativas responsáveis pelas próximas gerações das espécies (EDSON et al., 2009).

Estes são formados por uma região medular e uma cortical. A porção medular é constituída por tecido fibroelástico, distribuído de forma irregular, algumas células musculares lisas, feixes nervosos, vasos linfáticos e sanguíneos que adentram o córtex ovariano e que são responsáveis pela nutrição, sustentação e inervação do ovário (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Já o córtex ovariano é composto por diferentes tipos foliculares, sendo os folículos primários em maior número e os folículos antrais ou pré-ovulatórios em menor número. Na região do córtex, encontram-se ainda, os corpos lúteos e albicans, distribuídos na periferia do ovário (MAGOFFIN et al., 2005) (Figura 1).

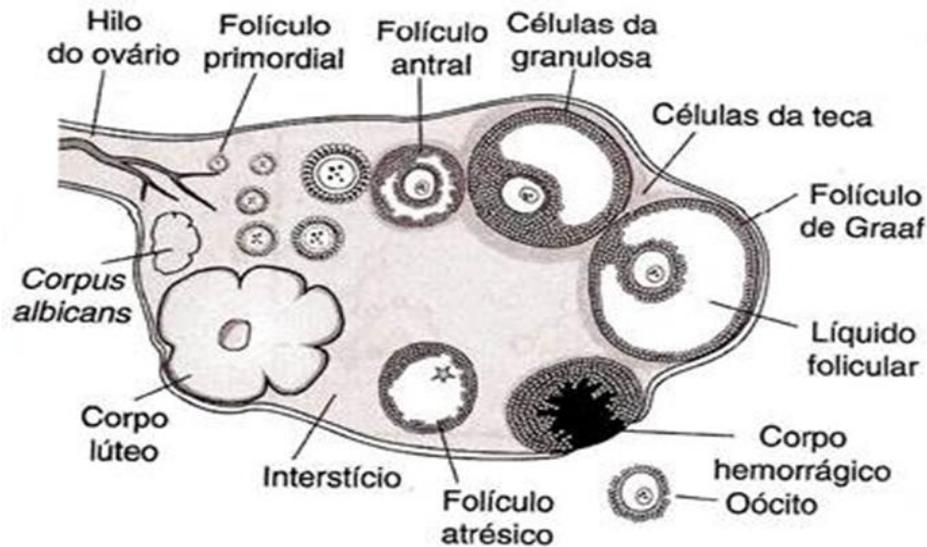


Figura 1. Estrutura morfológica do ovário região medular e região cortical, (<http://www.uff.br/webvideoquest/MN/LM18.htm>)

2.3 Fisiologia dos folículos ovarianos e oogênese

Nos camundongos o número total de folículos por ovário é de aproximadamente 1.500 (SHAW et al., 2000). A foliculogênese inicia-se com desenvolvimento das células germinativas femininas em oogônias, por meio de divisões mitóticas (PINCTON et al., 1998). As células germinativas primordiais chegam às cristas gonadais, em torno do 10^o dia de desenvolvimento embrionário e sofrem divisões até aproximadamente 13^o dia (CARMO, 2013).

Durante a foliculogênese há a formação, crescimento e maturação folicular, começando pelo folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O folículo corresponde à unidade morfológica e funcional do ovário e é constituído basicamente por um oócito circundado por células foliculares denominadas células da granulosa e demarcado por uma membrana basal. Eles podem ser divididos em folículos pré-antrais e antrais (Figura 2) (ADONA et al., 2015).

O folículo pré-antral não possui cavidade antral, sendo classificado em: primordial, transição, primário e secundário, de acordo com o estágio de desenvolvimento. Estes folículos são ativados por efeitos dos hormônios endócrinos e parácrinos e por fatores de crescimento (MCGEE, 2000; HSUEH, 2000). Os folículos

primordiais são constituídos por um oócito primário estacionado na fase de prófase I da meiose I, circundados por uma camada simples de células da granulosa achatadas ou escamosas e uma lâmina basal (DUTTA et al., 2016). Eles representam a grande maioria (95%) da população folicular presente no ovário, constituindo o *pool* de reserva de folículos quiescentes (Figuras 2 e 3) (LIU et al., 2001).

Já os folículos primários são caracterizados pela presença de células da granulosa cuboidais arranjadas em uma camada única ao redor do oócito, sendo os principais eventos do desenvolvimento desta fase, a expressão de receptores de FSH e o crescimento do oócito. Com a continuidade da foliculogênese pré-antral, as mudanças na estrutura do folículo vão se intensificando. Há um aumento no número de células da granulosa que vão formar múltiplas camadas ao redor do oócito, e as células do estroma se diferenciam em células da teca (LIMA et al., 2016). Durante a puberdade, os oócitos primários retomam a meiose I e se diferenciam em oócitos secundários com formação do 1º corpúsculo polar (Figura 3) (CARLSON, 2014).

Então, os folículos secundários continuam seu crescimento, e ocorre a formação da zona pelúcida através da síntese de três glicoproteínas pelo oócito, ZP-1, ZP-2 e ZP-3 (ADONA et al., 2015). Essas glicoproteínas inibem a meiose, que fica estacionada em metáfase II até a ovulação. Quando os folículos possuem de duas a três camadas de células da granulosa, os precursores das células da teca são recrutados do estroma ovariano (MELLO et al., 2015). Com a intensa proliferação das células da granulosa, uma área preenchida por fluido folicular é identificada entre essas células, a partir de então, os folículos passam a ser classificados como antrais (Figura 2). Este fluido folicular é produto da secreção do oócito e das células da granulosa. Apesar da grande variação no tamanho, a constituição e a organização dos folículos antrais permanecem as mesmas. Já os folículos dominantes ou de Graaf são suficientemente grandes para ovular (PEDERSEN; PETERS, 1968; WASSARMAN; JOSEFOWICZ, 1978; LIMA et al., 2016). Estes folículos perdem sua responsividade ao FSH e passam a ter receptores ativos ao LH (ADONA et al., 2015). Já os folículos que não atingem a dominância entram em processo de atresia e morrem (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Somente os oócitos que passam pelo processo de fertilização, então denominados zigotos, irá liberação do 2º corpúsculo polar (HYTTEL et al., 2012).



Figura 2. Estágios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral (<http://www.mcguido.com.br/foliculogenese.htm>)

O processo de formação dos oócitos tem seu início com as células germinativas primordiais precursoras (CGPs) que estão localizadas fora das gônadas e migram do saco vitelínico para a crista gonadal no início do desenvolvimento embrionário (BESSA; DODE, 2013). Ao chegarem, iniciam o processo de rápida multiplicação, através da divisão celular mitótica (Figura 3). Essa divisão dá origem a duas células geneticamente iguais diploides, alcançando um número de milhares de células germinativas. Esse processo ocorre intensamente durante a fase do ovário embrionário, interagindo com as células somáticas que as circundam e sendo dependente de vários fatores como fator transformador de crescimento β (TGF β), como a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), a BMP-8b e a BMP-2; sendo importantes para a formação das CGPs e regulação da expressão de genes (YING et al., 2001; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

Em camundongos, na fase embrionária, as CGPs dividem-se mitoticamente até 13,5 dias pós-coito (dpc) nas gônadas fetais (MOROHAKU et al., 2016) e iniciam o processo de diferenciação para oócitos primários (2n), em seguida cessam o processo de divisão mitótica e dão início ao processo meiótico com a duplicação do DNA; passando por vários estágios: leptóteno, zigóteno, paquíteno e parando no diplóteno da prófase I (PINCTON et al., 1998). Nesta fase ocorre a descondensação dos cromossomos que são circundados por uma membrana nuclear, fase da vesícula germinativa. O estágio da divisão celular é interrompido antes de completar a prófase I que caracterizam o processo (JUNIOR et al., 2009). O oócito permanece neste

estágio da divisão celular até o início da maturação oocitária que ocorre no período da maturidade sexual, quando os folículos maduros sofrem um pico de hormônio luteinizante (LH) completando a meiose e tornando-se uma célula haploide ou sofrendo atresia (Figura 3) (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

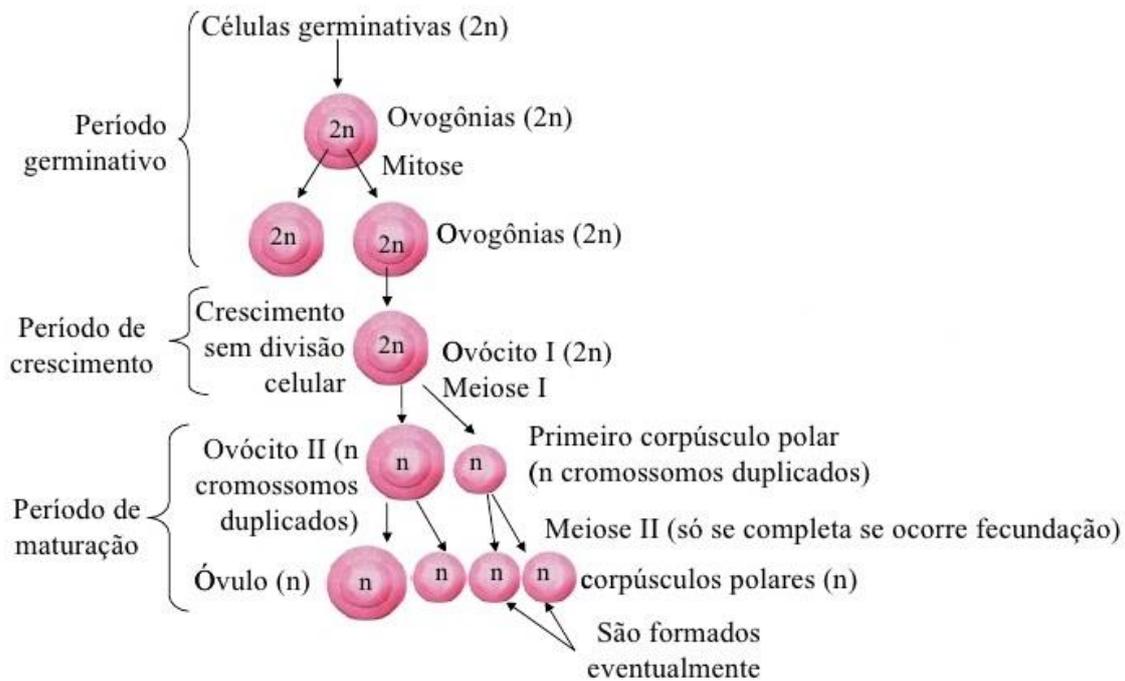


Figura 3. Fases da oogênese.

Fonte: oficinadebiologiadocmb.blogspot.com.br/2017/09/gametogênese

Durante muito tempo, acreditou-se que a embriogênese era a única fonte de formação dos oócitos, e que estes só se desenvolviam até a fase embrionário-fetal, sendo seu estoque finito e não renovável na vida da fêmea (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005). Contudo, com o desenvolvimento da ciência, pesquisadores demonstraram que fêmeas adultas não perdem a capacidade de renovação dos gametas (DENTILLO et al., 2013). Esta renovação ocorre por diferenciação das células tronco, e é denominada neofoliculogênese. Ainda não se sabe a forma e as condições de sua ocorrência (TILLY; JOHNSON, 2007), sendo questionada por alguns pesquisadores (SENEDA; SILVA, 2009).

2.4 Maturação oocitária

A maturação oocitária é uma etapa desafiadora em que os oócitos têm que superar e progredir a primeira e a segunda etapa de bloqueios meióticos, adquirindo capacidade para sustentar os estágios de desenvolvimento. Através da maturação nuclear e citoplasmática que essas células adquirem a competência necessária para as etapas da fertilização e desenvolvimento embrionário (GOTTARDI; MINGOTI, 2009a). O sucesso desta etapa depende de um processo complexo que envolve uma série de eventos moleculares e se sustentará até culminar na ovulação, fertilização para subseqüentes divisões embrionárias, formando blastocistos e permitindo desenvolvimento no útero materno (FERREIRA et al., 2009; SOMFAI et al., 2011).

Antes do processo de ovulação, o oócito se encontra em bloqueio meiótico, na prófase I, por intermédio de hormônios inibidores parácrinos oriundos das células do *cumulus* (NORRIS et al., 2009) e das adenosinas monofosfatos cíclicas (AMPc) que estão em altíssimo nível no interior dos oócito. (GOTTARDI; MINGOTI, 2009b)

Os fatores necessários para tornar o oócito competente para a fecundação e desenvolvimento envolvem uma complexa cascata de sinalização ativada em resposta a uma onda ovulatória de LH (FAIR, 2009).

A elevação dos níveis de LH provoca uma súbita queda dos níveis de AMPc (KAWAMURA et al., 2004), mediada pelo fator de crescimento epidermal (EGF), secretado pelas células que formam as camadas mais exteriores dos folículos, denominadas células murais da granulosa. Conseqüentemente, o declínio do AMPc provoca uma complexa cascata de fosforilação/desfosforilação e ativação do fator promotor da maturação/meiose (MPF), quebra da vesícula germinativa e condensação dos cromossomos (JONES, 2004). Em seguida, ocorre a divisão dos cromossomos homólogos ($2n$), sendo que metade dos cromossomos permanece no oócito de tamanho normal, denominado oócito secundário (células haploides) e a outra metade fica na outra célula de tamanho inferior, chamada de primeiro corpúsculo polar (SIRARD, 2001). Esses eventos caracterizam o estágio de metáfase II (MII) e a partir daí há uma interrupção da meiose, denominado segundo bloqueio meiótico. O retorno à meiose pode ocorrer, caso haja fecundação pelo espermatozoide (PEREIRA et al., 2016).

Já a maturação citoplasmática é um procedimento onde o oócito torna-se competente em ser fecundado e se desenvolver em embrião. Estas mudanças

envolvem várias alterações simultâneas que incluem a síntese de proteínas intracelulares (EDWARDS; HANSEN, 1997), aumento da glutathiona intracitoplasmática, redistribuição dos grânulos corticais (PAYTON et al., 2003), reorganização dos microtúbulos (KIM, 2000), estocagem de mRNA, síntese de fatores de transcrição, migração de mitocôndrias perinuclear e desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (ANGUITA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; FU et al., 2016). Todos esses eventos ocorrem para garantir o bloqueio da poliespermia, a descondensação do núcleo do espermatozoide masculino, com posterior formação de pronúcleo masculino e garantia de estoques nutricionais para o desenvolvimento embrionário até o estágio de oito /dezesseis células em bovino (PICNTON et al., 1998). A partir daí o genoma embrionário é ativado, e a síntese de novas proteínas passa a ser oriunda dos transcritos embrionários, ao invés dos transcritos maternos, denominado de transição materno- zigótica (TMZ) (STITZEL; SEYDOUX, 2007). Portanto, a garantia do sucesso do desenvolvimento embrionário depende que todos os eventos da maturação citoplasmática sejam realizados. Um oócito que não completou ainda sua maturação citoplasmática possui baixa qualidade e é incapaz de se desenvolver normalmente (KRISHER, 2004).

No processo de maturação *in vitro*, embora a maturação nuclear do oócito seja completa, a maturação citoplasmática não é assegurada (PEREIRA et al., 2016). Oócitos maturados *in vivo* possuem um padrão de qualidade melhor em relação aos maturados *in vitro* (SANFINS et al., 2003; SANFINS et al., 2004). Visualmente, os primeiros apresentam-se com citoplasma claro e homogêneo e com grânulos bem distribuídos. Já os segundos, apresentam citoplasma mais escuro, núcleo picnótico e grânulos agrupados. Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de melhorar a taxa de maturação *in vitro*. Hasegawa et al. (2006), em seu trabalho, desenvolveram oócitos de folículos pré-antrais vitrificados e aquecidos obtendo percentual de desenvolvimento embrionário após FIV de até 57,3% de embriões de 2 células. Já Wang et al. (2012) maturaram folículos pré-antrais de tecidos ovarianos e obtiveram 24,2% de blastocistos. Salehnia et al. (2013), através do seu experimento de vitrificação dos oócitos, compararam o processo de vitrificação com o grupo experimental não vitrificado e obtiveram 40,9% de blastocistos no grupo à fresco e 11,36% do grupo vitrificado. Resultados comparativos na6 (Figura 4).

Sendo assim, estabelecer o protocolo de coleta e maturação *in vitro* dos oócitos provenientes de ovários vitrificados é extremamente necessário para recuperação de linhagens.

2.5 Fertilização *in vitro*

A utilização de tecnologia de reprodução assistida é um recurso que possibilita a reprodução das espécies, favorecendo sua genética, através de técnicas como: inseminação artificial, transferência embrionária, assim como a produção *in vitro* de embriões (PIV) (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica que consiste em unir o gameta masculino (espermatozoide) e o gameta feminino (ovócito) em ambiente artificial, controlado e com objetivo de produção de embriões. Ela não necessita de protocolos elaborados, sendo utilizada uma única dose de sêmen para fecundar vários oócitos de várias fêmeas doadoras (LIMA; DOS SANTOS, 2010). Em animais de laboratório os trabalhos *in vitro* têm demonstrado resultados satisfatórios. Eppig; O' Brien (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais selecionados, maturados e fecundados *in vitro*. Sztein et al. (2000), em seu trabalho sobre a fertilização *in vitro* de espermatozoides criopreservados demonstraram que camundongos híbridos e isogênicos diferem pelas suas características de desenvolvimento embrionário após criopreservação de espermatozoides. Camundongos híbridos são bastante utilizados em fertilização *in vitro* (FIV) por causa da alta taxa de fertilidade, supostamente devido ao seu vigor híbrido enquanto que as cepas isogênicas apresentam espermatozoides com variações nas taxas de fertilização devido a diferentes morfologias e capacidade de sobrevivência à criopreservação. A escolha da linhagem a ser experimentada é um fator determinante para o sucesso da técnica devido à esses diferentes resultados encontrados.

Espécie	Estrutura	Agentes crioprotetores	Método	Maturação oocitária	Principais resultados			Referência
					Tratamento	Nº(%) 2 células pós/FIV	Nº(%) BI pós/FIV	
Camundongo 16 dias F1 C57BL/6 x DBA2	Ovário inteiro	15% DMSO +15% EG+ 20% SS (suplemento suelo) + 0,5M SACAROSE	Vitrificação	Meio essencial α -suplementado com piruvato de sódio 0,23 mM, 1 μ g / mL de fetuin, 10 U de penicilina, 10 μ g de estreptomicina (Invitrogen), 3 mg / mL de albumina de soro bovino (fracção V, Sigma), 10 ng / mL de factor de crescimento epitelial do rato e 75 mU / mL de FSH (Fertinorm; Serono, Genebra, Suíça)	Fresco	47/80 (58.8)	27/80 (33.8)	Hasegawa et al., 2006
					Vitrificado	67/117 (57.3)	34/117 (29.10)	
Camundongo F1 C57BL x CBA	Hemi-metade de ovário	17% (v / v) / 3 M EG, 17% (v / v) / DMSO 2,3 M e sacarose 0,75 M durante 3 min à temperatura ambiente	Vitrificação	Ovulação foi induzida pela adição de 5 ng / ml de fator de crescimento epidérmico humano recombinante (Invitrogen) e 1,5 UI / ml hCG (Chorulon, Intervet Canada Corp., Kirkland, Quebec, Canadá) no folículo pré-antral gotículas de cultura	Fresco	89 (63,3)	42 (42,2)	Wang et al., 2012
					Vitrificado	66 (61,7)	16 (24,2)	
Camundongo FVB 6-8 semanas	Ovário	40% de EG (v / v), 30% de Ficoll 70 (w/v) e 1 M de sacarose +albumina de soro bovino (BSA) /5 minutos a temperatura do ambiente	Vitrificação	TCM199 foi suplementado com 50 μ g / mL de penicilina, 75 μ g / mL de estreptomicina, piruvato de sódio 0,23 mM, 10% de soro fetal bovino, 75 mUI / mL rFSH e 10 UI / mL hCG (Serono, Suíça)	Fresco	163 (89)	75 (40,9)	Salehnia et al., 2013
					Vitrificado	28 (63,6)	5 (11,36)	

Figura 4. Protocolos de vitrificação de ovários, coleta de folículos pré-antrais e antrais, submetidos a maturação oocitária e taxas de desenvolvimento embrionário.

2.6 Desenvolvimento embrionário no ambiente *in vivo* e *in vitro*

No processo de produção *in vitro* de embriões, é extremamente importante que as etapas da técnica mimetizem o ambiente folicular e tubárico, ou seja, as etapas da técnica devem permitir que os oócitos tornem-se competentes para desempenharem processos de crescimento e serem fertilizados assumindo estágios mais avançados no desenvolvimento embrionário (PAIM, 2015).

O período de vida livre dos embriões é caracterizado pelo intervalo entre a fertilização e a implantação do embrião. *In vivo*, esse período ocorre durante o trajeto do oócito do oviduto ao útero. Nele, os embriões se encontram entre o estágio inicial de zigoto até o estágio final de blastocisto, diferindo morfologicamente pela sua compactação e desenvolvimento da blastocela. Ocorrem, ainda, outros eventos fisiológicos e bioquímicos que resultam na ativação do genoma embrionário, promovendo mudança de predileção nutricional, o que contribui para o desenvolvimento e devem ser mantidos *in vitro* (MIYAUCHI, 2012).

O desenvolvimento dos estágios embrionários, desde o ciclo inicial de zigoto até a fase final de blastocisto, tem sido utilizado como ferramenta de avaliação da viabilidade *in vitro* dos embriões (POPOVA et al., 2011).

Apesar da similaridade no tamanho e no desenvolvimento embrionário entre as espécies de mamíferos, ocorrem algumas diferenças, que se refletem, por exemplo, na necessidade metabólica, determinando as condições de cultivo específicas e, o tempo de divisão celular de cada espécie (PAIM, 2015). As avaliações morfológicas das fases embrionárias levam em consideração algumas características, como: visualização do pró-núcleo, número de blastômeros, grau de fragmentação, simetria dos blastômeros, estado de compactação e aparência do citoplasma (PRADOS et al., 2012).

A avaliação dos embriões em clivagem inicia-se no período de 24 horas após a fertilização. Se a divisão dos blastômeros for exatamente sincrônica, apenas os embriões de 2, 4 ou 8 células serão observados. Entretanto, podemos observar embriões de 3, 5, 6, 7 ou 9 células, que é uma indicação de desenvolvimento irregular, assíncrono e essa característica é encontrado em algumas espécies, como os bovinos (SERAPIÃO, 2007), no entanto, sendo normal ou regular em camundongos (HOGAN, 1994). A divisão mitótica deve produzir blastômeros de tamanhos iguais, e quando isso não acontece, denominamos de divisão assimétrica, o que leva a defeitos

embrionários (LEMMEN et al., 2008; WONG et al., 2010; MESEGUER et al., 2011; KIRKEGAARD et al., 2012). Em condições favoráveis de cultivo, os embriões têm a capacidade de evoluírem até a fase de pré-implantação ou blastocisto eclodido. É extremamente necessária a identificação dos embriões aptos a se desenvolverem até o estágio de blastocistos viáveis, que efetivarão a implantação (período de gastrulação), a organogênese (período de formação da placa neural) e o período fetal (histogênese, maturação funcional e crescimento fetal) (CAMARGO et al., 2017).

O uso de um ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário é extremamente necessário para mimetização das condições *in vivo* em ambiente *in vitro*, diminuindo a interferência de fatores como composição dos meios, pH, temperatura, concentração de CO₂, recipiente adequado para cultivo, entre outros, na avaliação dos resultados (GARDNER; LANE, 2013).

Miyoshi (2016), em seu trabalho, desenvolveu um meio de cultivo para embriões de 1 célula de rato, denominado mR1ECM, suplementado com fosfato, glicose, aminoácidos e albumina sérica bovina. Mantendo a osmolaridade ótima de 244-246 mOsm obteve até 90% de taxa de blastocistos oriundos de embriões de 1 célula de fertilização *in vitro* ou *in vivo*. Popova et al. (2011), ao comparar os meios mR1ECM e M16 obtiveram taxa de clivagem de 83,6% para ambos os meios. No entanto, ao comparar o desenvolvimento embrionário, o M16 não apresentou resultados satisfatórios com relação à formação de mórulas e blastocistos, ambos apresentaram 0%. Já o mR1ECM obteve uma taxa de mórula de 41% e de blastocistos de 19,4%, sendo superior aos observados no cultivo com M16.

O uso de suplementação ou aditivos celulares (co-cultivo de células) nos meios utilizados para o cultivo *in vitro*, pode ser uma alternativa para melhorar o processo de desenvolvimento embrionário, uma vez que pode propiciar um ambiente mais favorável ao embrião, devido aos fatores de crescimento produzidos, ou até mesmo por fornecer às células as fontes de energia na sua forma mais simples, como é o caso do piruvato (MELLO et al., 2016).

2.7 Criopreservação de ovários

O ovário é constituído por um grande número de folículos ovarianos pré-antrais (90%), que no decorrer da vida não se desenvolvem e morrem. A perda de um grande número desses oócitos, mesmo com pré-estimulação hormonal, têm sido uma das problemáticas que os pesquisadores buscam resolver. A manipulação de oócitos

inclusos em folículos ovarianos e a criopreservação de ovários são técnicas que auxiliam na formação de bancos de germoplasma, assim como no tratamento da infertilidade de espécies (HORWATH et al., 2007; LIMA et al., 2016). Para os camundongos é uma das técnicas que pode ser usada para salvaguardar o patrimônio genético de linhagens que não respondem aos principais métodos de criopreservação de embriões (CARVALHO et al., 2012).

A criopreservação do tecido ovariano tem sido amplamente estudada em várias espécies, incluindo o ser humano (GOOK et al., 2005), suínos (IMHOF et al., 2004), bovinos (LUCCI et al., 2004) e camundongos (NEWTON; ILLENGWORTH, 2001). Atualmente, o método de criopreservação por congelamento lento tem sido a principal técnica utilizada para o armazenamento do tecido ovariano, com vários casos de sucesso relatados (AMORIM et al., 2003). Entretanto, a vitrificação de ovário vem sendo utilizada para seres humanos e outros animais (KAGAWA et al., 2009; JEE et al., 2010; CHANG et al., 2011).

O congelamento lento apresenta algumas desvantagens, entre elas, a formação de cristais de gelo nas células o que leva a destruição das interações celulares e consequente morte celular. Já na vitrificação, isso não ocorre, pois, a solução usada é muito viscosa e a curva de congelamento é ultrarrápida, transforma o meio em estado vítreo. Entretanto, a alta concentração do agente crioprotetor associado ao tempo de exposição da célula pode causar estresse osmótico e danos celulares fatais (ZHANG et al., 2009).

2.7.1 Agentes crioprotetores

A função dos agentes crioprotetores é proteger as células durante o processo de criopreservação, baixando o ponto de solidificação da solução de congelação, desidratando a célula e, assim, evitando ou reduzindo a quantidade de cristais de gelo formados dentro da célula (SILVA et al., 2017).

2.7.1.1 Agentes crioprotetores intra-celulares

Os agentes crioprotetores intracelulares ou permeáveis são substâncias orgânicas que possuem baixo peso molecular e desta maneira tem capacidade de atravessar as membranas celulares com relativa facilidade. Contudo, podem ter

diferentes taxas de permeabilidade de acordo com o tempo à sua exposição (LEIBO, 2008).

Os agentes crioprotetores no processo de criopreservação reduzem a formação de cristais de gelo, evitam o choque osmótico e protegem a célula do efeito solução (CARVALHO et al., 2012).

Os tipos de agentes crioprotetores intra-celulares mais utilizados no congelamento são: o dimetilsulfóxido (DMSO) (PM = 78,2), propanodiol (PM = 76,09) e etilenoglicol (PM = 62,1), mas nesta categoria estão também o glicerol (PM = 92,1) e o metanol (PM = 32) (NIEMANN, 1991). Sua eficiência varia de acordo com a estrutura a ser criopreservada (célula / tecido), concentração e tempo de exposição (CASTRO et al., 2011). Estes solutos não são elementos químicos encontrados em organismos vivos em alta concentração, e, desta forma, podem ser tóxicos (PEGG, 2005; AMORIM et al., 2011c).

2.7.1.2 Agentes crioprotetores extra-celulares

Os crioprotetores extracelulares são macromoléculas que auxiliam na proteção das células através da redução da formação de cristais gelo, pela desidratação das células, e também atuam na proteção da membrana celular. Possuem alto peso molecular, com isso não atravessam a membrana (NIEMANN, 1991).

A sacarose, juntamente com o soro fetal bovino (SFB) são os crioprotetores extra-celulares mais utilizados em protocolos de criopreservação de diversas estruturas e espécies. A sacarose é um carboidrato que atua como tampão osmótico, protegendo a célula de fatores de estresse durante o congelamento e auxiliando na remoção dos crioprotetores intracelulares no processo de descongelamento (CASTRO et al., 2011). Também bastante utilizada para preservar oócitos caprinos (SHARMA et al., 2006), humanos (COTICCHIO et al., 2006), além de tecido ovariano de caprinos (SANTOS et al., 2006), ovinos (CECCONI et al., 2004, ONIONS et al., 2008), bovinos (LUCCI et al., 2004) e humanos (KEROS et al., 2009).

Já o soro fetal bovino (SFB) é bastante utilizado na criopreservação de tecido ovariano caprino (LUZ et al., 2009) e murino (CHOI et al., 2008), apresentando a função de proteger as células, prevenindo-as contra o efeito tóxico dos

crioprotetores e efeitos de endurecimento da zona pelúcida dos oócitos (PYLES, 2017).

2.7.2 Vitrificação

A vitrificação é um procedimento baseado na desidratação, onde ocorre a solidificação de uma solução semelhante a vidro, devido a exposição a alta concentração de solução crioprotetora, associada a uma velocidade de resfriamento extremamente rápida, pela imersão direta ao nitrogênio líquido. Devido a essas condições de concentração e velocidade, o sistema se solidifica sem que ocorra a cristalização. Por ser uma técnica, simples e barata, a vitrificação tem sido muito utilizada para criopreservação de espermatozoides (ENDO et al., 2012), oócitos (CAI et al., 2005) e embriões (MOMOZAWA et al., 2017). Para o tecido ovariano, a vitrificação vem sendo considerada um método promissor para a preservação dos gametas (ISACHENKO et al 2003; HASEGAWA et al., 2004). No entanto, necessita de profissional com grande experiência para sua execução (VAJTA, 2000; DINNYES, et al., 2006).

Vários são os métodos de vitrificação: vitrificação convencional, open pulled straw (OPS), cryoloop, cryotop, espátula, entre outras (VAJTA; NAGY, 2006).

Na vitrificação convencional utilizam-se palhetas francesas de polipropileno (0,25 mL), preenchidas com a solução de vitrificação e o material a ser criopreservado. As palhetas são seladas e imediatamente imersas em nitrogênio (N₂) líquido (ALI; SHELTON, 1993, DELA PEÑA et al., 2002).

A técnica de OPS utiliza palhetas francesas de polipropileno com diâmetro reduzido pela metade, para que através do processo de capilaridade, os meios e as células sejam envasadas. A taxa de resfriamento é de 2000°C/min (Figura 5) (VAJTA et al., 1998).

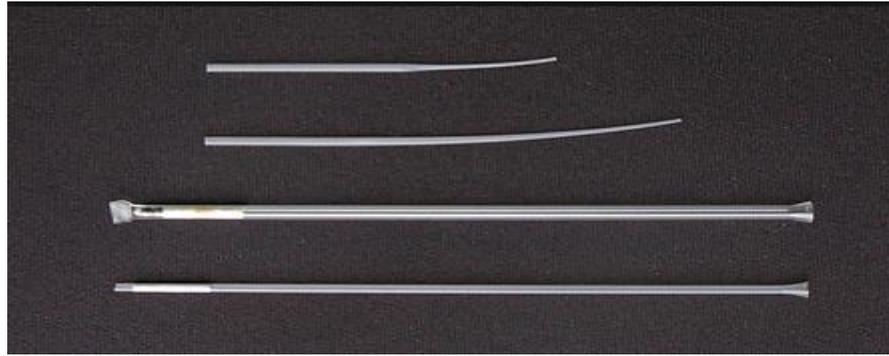


Figura 5: Foto representativa da palheta de OPS (<http://www.open-pulled-straw.com/?lightbox=i2yee>)

Na técnica de Cryoloop utiliza-se um laço de nylon (0,5 a 0,7mm de diâmetro e 20 μ m de largura), ligado a uma haste de aço inoxidável que deve ser imerso no Nitrogênio líquido (Figura 6) (LANE et al., 1999).



Figura 6: Foto representativa da haste de cryoloop (SAKI; DEZFULY, 2005)

A vitrificação em espátula consiste em uma espátula preparada artesanalmente, de maneira que uma extremidade tenha uma forma plana, onde é colocado uma pequena gota com o material a ser vitrificado (Figura 7). Com o contato direto com o N₂ líquido, a gota solidifica-se e se torna aderida à superfície da espátula (TSANG; CHOW, 2009).

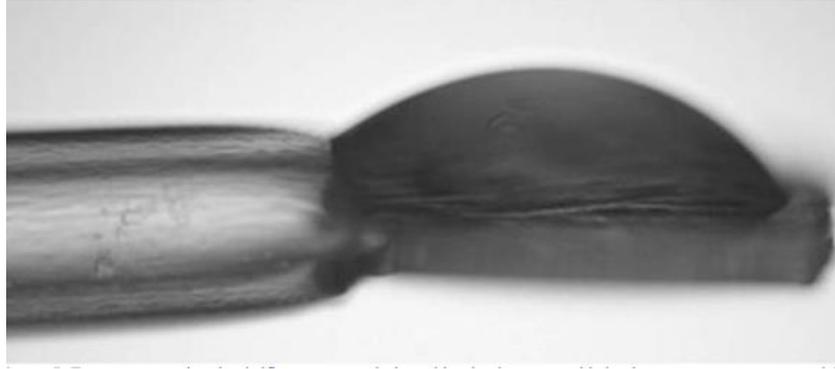


Figura 7: Foto representativa da espátula de vitrificação (TSANG; CHOW, 2009)

O dispositivo Cryotop é o que apresenta uma maior assepsia para a técnica de vitrificação. É uma técnica bastante utilizada na área de reprodução assistida humana. Usa-se uma palheta de polipropileno conjugada a uma haste plástica. Esta haste é utilizada para a manipulação, evitando o contato direto da mão do manipulador com a palheta (Figura 8) (CHIAN et al., 2004; KUWAYAMA et al., 2005; MONIRUZZAMAN et al., 2009).

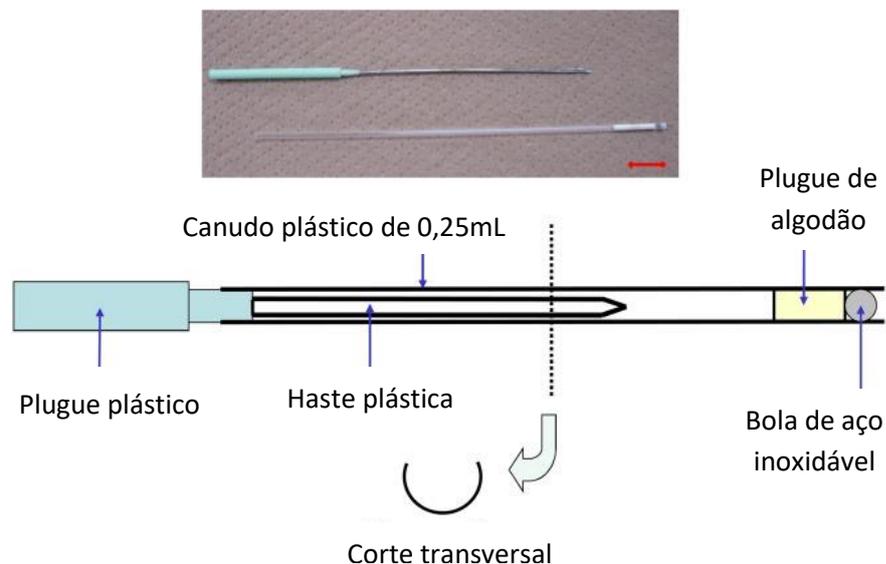


Figura 8: Foto da palheta do cryotop (https://www.researchgate.net/figure/A-new-device-for-the-MVAC-vitrification-method-The-device-is-made-with-a-19-G-needle-and_fig1_255975672)

Abaixo seguem as tabelas (1, 2 e 3) com resultados encontrados na literatura, de acordo com métodos, estruturas e espécies.

Tabela 1: Principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões de camundongos e humanos.

Técnica de Vitrificação	Espécie/Animal	Resultados	Referência
Vitrificação convencional	Camundongos	Sobrevivência de embriões vitrificados no estágio de 4 células similar à de embriões frescos	Ali; Shelton, 1993
Cryoloop	Camundongos e Humanos	Alta taxa de sobrevivência embrionária após cultivo <i>in vitro</i> (77%)	Huang et al., 2005
Vitrificação em espátula	Camundongos	67,8% de nascimentos	Tsang; Chow, 2009

Tabela 2: Resultados mais relevantes obtidos com a vitrificação de oócitos de camundongos.

Técnica de Vitrificação	Espécie/Animal	Resultados	Referência
Vitrificação CPS (Closed Pulled Straw ou Palhetas fechadas)	Camundongos	2 células: 29/48(60%) e Blastocistos:11/29(38%)	Chen et al., 2001
Grades de microscopia eletrônica	Camundongos	56,7% de fertilização	Kim et al., 2006

Tabela 3. Principais resultados obtidos com a vitrificação de tecido ovariano

Técnica de Vitrificação	Espécie/Animal	Resultados	Referência
Vitrificação convencional	Camundongos	Nascimento de crias saudáveis após transplante de tecido ovariano vitrificado	Dela Peña et al., 2002
Vitrificação convencional e DCV (Direct cover vitrification ou Vitrificação por cobertura direta)	Camundongos	Nascimento após transplante ovariano no grupo de DCV (4,3 ± 2,4) controle (4,4 ± 2,2)	Chen et al., 2006

Assim como a criopreservação de embriões melhorou com o desenvolvimento de protocolos de vitrificação, a criopreservação de ovário é uma alternativa biotecnológica que se encontra em desenvolvimento, com potencial para auxiliar na manutenção, preservação e melhoramento genético das espécies (MATOS et al., 2011).

2.7.3 Crioinjúrias do tecido ovariano

Durante o resfriamento-aquecimento do ovário podem ocorrer crioinjúrias que causam perda de folículos e destruição do estroma ovariano (KEROS et al., 2009; KIM et al., 2011). A crioinjúria de folículos pode ainda levar ao retardo do crescimento folicular e da maturação oocitária, enquanto deformidades da zona pelúcida podem bloquear a penetração do oócito maduro pelo espermatozoide (KIM et al., 2011). A proteção do ovário é crucial para preservar os folículos e proteger a viabilidade ovariana. Várias tentativas foram relatadas para proteger os ovários, entre elas, o uso de diferentes dispositivos de criopreservação (DITTRICH; MALTARIS, 2006; ARAV; NATAN, 2012), a modificação dos agentes crioprotetores (YOUM et al., 2014), o tempo de exposição a diferentes temperaturas (BOS-MIKICH et al., 2012), a suplementação com aditivos, como as proteínas anti-congelamento (LEE et al., 2015) e a manipulação genética das espécies (BAGIS et al., 2006).

Keros et al. (2009) demonstraram que o estroma ovariano apresentou uma significativa melhora morfológica de integridade após a vitrificação quando comparado ao congelamento lento. Um ponto a ser considerado no sucesso da vitrificação é o tamanho do fragmento do tecido ovariano. Fragmentos grandes requererem maior

tempo de equilíbrio para permitir a penetração da solução de vitrificação na porção interna do tecido, favorecendo o resfriamento. Já o uso de pequenos fragmentos permite taxas de resfriamento mais rápidas que são necessárias para diminuir a chance de injúria na temperatura crítica entre 15 a -5°C (AMORIM et al., 2011c).

2.7.4 Avaliação de folículos e oócitos após criopreservação

Alguns parâmetros de eficiência são adotados para observação da retomada do desenvolvimento folicular de tecidos ovarianos após desvitrificação, entre eles está a avaliação da preservação da estrutura morfológica dos oócitos (KEROS et al., 2009). A viabilidade folicular e a apoptose podem ser avaliadas por técnica de microscopia eletrônica de transmissão, por coloração de *Trypan blue* (MATOS et al., 2007), e pela utilização de marcadores fluorescentes (CASTRO et al., 2011).

No entanto, utilizar somente parâmetros morfológicos através de microscopia ótica para avaliar oócitos de camundongos, pode ser insuficiente (MATOS et al., 2007). Logo, o parâmetro morfológico de avaliação pós-descongelamento unicamente, não garante a competência da retomada do desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Criopreservar tecido ovariano de camundongos de linhagem híbrida (B6D2F1) por meio da vitrificação, a fim de recuperar oócitos viáveis.

3.2 Objetivos específicos

- Testar o protocolo de vitrificação (BEHBAHANIAN et al., 2013) de ovário de camundongo de linhagem híbrida (B6D2F1) presente no ICTB.
- Estabelecer o protocolo de coleta e maturação *in vitro* dos oócitos provenientes de ovários a fresco e vitrificados.
- Avaliar as estruturas após a fertilização com 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo embrionário.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais, licença e local do experimento

Os animais utilizados nesse experimento foram oriundos da colônia de produção do Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz e ficaram alojados no biotério do Serviço de Biotecnologia e Desenvolvimento Animal do mesmo Instituto. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA (CONCEA 2016) e receberam aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz, registrada no CONCEA sobre o número LW-28/17 (aprovada em 25/09/2017). (Anexo 1)

Os animais foram mantidos nos micro-isoladores em salas climatizadas com temperatura de 22°C +/-2, umidade relativa 55% +/-10%, pressão positiva com 15 a 20 trocas de ar/hora e foto-período de 12/12 h (ciclo claro e escuro).

4.1.1 Determinação dos grupos experimentais

Fêmeas da linhagem híbrida B6D2F1 (n=60), com 7 a 8 semanas de idade, foram divididas em três grupos: G1 (n=30) - Fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vitro*, proveniente de fragmentos de ovários submetidos à vitrificação, G2 (n=15) - Fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vitro*, provenientes de ovários coletados a fresco e G3 (n=15) - Fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vivo*. Machos híbridos B6D2F1 (n=3), com 7 a 8 semanas de idade, foram utilizados como doadores de sêmen para fertilização *in vitro*, e machos vasectomizados (n=5) para acasalamento natural com objetivo de induzir a ovulação e a maturação oocitária nas fêmeas do G3 (Figura 9). As fêmeas foram agrupadas em micro-isoladores (gaiolas) em número de 05 animais por grupo até o momento da sua utilização e os machos individualmente. Foram realizadas 3 repetições por grupo.

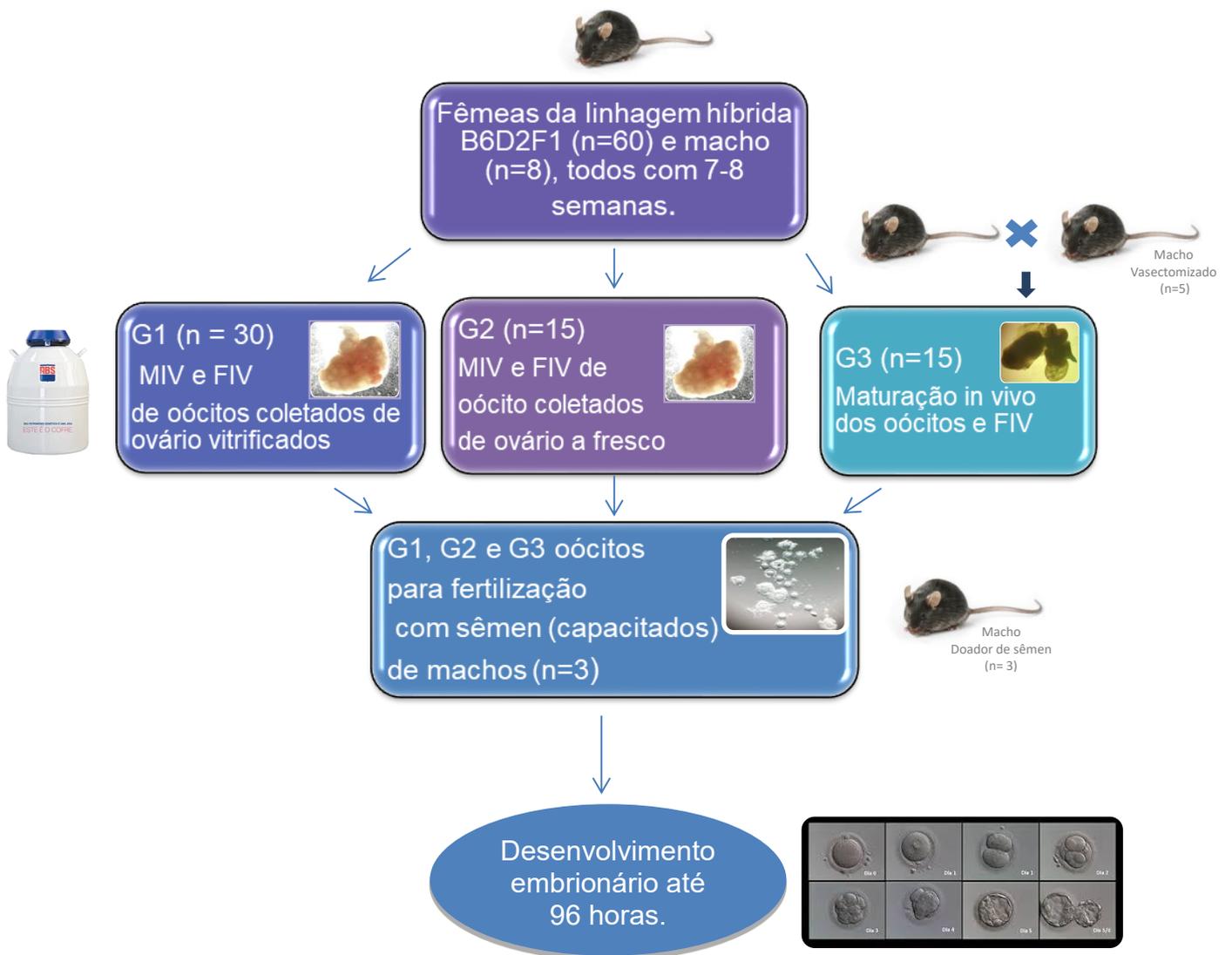


Figura 9: Imagem representativa do esquema da determinação dos grupos experimentais

4.1.2 Estimulação ovariana das fêmeas dos grupos G1, G2 e G3

As fêmeas foram submetidas a estimulação para crescimento folicular por meio da administração de 7.5 UI de gonadotropina coriônica equina (eCG) (NOVORMON® 5000UI) intraperitoneal. As doses foram administradas no quadrante abdominal direito inferior, com auxílio da seringa de insulina 6,0 x 0,25mm (30 G).

Nas fêmeas do G1, o protocolo de estimulação ovariana foi realizado 46 horas antes da retirada dos ovários para vitrificação. No G2 o protocolo foi realizado dois dias antes da desvitrificação dos ovários do G1, para a sincronização dos grupos e realização da maturação *in vitro*.

Já as fêmeas do G3, receberam uma dose de 7.5 UI de gonadotropina coriônica equina (eCG) (NOVORMON® 5000UI), conforme descritos aos grupos G1 e G2, sendo no mesmo período do G2 e uma segunda dose com 7.5 UI de gonadotropina coriônica humana (hCG) (CHORULON®5000UI), por via intraperitoneal, 46 horas após a primeira dose de eCG, e em seguida acasaladas individualmente com machos vasectomizados.

4.1.3 Coleta e vitrificação dos ovários

Fêmeas do G1 foram eutanasiadas, por meio de deslocamento cervical. Após a assepsia do abdômen com solução de 70% de álcool etílico, foi realizada a retirada dos ovários por meio de uma incisão abdominal. Os ovários foram retirados, acondicionados em uma placa de Petri estéril e seccionados ao meio (n=120 hemimetades). Posteriormente, os fragmentos ovarianos foram depositados em gotas de 100µL de meio M2 (®Sigma-Aldrich), previamente aquecidas e identificadas (Figura 10). As placas foram dispostas em mesa aquecedora à 37°C, até o momento da vitrificação.

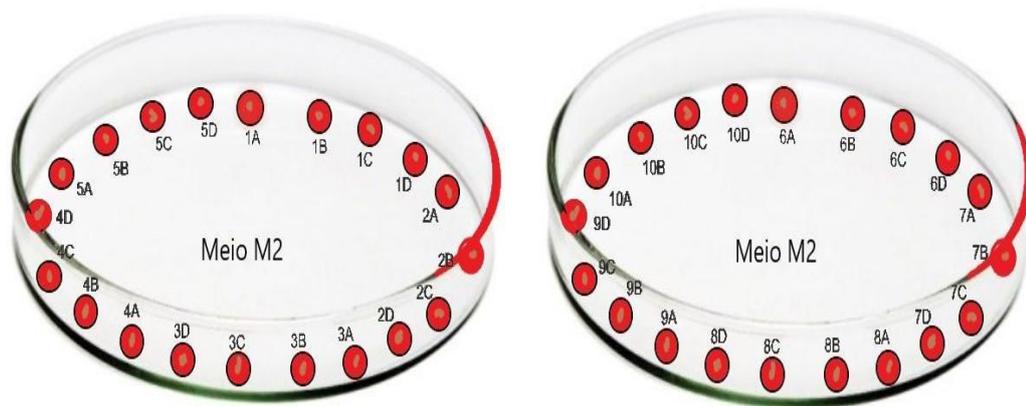


Figura 10: Imagem representativa das placas contendo gotas de meio M2 com hemi-ovários numerados sequencialmente, conforme realizado.

Em seguida, as hemi-metades foram transferidas, com auxílio de uma pinça, para gotas de 100 μ L de solução pré-vitrificação, constituída de 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 7,5% de etilenoglicol, 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) em meio M2 (@Sigma-Aldrich), onde permaneceram por 10 minutos. Passado o tempo, os fragmentos foram transferidos para gotas de 100 μ L de solução de vitrificação (15% de DMSO, 15% de etilenoglicol, 0,5M de sucrose, 20% de SFB em meio M2), onde permaneceram por 30 minutos, ambas em temperatura ambiente. Todas as etapas foram feitas em placas de Petri 100 x 20mm (Figura 11).

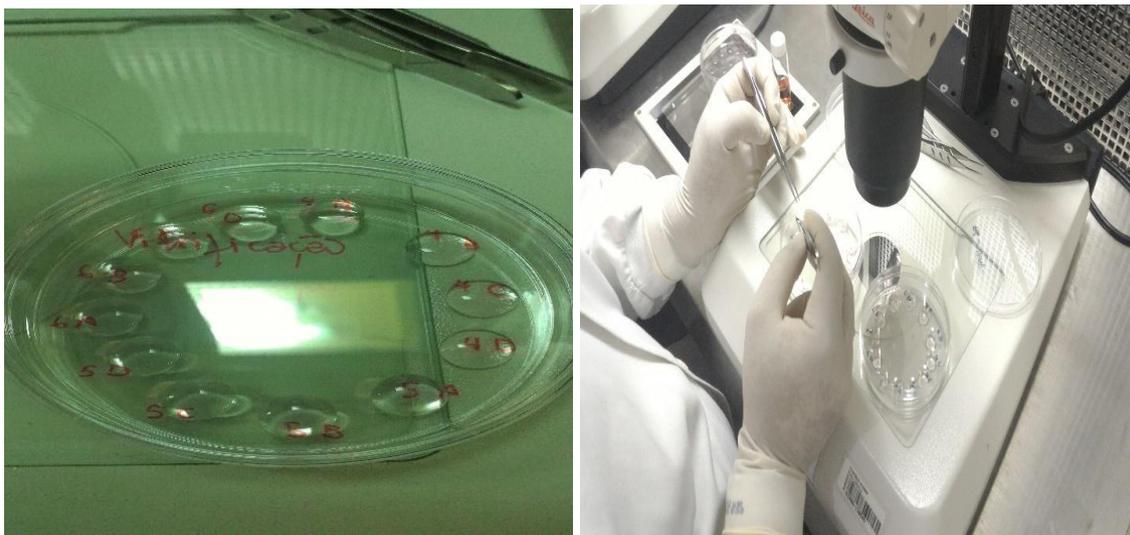


Figura 11: Transferência das hemi-metades da gota de pré-vitrificação para gota de vitrificação.

Após a passagem pelo meio de vitrificação, as hemi-metades ovarianas foram colocadas em espátulas previamente preparadas conforme Behbahanian et al. (2013). As amostras, com o mínimo de solução crioprotetora, foram imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e envasadas em palheta de 0,5mL previamente identificadas. Posteriormente, essas palhetas foram colocadas em racks plásticas identificadas de acordo com a bateria realizada (1, 2 ou 3) e mantidas em botijão de nitrogênio líquido até o momento da desvitrificação. A coleta do ovário do G2 ocorreu conforme descrito no G1.

4.1.4 Descongelamento (desvitrificação ou reaquecimento) do tecido ovariano vitrificado do G1

Para o descongelamento, as racks foram retiradas do botijão de Nitrogênio, conforme as datas das baterias realizadas. Foram desvitrificados um total de 60 hemi-metades, onde 20 por repetições (3 repetições). As espátulas foram retiradas de dentro das palhetas e encostadas em gotas de 100 μ L de solução de pré-desvitrificação, contendo 1M de sacarose em meio M2 (@Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de SFB, por 10 minutos. Posteriormente, com auxílio de uma pinça, as estruturas foram transferidas para gotas de 100 μ L de solução de desvitrificação, contendo meio M2 (@Sigma-Aldrich), acrescido de 10% de SFB e mantidos por 30 minutos. Todas as etapas foram realizadas sob mesa aquecedora, à temperatura de 37°C, em placa de Petri 100x20mm. Após a desvitrificação, as estruturas foram transferidas e mantidas em gotas (100 μ L) de meio M2 (@Sigma-Aldrich), à uma temperatura de 37°C, até o momento da retirada dos oócitos para maturação *in vitro* (Figura 12).

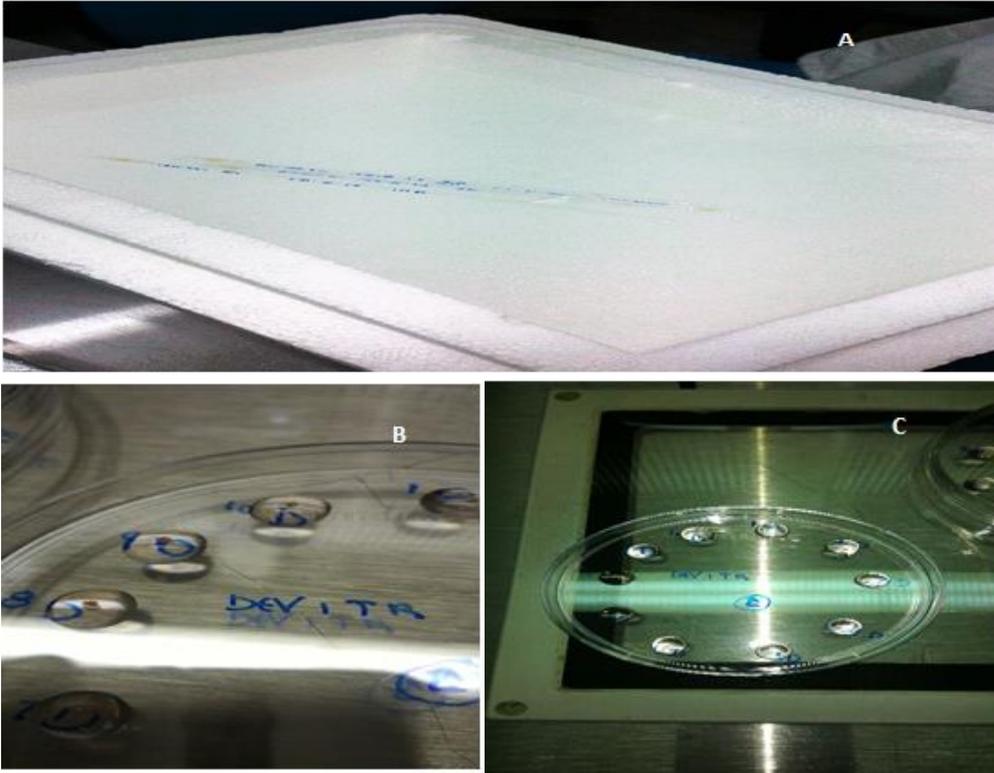


Figura 12: A: Palhetas imersas no nitrogênio líquido, B: Placas de Petri identificadas contendo hemimetades de ovários e C: Placa de Petri com 100 μ L de meio de desvitrificação.

4.2 Coleta dos oócitos

Após a desvitrificação dos ovários do G1 e eutanásia das fêmeas com coleta dos ovários do G2, os fragmentos ovarianos foram colocados em placa NUNC de 4 poços, contendo 500 μ L de meio M2 (®Sigma-Aldrich), previamente aquecido a 37°C, em placa aquecedora. Em seguida, os folículos foram perfurados com auxílio de agulha 24 G $\frac{3}{4}$ e pinça anatômica de dissecação ponta fina para liberação dos oócitos inclusos. Sob microscópio estereoscópio com aumento de 80x, os oócitos foram recolhidos e transferidos, com auxílio de pipeta automática de 10 μ L, para placa NUNC de 4 poços contendo 1000 μ L de meio M2 (®Sigma-Aldrich).

4.2.1 Maturação *in vitro*

Após serem coletados dos ovários do G1 e G2, os oócitos foram lavados 2 vezes em 1000 μ L de meio M2 (®Sigma-Aldrich) e por último em 1000 μ L da solução de maturação (M16 (®Sigma-Aldrich) suplementada com 0,25mg de Piruvato de Sódio, 10% de SFB, 75 mUI/mL FSH e 10 UI/mL hCG) previamente estabilizado em estufa com 5% de CO₂ e 37°C. A seguir, os oócitos foram transferidos para gotas de 50 μ L de meio de maturação, cobertos por 3mL de Ovoil™- Culture Oil (®Vitrolife) em

placa de Petri (35 x 10 mm), e incubados por 16 horas em estufa, com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Foram colocados até 25 oócitos por gota.

4.2.2 Coleta dos oócitos maturados *in vivo*

No G3, as fêmeas que apresentaram tampão vaginal após acasalamento com machos vasectomizados, (+/- 12h pós-acasalamento) foram eutanasiadas, por meio de deslocamento cervical, e a seguir, foi realizada a coleta dos ovidutos. Os órgãos internos foram expostos por meio de uma incisão abdominal, e os ovidutos foram retirados pela secção do tecido conectivo adjacente (ligamentos ovarianos). Os ovidutos foram então colocados em placa NUNC contendo gota de 1000 µL de meio M2 (®Sigma-Aldrich), previamente aquecidos a 37°C, e rompidos, com auxílio de pinças relojoeiro, na região da ampola e liberando os complexos *cumulus*-oócitos (Figura 13).

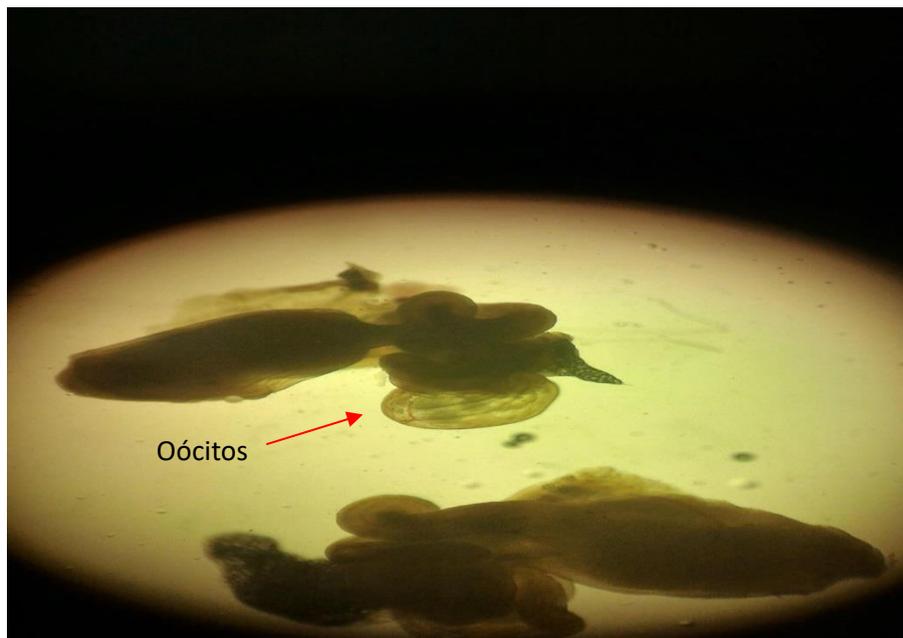


Figura 13: Imagem da fração do útero e oviduto com oócitos maduros na porção anatômica da ampola.

Em seguida, com o auxílio de uma pipeta automática de 100 µL, os complexos *cumulus-oophorus* foram coletados e lavados 2 vezes em poços de 1000 µL em meio M2 (®Sigma-Aldrich) a 37°C e por último em 1000 µL de solução de Fertilização (meio M16 suplementado com 3% de Albumina Sérica Bovina (BSA), previamente estabilizado em estufa com 5% de CO₂ e 37°C).

4.2.3 Coleta, capacitação espermática e *swim up*

Após a eutanásia por deslocamento cervical, machos (n=3) em idade reprodutiva tiveram as caudas dos epidídimos e ductos deferentes retiradas via incisão abdominal, realizada após a assepsia do abdômen com solução de 70% de álcool etílico, e com auxílio de instrumentos cirúrgicos (tesoura romba 12 cm, pinça dente de rato 12 cm, pinça anatômica de dissecação ponta fina 12 cm, tesoura Vannas e pinça relojoeiro). A cauda e o ducto foram colocados em placa de Petri (30x10mm) ligeiramente inclinada, contendo 120µL de meio M2 (®Sigma-Aldrich), em uma placa aquecida a 37°C. Foram feitos cortes com tesouras ponta fina para liberação dos espermatozoides no meio. Depois de decorridos 3 minutos, retirou-se 20µL do meio contendo os espermatozoides para avaliação da motilidade e vigor (microscópio ótico com aumento de 400x). Apenas machos com motilidade $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 foram usados. Então, em tubo eppendorf de 1,5mL, contendo 500µL de meio de capacitação (meio M16 (®Sigma-Aldrich) suplementado com 3% de Albumina Sérica Bovina- BSA (®Sigma-Aldrich) depositou-se no fundo, lentamente, 100 µL de sêmen, formando um pellet. Em seguida, o tubo de eppendorf foi colocado em estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora. Neste período, realizou-se concomitantemente a capacitação e a seleção dos espermatozoides. Posteriormente, o tubo foi retirado da estufa, o sobrenadante foi coletado, depositado em um tubo eppendorf de 1,5mL e centrifugado a 4375,89 G por 3min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensão com 400 µL de meio de FIV. Novamente, retirou-se uma fração para avaliação da motilidade e vigor espermáticos, conforme descrito anteriormente, e foram considerados viáveis àqueles com motilidade $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 .

4.3 Fertilização *In vitro* (FIV)

Os oócitos dos 3 grupos (G1, G2 e G3) foram transferidos para gotas de 200µL de meio de FIV (meio M16 (®Sigma-Aldrich) suplementado com 3% de Albumina Sérica Bovina (-BSA) (®Sigma-Aldrich)) cobertas com 3 mL de Ovoil™-Culture Oil (®Vitrolife), previamente equilibradas *overnight* em estufa de CO₂ a 5% em 37°C. Foram colocados, no máximo, 25 oócitos por gota. Posteriormente, cada gota foi acrescida de 50 µL de sêmen previamente capacitado, e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, por 4 horas para que houvesse a fertilização.

4.4 Cultivo embrionário

Passado o período de 4h de FIV, os oócitos foram lavados por duas vezes em 1000µL de meio M2 (®Sigma-Aldrich) na placa NUNC, previamente aquecido à

37°C, para retirada dos espermatozoides. Com pipeta automática de 100µL, os possíveis zigotos foram agitados no meio para separá-los o máximo possível dos resíduos (Up and down). As estruturas foram avaliadas de acordo com sua morfologia (forma, tamanho, número de células, fragmentação e coloração), com auxílio do microscópio estereoscópio Leica S8AP0 (aumento de 80x). Neste momento, aqueles considerados degenerados foram retirados.

Em seguida, os possíveis zigotos foram lavados em 1000µL de meio M16 (®Sigma-Aldrich) suplementado com 0,4% de Albumina Sérica Bovina- BSA (®Sigma-Aldrich) previamente aquecido à 37°C e transferidos para gotas de 50 µL do meio de cultivo (o mesmo usado na lavagem), cobertas com Ovoil™- Culture Oil (®Vitrolife) em placas de Petri 30x10mm. O cultivo embrionário foi realizado em estufa, a 37°C, com 5% de CO₂ durante 96 horas.

4.5 Avaliação do Desenvolvimento Embrionário

A avaliação dos oócitos oriundos do tecido ovariano foi realizada pela observação do desenvolvimento embrionário no cultivo *in vitro*. A observação da presença de estruturas embrionárias (embriões de 2 células até blastocistos) foi realizada 24, 48, 72 e 96h após a fertilização, em todos os grupos.

As estruturas esperadas pelo tempo de cultivo foram (Figura 14):

- 0h: zigoto (Após fecundação *in vitro*/4h) - Início do cultivo
- 24h: ≥ 2 células
- 48h: ≥ 4 células
- 72h: ≥ 8 células
- 96h: ≥ mórulas

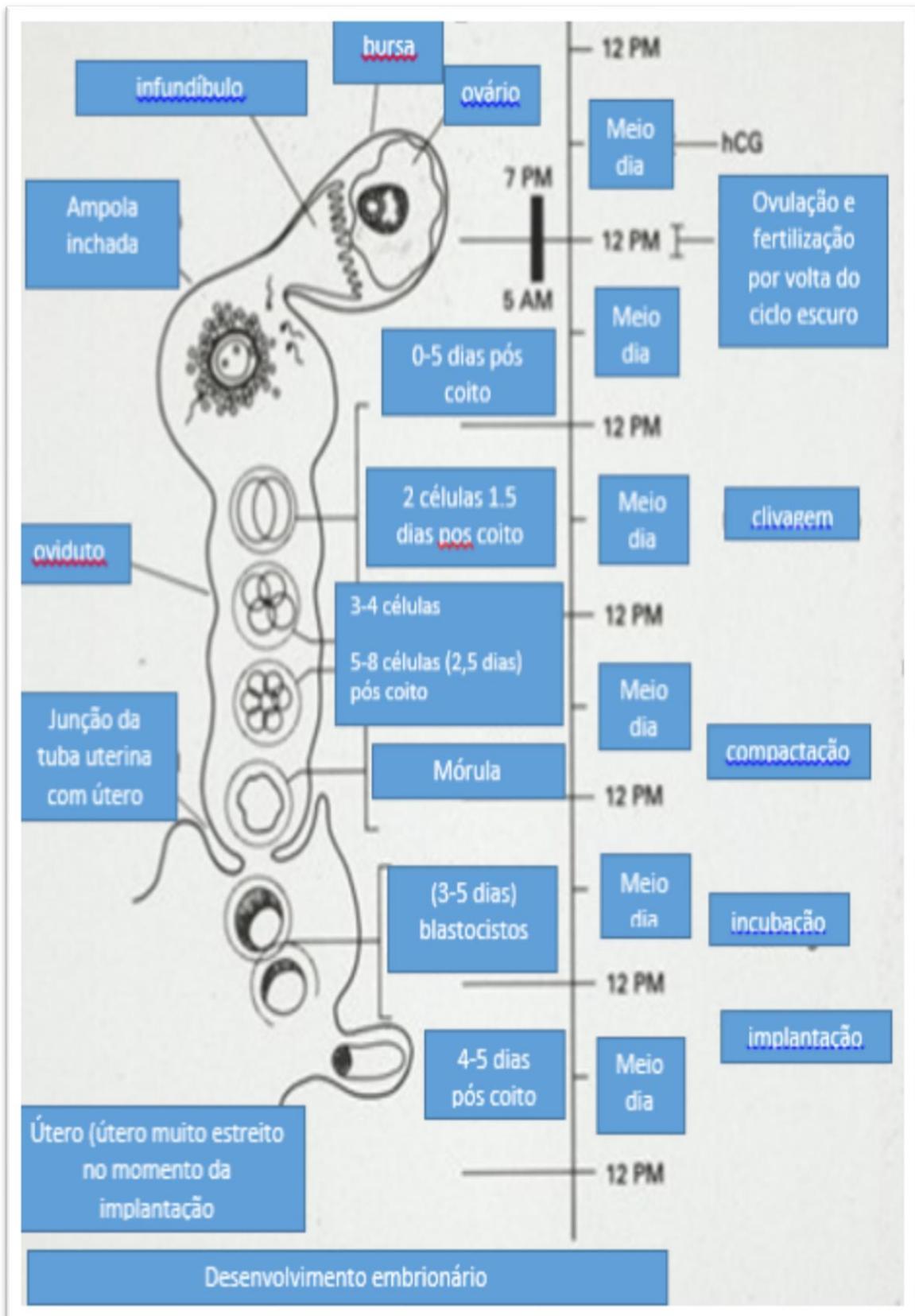


Figura 14- Desenvolvimento embrionário.

Fonte: https://www.google.com.br/search?biw=1366&bih=588&tbm=isch&sa=1&ei=0oWnWsiDHMHDwATCpJaYBg&q=embryonic+genetic+manipulation+hogan&oq=embryonic+genetic+manipulation+hogan&gs_l=psy-ab.3...7292.8752.0.9355.6.6.0.0.0.92.531.6.6.0....0...1c.1.64.psy-ab..0.0.0....0.g07Yo5twTII#imgrc=9aPTG7XIFh6EQM: (traduzido por: Cristiano Sobrinho)

4.6 Análise estatística

Os dados de taxa de clivagem (24 horas) e taxa de blastocistos (96 horas) entre os diferentes tratamentos foram analisados utilizando-se a análise estatística pelo teste Qui-Quadrado sendo testados os níveis de significância 1 e 5%. Para realização do teste foi utilizado o programa Biostat 5.0.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Avaliação morfológica do desenvolvimento embrionário

Foram coletados 123, 224 e 328 oócitos nos G1, G2 e G3, respectivamente.

Alguns oócitos provenientes dos ovários vitrificados apresentavam morfologia com redução das células *cumulus oophorus* se distinguindo dos oócitos dos G2 e G3, cuja presença dessas células era abundante, contribuindo para as melhores taxas de fertilização, e conseqüentemente, um maior número de estruturas desenvolvidas em embriões. As taxas de desenvolvimento embrionário foram observadas com 24, 48, 72 e 96 horas após o início do cultivo *in vitro*. Para cada tempo, foram consideradas as estruturas embrionárias esperadas no respectivo período de desenvolvimento (Tabela 4 e Figura 15).

Tabela 4.: Número (n) e percentual (%) de estruturas embrionárias observadas durante as 96h de cultivo *in vitro* do G1, G2 e G3

	G1 (n/%)	G2(n/%)	G3(n/%)
0 horas (Possíveis Zigoto)	123 (100%)	224 (100%)	328 (100%)
24 horas (≥ 2 células)	10 (8%)	71 (32%)	168 (49%)
48 horas (≥ 4 células)	6 (5%)	42 (18%)	152 (46%)
72 horas (≥ 8 células)	8 (6%)	38 (16%)	147 (44%)
96 horas (≥ mórula).	7 (6%)	25 (11%)	154 (46%)

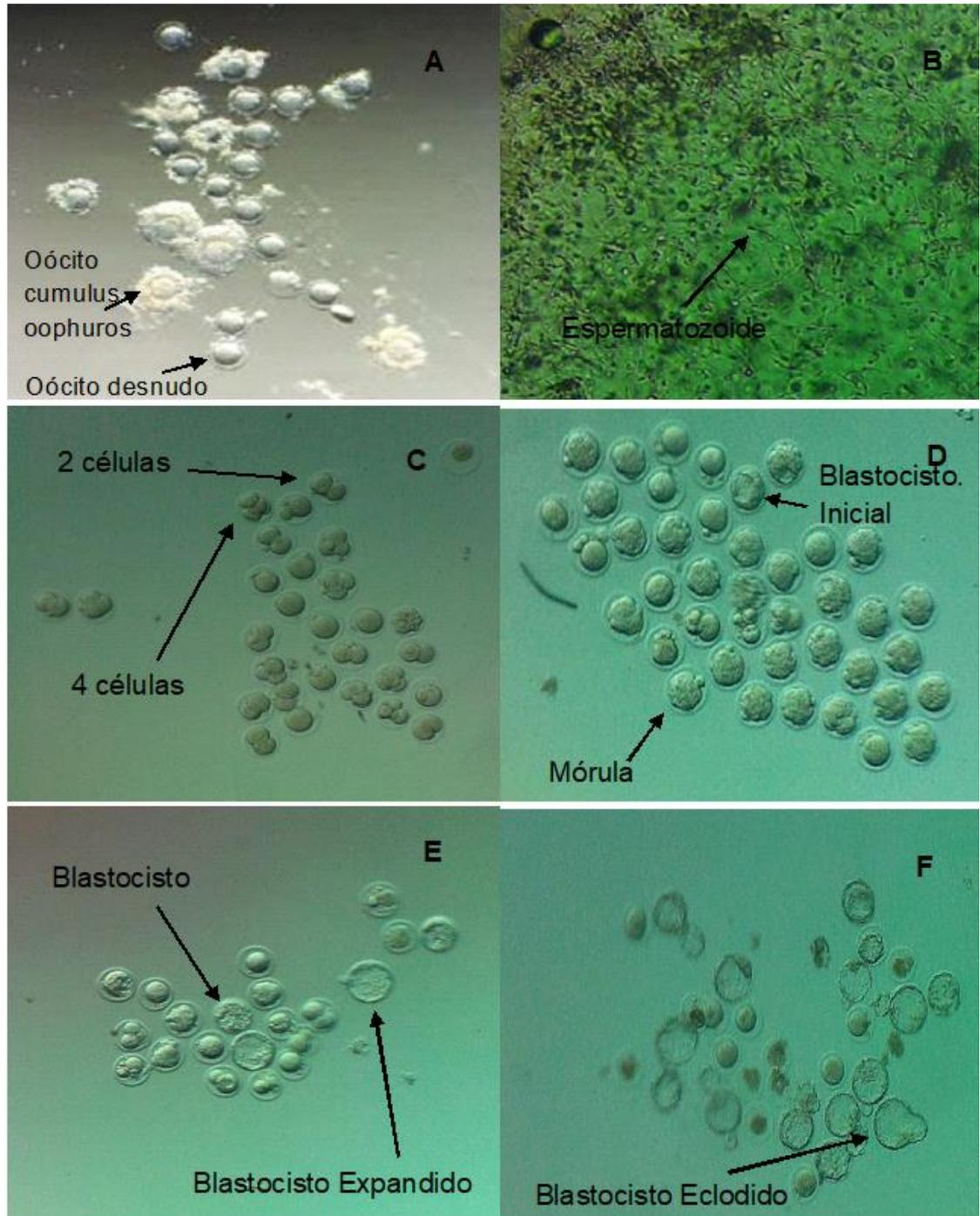


Figura 15.: Oócitos, espermatozoides e desenvolvimento embrionário: (A) Oócitos, (B) Meio de capacitação com espermatozoide, (C) Embriões 2 a 4 células, (D) Embriões em mórula a blastocistos, (E) Blastocistos e Blastocistos expandidos e (F) Blastocistos eclodido

5.2. Avaliação das Estruturas embrionárias observadas durante às 96h de cultivo *in vitro* dos G1, G2 e G3.

No G1 foram observados um total de 123 zigotos após a fecundação (0h). Em 24 horas encontrou-se 10 (8%) embriões de 2 células, já às 48 horas, foram encontrados 12 embriões desenvolvidos. Às 72 horas, encontrou-se 6 (5%) embriões de 8 células e 2 (2%) mórulas. Na última avaliação, às 96 horas, houve um aumento das estruturas que se desenvolveram a blastocistos, 1 (0,8%) 8 células, 1(0,8%) mórula, 6 (5%) blastocistos iniciais (Tabela 5).

Segundo Salehnia et al. (2013), tecidos de ovários vitrificados tem seu oócito amadurecido mais lentamente do que comparado ao tecido à fresco. Este fato se deve às crioinjúrias, que ocorrem durante a criopreservação causando perda de membrana celular e alteração no citoesqueleto dos oócitos, o que afeta a maturação citoplasmática, e o desenvolvimento embrionário.

No entanto, nossos resultados diferiram destes mesmos autores, que obtiveram em seu trabalho taxa de clivagem em embriões de 2 células (89%/63,6%), 8 células (54,6%/27,2%), mórula (46,9%/15,9%) e blastocisto (40,9%/ 11,36%), correspondentes aos grupos controle e vitrificados, respectivamente. Tal fato se deve, provavelmente, aos meios utilizados na vitrificação, no cultivo e mesmo a linhagem dos camundongos usada, que diferiu do presente estudo.

No G2, com 24 horas obteve-se 62 (27%) embriões com 2 células e 9 (4%) embriões com 4 células. Em 48 horas, encontramos 49 (21%) de 2 células, 38 (16%) de 4 células, 2 (0,8%) de 8 células e 2 (0,8%) mórula. Em relação às 72 horas, os resultados de desenvolvimento embrionário foram representados por 8 embriões (4%) de 8 células, 25 (11%) mórulas, 5 (2,2%) blastocistos iniciais. Os números e percentuais de embriões em estágio mais avançado com 96 horas foram: 3 (1%) mórulas, 8 (4%) blastocistos iniciais, 9 (4%) blastocistos, 5 (2%) blastocistos expandidos (Tabela 5). Neste grupo, apesar do desenvolvimento inicial ter sido favorável, o desenvolvimento embrionário final *in vitro* obteve taxas menores ao esperado, comparado com Behbahanian et al. (2013) que obtiveram taxas de 40% e 33,3%, correspondentes a mórula e blastocistos do ovário contra-lateral com oócito fresco maturado *in vitro*. Podemos sugerir que este fato se deveu aos embriões não conseguirem transpassar a fase materno-zigótica (TMZ) descrita inicialmente (STITZEL; SEYDOUX, 2007).

Em G3, às 24 horas, a taxa de clivagem para embriões de 2 ou mais células, foi 161 (49%). A taxa de embriões de 4 células em 48 horas foi superior em comparação aos demais grupos, 152 (46%). Os dados referentes a 72 horas demonstraram, 123 (37,5%) mórulas, 14 (4,3%) blastocistos iniciais, 1 (0,3%) blastocisto, 1 (0,3%) blastocisto expandido. Às 96 horas, encontrou-se taxas de 15 (4,6%) mórulas, 10 (3%) blastocistos iniciais, 34 (10,4%) blastocistos, 41 (12,5%) blastocistos expandidos, 54 (16,5%) blastocistos eclodidos (Tabela 5).

Este resultado demonstra que o G3 apresentou as melhores taxas de desenvolvimento *in vitro*. Isso é algo que já se esperava, uma vez que a maturação *in vivo* fornece melhores subsídios para os oócitos continuarem o seu desenvolvimento embrionário (CHEN et al., 2001).

Tabela 5. Estruturas embrionárias observadas durante às 96 horas de cultivo *in vitro*

Tempo (h)	Zigoto			2 células			4 células			8 células			Mórula			Bi			BI			Bx			Be			Deg					
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3			
0	123	224	328	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	102	152	154	10	62	161	0	9	3	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	1	0			
48	76	104	127	6	49	7	5	38	123	0	2	28	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	29	0			
72	48	61	118	11	29	8	2	21	6	6	8	4	2	25	127	0	5	14	0	1	1	0	0	0	0	0	0	54	75	0			
96	26	44	65	9	20	4	5	18	4	1	3	3	1	3	15	6	8	10	0	9	34	0	5	41	0	0	54	75	114	98			

Bi= Blastocisto inicial; BI=Blastocisto , Bx= Blastocisto expandido, Be= Blastocisto eclodido

5.3. Comparação entre as taxas de clivagem e produção de blastocistos

5.3.1. Análise estatística da taxa de clivagem às 24 horas

Para as taxas de clivagem com 24 horas, o G1 (8%) diferiu significativamente dos G2 (32%) ($p < 0.1$) e G3 (49%) ($p < 0.05$). No entanto, não houve diferença significativa entre G2 e G3 ($p > 0.05$) (Figura 16).

Observou-se que no G1 houve um atraso no desenvolvimento no período avaliado. Contudo, como não houve diferença entre G2 e G3, podemos considerar que a maturação *in vitro* apresentou a mesma qualidade encontrada na maturação *in vivo* quando se observa o desenvolvimento embrionário inicial (Figura 16).

Esse atraso e as menores taxas de desenvolvimento embrionário observados no G1 podem ser consequência da ausência de células do *cumulus*. Entende-se que os oócitos provenientes de ovários vitrificados podem sofrer ações que prejudicam o seu desenvolvimento celular, por lesões nas comunicações com as células do *cumulus* (LUCIANO et al., 2009; ZHOU et al., 2010).

Nagai et al. (2006) demonstraram uma disfunção mitocondrial e fragmentação em oócitos de camundongos após vitrificação e aquecimento. Eles concluíram que uma distribuição mitocondrial anormal nos oócitos seria uma das causas do atraso no desenvolvimento embrionário, o que foi comprovado também na espécie suína (SHY et al., 2007). Lowther et al. (2009), relataram que a ruptura do retículo endoplasmático durante a vitrificação de oócitos de ratos e deficiências em fatores envolvidos na reorganização do mesmo durante a maturação de oócitos poderia contribuir para o baixo potencial de desenvolvimento *in vitro*.

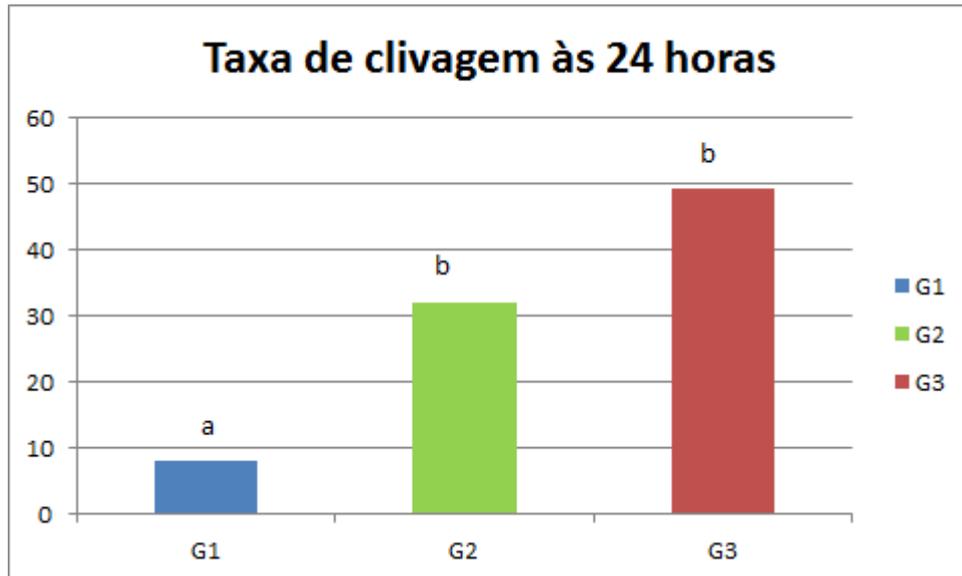


Figura 16. Comparação entre os diferentes grupos das taxas de clivagem (%) em 24h

Análise estatística: G1 x G2 ($p=0.0909$); G1 x G3 ($p=0.05$); G2 x G3 ($p=0.4345$). ^{ab} Letras diferentes - Diferenças significativas entre os tratamentos G1 e G2 ($p<0.1$) G1 e G3 ($p<0.05$). ^{bb} Letras iguais - Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0.05$).

5.3.2. Análise estatística da taxa de blastocistos às 96 horas

Já para as taxas de desenvolvimento em blastocistos com 96 horas, todos os tratamentos diferiram significativamente ($p<0.05$). Demonstrado que em ordem crescente os melhores resultados de blastocistos após maturação oocitária e fertilização *in vitro* foram G3 (46%), G2 (11%) e G1 (6%) (Figura 17).

Foi observado que o G1 apresentou maior número de oócitos com alterações morfológicas, caracterizadas pela redução das células do *cumulus-oophorus*. Tal fato pode ter favorecido para a maior taxa de degeneração observada.

Paim (2015) em seu trabalho sobre efeitos de diferentes concentrações de crioprotetores na vitrificação dos oócitos imaturos e desenvolvimento embrionário por partenogênese de ratos Wistar, utilizou-se de meios de maturação similares aos que foram utilizados no presente estudo, obtendo resultados para taxa de mórula de 1,8%. Em nossos estudos, foram observados para os grupos G1 e G2, taxas de 6% e 11% de blastocistos, respectivamente.

Wang (2012), após descongelar tecido ovariano e cultivar folículos pré-antrais (secundários) com maturação dos oócitos, obteve maiores taxas de

blastocistos (24,2%) quando comparadas ao G1 (6%) do nosso estudo. Entretanto, seus resultados para a produção de blastocistos obtidos a partir de oócitos à fresco, foram semelhantes aos nossos G3(46%).

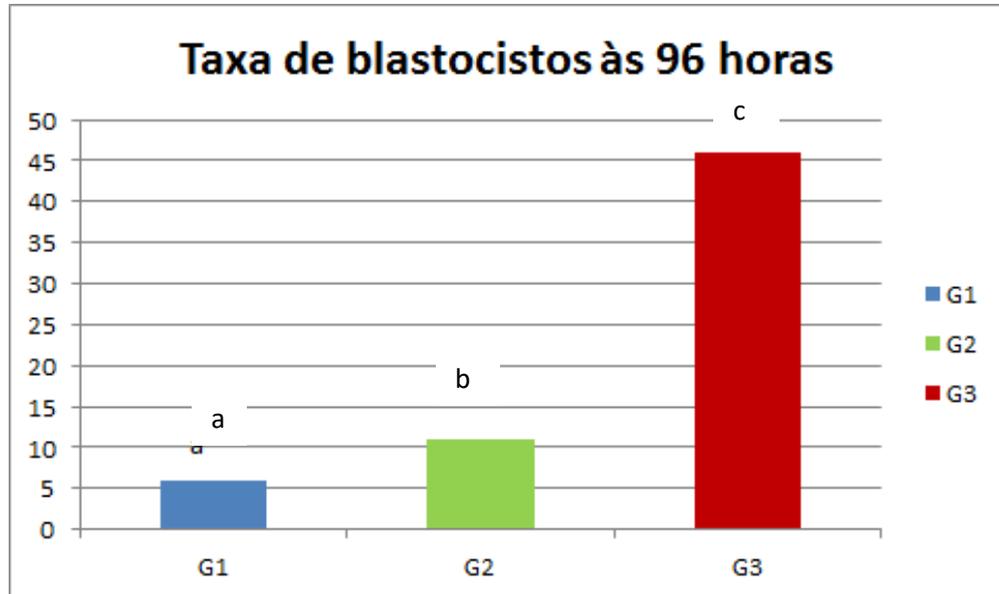


Figura 17.: Comparação entre os diferentes grupos das taxas de blastocistos em (%) em 96h

Análise estatística: G1 x G2 ($p=0.001$); G1 x G3 ($p=0.0009$); G2 x G3($p=0.0428$). ^{abc} - Letras diferentes - Diferenças significativas entre os tratamentos ($p<0.05$).

6. CONCLUSÕES

A técnica de vitrificação de ovários de camundongos é uma alternativa para salvar o patrimônio genético de linhagens que não respondem a nenhum protocolo de criopreservação, já que obtivemos resultados de maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário inicial.

A maturação *in vitro* demonstrou ser uma alternativa para a produção de embriões de camundongos.

Estudos neste campo devem ser continuados para melhorias das condições de criopreservação, maturação *in vitro* e cultivo *in vitro*.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este projeto terá continuidade com ajustes dos protocolos descritos acima e com realização de técnicas de transplante do ovário *in vivo*. Esperamos melhorias adicionais aos nossos resultados e geração de novos conhecimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; DOS SANTOS MIRANDA, M.; OHASHI, O. M. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. **J. Health Sci.** v. 15, n. 3, 2015.
- ALI, J.; SHELTON, J. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **J. Reprod. Fertil.** v. 99, p.471–477, 1993.
- AMORIM, C.; GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J. Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles. **Hum. Reprod.** v. 9, p.119–129, 2003.
- AMORIM, C.A.; CURABA, M.; LANGENDONCKT, A.V.; DOLMANS, M.M.; DONEZ, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reprod. BioMed. Online.** v. 23, p.160-186, 2011a.
- AMORIM, C.A.; DAVID, A.; DOLMANS, M.M.; CAMBONI, A. DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A. Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 28, p. 1157–1165, 2011b.
- AMORIM, C.A.; DAVID, A.; VAN LANGENDONCKT, A.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. **Fertil Steril.** v. 95, p.1094–1097, 2011c.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** SciELO-Editora FIOCRUZ, p.388, 2006.
- ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Anim Reprod Sci,** v.103, p.290-303, 2008.
- ARAV, A.; NATAN, D. Directional freezing of reproductive cells and organs. **Reprod. Domest. Anim.** v. 47, n.4, p.193–196, 2012.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0:** aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: MCT/CNPQ, 2007.
- BAGIS, H.; AKTOPRAKLIGIL, D.; MERCAN, H.O.; YURDUSEV, N.; TURGUT, G.; SEKMEN, S.; ARAT, S.; CETIN, S. Stable transmission and transcription of newfoundland ocean pout type III fish antifreeze protein (AFP) gene in transgenic mice and hypothermic storage of transgenic ovary and testis. **Mol. Reprod. Dev.** v. 73, p.1404–1411, 2006.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science,** v. 82, p. 255-266, 2004.
- BEHBAHANIAN, A.; EIMANI, H., ZEINALI, B., VALOJERDI, M. R., YAZDI, P. E., SHAHVERDI, A.: GOLKAR-NARENJI, A. *In vitro* maturation, fertilization and embryo

culture of oocytes obtained from vitrified auto-transplanted mouse ovary. **International Journal of Fertility & Sterility**. v. 6, n. 4, p. 278, 2013.

BESSA, I. R.; DODE, M. A. N. Ovogênese e modificações epigenéticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 3, p. 241-248, 2013.

BOS-MIKICH, A.; MARQUES, L.; RODRIGUES, J.L.; LOTHHAMMER, N.; FRANTZ, N. 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 Genetic**. v. 29, p.1267–1271, 2012.

BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral**. Brasília, DF, 2016.

BYERS, S.L.; PAYSON, S.J.; TAFT, R.A. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). **Theriogenology** v. 65. p. 1716–1726, 2006.

CAI, X.; CHEN, G.; LIAN, Y.; ZHENG, X.; PENG, H. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. **Human Reproduction**. v. 20, p.1969–1974, 2005.

CAMARGO, E. L. R. A.; MAGALHÃES, J. Z.; FUKUSHIMA, A. R.; SPINOSA, H. S. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**. v.17, n.1, p. 8-25, 2017.

CARLSON, Bruce M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Elsevier: Brasil. 2014. p.520.

CARMO, N. A. D. **Viabilidade de folículos ovarianos autotransplantados para o rim de camundongas Balb-C**. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, p.61, 2013.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; CASTRO, S. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 40, n.3, p. 1046, 2012.

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

CECCONI, S.; CAPACCHIETTI, G.; RUSSO, V.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARDONI, B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biology of Reproduction**. v. 70, n.1, p. 12-17, 2004.

CHANG, H.J.; MOON, J.H.; LEE, J.R.; JEE, B.C.; SUH, C.S.; KIM, S.H. Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**. v. 37, p.1092–1101, 2011.

CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHENG, Y.Y.; CHEN, H.S.; HO, H.N; YANG, Y.S. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**. p. 16, n. 11, p. 2350-2356, 2001.

CHEN, S.U.; CHIEN, C.L.; WU, M.Y.; CHEN, T.H.; LAI, S.M.; LIN, C.W; YANG, Y.S. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**. v. 21, n. 11, p. 2794-2800, 2006.

CHIAN, R. C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **Journal of Reproduction and Development**. v. 50, n. 6, p. 685-696, 2004.

CHOI, J.Y.; LEE, B.E.; LEE, E.Y.; YOON, B.K.; BAE, D.S.; CHOI, D.S. Cryopreservation of ovarian tissue temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. **Cryobiology**. v. 56, p. 36-42, 2008.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n. 1, 2007.

COTICCHIO, G.; SANTIS, L. DE.; ROSSI, G.;BORINI, A.; ALBERTINI, D.; SCARAVELLI, G.; ALECCI, C.; BIANCHI, V.; NOTTOLA, S.; CECCONI, S. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. **Human Reproduction**. v. 21, p. 1771 -1776, 2006.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. D. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 56, n. 1, p.103-111, 2010.

DELA PEÑA, E.C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; ATABAY, E.C; NAGANO, M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**. v.123, n.4, p. 593-600, 2002.

DENTILLO, D. B.; CAMPOS, J. R.; SILVA, A. R.; GARCIA, S. B.; SÁ, M. F. S.; SILVA, A. C. J. S. R. Produção de oócitos em mamíferos adultos: o camundongo como modelo. **Reprodução & Climatério**. v. 28, n. 3, p. 104-107, 2013.

DINNYES, A.; WALLACE, G.A; RAIL, W.F. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. **Molecular Reproduction and Development**.v.40, p.429-435, 1995.

DINNYES, A.; MENG, Q.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, n.1, p. 171-190, 2006.

DITTRICH, R.; MALTARIS, T. A simple freezing protocol for the use of an open freezing system for cryopreservation of ovarian tissue. **Cryobiology**. v. 52, p.166, 2006.

DOS SANTOS, B. F. **Criação e Manejo de Camundongos. Animais de laboratório: criação e experimentação**, Elsevier Brasil p. 65 - 70, 2006.

DUTTA, S.; BURKS, D. M.; PEPLING, M. E. Arrest at the diplotene stage of meiotic prophase I is delayed by progesterone but is not required for primordial follicle formation in mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 14, n. 1, p. 82, 2016.

EDSON, M.A.; NAGARAJA, A.K.; MATZUK, M.M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine Reviews**. v. 30, p.624-712, 2009.

ENDO, Y.; FUJII, Y.; SHINTANI, K.; SEO, M.; MOTOYAMA, H.; FUNAHASHI, H. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 24, p.301–307, 2012.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**. v.46, p.138-45, 1997.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 1, p. 197-207, 1996.

FAGUNDES, D. J; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FAIR, Trudee. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 22, n. 1, p. 13-20, 2009.

FEIJÓ, A.G.S.; BRAGA, L.M.G.M.; PITREZ, P.M.C. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre: EDIPUCRS; p.421, 2010.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira**. v. 20, p. 28-34, 2005.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**. v.71, p.836-848, 2009.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L. Biotécnicas reprodutivas na produção de animais geneticamente modificados para pesquisa biomédica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.41, n.1, p.103-104, 2017.

FU, Q.; LIU, Z.F.; HUANG, Y.L.; LU, Y.Q.; ZHANG, M. Comparative Proteomic Analysis of Mature and Immature Oocytes of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, p.1-10, 2016.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Mammalian Preimplantation Embryo Culture. **Mouse Molecular Embryology**. p. 167-182, 2013.

GODARD, A. L. B. O camundongo como modelo animal de patologia humana. <https://www.ufmg.br/proex/cpinfo/educacao/docs/02i.pdf>, acesso em: 07 março 2018.

GOOK, D.; EDGAR, D.; BORG, J.; ARCHER, J.; MCBAIN J. Diagnostic assessment of the development potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting. **Human Reproduction**. p.72–78, v. 20, 2005.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, n.2, p.82-94, 2009a.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, p.82-84, 2009b.

GUÉNET, J.L.; BENAVIDES, F.; PANTHIER, J.J.; MONTAGUTELLI, X. **Genetics of the Mouse**. Berlin: Springer, p.408, 2015.

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

HASEGAWA, A.; HAMADA, Y.; MEHANDJIEV, T.; KOYAMA, K. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. **Fertility and Sterility**. v. 81, n.1, p. 824–830, 2004.

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA, K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**. v. 86, n. 4, p. 1182-1192, 2006.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. Elsevier. Brasil, 1ª ed, p. 455, 2012.

HOGAN, B.; BEDDINGTON. R.; CONSTANTINI. F.; LACY. E. **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. Second Edition. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 497, 1994.

HORWATH, D.; HORWATH, D.; CHECK, J. H.; KATSOFF, B.; AMUI, J.; BRASILE, D. Subsequent therapeutic options and outcome in couples who fail to fertilize despite *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**. v. 34, p. 109-110, 2007.

HUANG, C. C.; LEE, T. H.; CHEN, S. U.; CHEN, H. H.; CHENG, T. C.; LIU, C. H.; LEE, M. S. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. **Human Reproduction**. v. 20, n. 1, p. 122-128, 2005.

IMHOFF, M.L.; BOUNOUA, L.; RICKETTS, T.; LOUCKS, C.; HARRISS, R.; LAWRENCE, W.T. Global patterns in human consumption of net primary production. **Nature**. v. 429, p. 870-873, 2004.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; RAHIMI, G.; NAWROTH, F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v.108, p.186–193, 2003.

JEE, B.C.; LEE, J.R.; YOUM, H.; SUH, C.S.; KIM, S.H.; MOON, S.Y. Effect of sphingosine-1-phosphate supplementation on follicular integrity of vitrified-warmed mouse ovarian grafts. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 152, p. 176–180, 2010.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**. v 10, n.1, p. 1-5, 2004.

JÚNIOR, P. H. A. C.; DE ASSUNPÇÃO, C. M.; VIANA, J. H. M. Foliculogênese: da migração das células germinativas primordiais à aplicação de tecnologias reprodutivas em mamíferos. **Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF) Revista**, v. 23, n. 1, p. 35-44, 2009.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; MASASHIGE, K. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**. v.18, p. 568–577, 2009.

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S.Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J.D.; BATHGATE, R. A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.101, p.7323-7328, 2004.

KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEIKHI M.; VOLPE, A. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction** v.24, p.1–14, 2009.

KIM, N.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. **Zygote**. v.8, p.25-32, 2000.

KIM, S.H.; KU, S.Y.; SUNG, K.C.; KANG, M.J.; KIM, S.A.; KIM, H.S.; OH, S.K.; JEE B.C.; SUH, C.S.; CHOI, Y.M.; KIM, J.G.; MOON, S.Y. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. **Yonsei Medical Journal**. v.47, n.3, p. 339-404, 2006.

KIM, G.A.; KIM, H.Y.; KIM, J.W.; LEE, G.; LEE, E.; AHN, J.Y.; PARK, J.H.; LIM, J.M. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. **Theriogenology**. v. 75, p.1045-1051, 2011.

KIRKEGAARD, K.; AGERHOLM, I.; INGERSLEV, H.J. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. **Human Reproduction**. v.27, p.1277 – 1285, 2012.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 11, n. 5, p. 608-614, 2005.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**. v.82, p.45-51, 2004.

LANE, M.; BAVISTER, B.D.; LYONS, E.A.; FOREST, K.T. Containersless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**. v.17, p. 1234- 1236, 1999.

- LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**. v. 69, p. 37-47, 2008.
- LEE, J.R.; YOUM, H.W.; LEE, H.J.; JEE, B.C.; SUH, C.S.; KIM, S.H. Effect of antifreeze protein on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **Yonsei Medical Journal**. v. 56, p. 778–784, 2015.
- LEMMEN, J.G.; AGERHOLM, I.; ZIEBE, S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. **Reproductive BioMedicine Online** v. 17. p. 385 – 391, 2008.
- LIMA, G. L.; DOS SANTOS, É. A. A. Aplicação das biotécnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 43-50, 2010.
- LIMA, L.F.; BRUNO, J. B.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Papel da homeopatia na regulação da foliculogênese in vivo e in vitro. **Reprodução & Climatério**. v. 31, n.2, p.112–119, 2016.
- LIMA, L. F.; BRUNO, J. B.; SILVA, A. M. S.; DUARTE, A. B. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**. v. 31, n. 2, p. 93-104, 2016a.
- LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT, M. Live offspring by in vitro oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. **Biology of Reproduction**. v.64, p.171-178, 2001b.
- LLOYD, K.; FRANKLIN, C.; LUTZ, C.; MAGNUSON, T. Use mouse biobanks or lose them. **Nature**. v. 522, n. 7555, p. 151–153, 2015.
- LOWTHER, K.M.; WEITZMAN, V.N.; MAIER, D.; MEHLMANN, L.M. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. **Biology of Reproduction**. v.81, n., p.147–154, 2009.
- LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; LOPES, L.H.R.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**. v. 61, p. 1101-1114, 2004.
- LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**. v. 59, p. 90-95, 2009.
- LUZ, V.B.; SANTOS, R.R.; PINTO, L.C.; SOARES, A.A.X.; CELESTINO, J.J.H.; MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Dimethyl sulfoxide perfusion in caprine ovarian tissue and its relationship with follicular viability after cryopreservation. **Fertility and Sterility**. v. 91, p. 1513-1515, 2009.
- MAGOFFIN, D.; KUMAR, A.; YILDIZ, B.; AZZIZ, R. **Endocrinology of the ovary. In: melmed s, conn pm. Endocrinology: Basic and Clinical Principle**, 2.ed. Totowa: Humana Press, p.391-403. 2005.

- MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, n.4, p.433-442. 2007.
- MATOS, M.C.; BEZERRA, M.B.; VICENTE, W.R.R. Criopreservação e xenotransplante de tecido ovariano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, n.4, p.467-471, 2011.
- MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**. v.21, n.2, p. 200-214, 2000.
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SILVA, A. P. T. B.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 37, n. 4, p. 328-333, 2015.
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.40, n.2, p.58-64, 2016.
- MESEGUER, M.; HERRERO, J.; TEJERA, A.; HILLIGSOE, K.M.; RAMSING, N.B.; REMOHI J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. **Human Reproduction**. v. 26, p. 2658 – 2671, 2011.
- MIYAUCHI, T. A. **Aspectos biológicos do desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos partenogênicos ou fecundados *in vitro***. 93f. Dissertação. Universidade José do Rosário Vellano-UNFENAS, Alfenas-MG, 2012.
- MIYOSHI, K. Development of a Culture Medium for Rat 1-Cell Embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**. v. 33, n.1, p.11-16, 2016.
- MOMOZAWA, K.; MATSUZAWA, A.; TOKUNAGA, Y.; ABE, S.; KOYANAG, Y.; KURITA, M.; NAKANO, M.; MIYAKE, T. Efficient vitrification of mouse embryos using the Kitasato Vitrification System as a novel vitrification device. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 15, n. 1, p. 29, 2017.
- MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R.M., TAKETSURU, H.; MIYANO, T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**. v. 72, p. 280–288, 2009.
- MOROHAKU, K.; TANIMOTO, R.; SASAKI, K.; KAWAHARA-MIKIB, R.; KONO, T.; HAYASHI, K.; HIRAO, Y.; OBATA, Y. Complete *in vitro* generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.113, n.32, p.9021–9026, 2016.
- MULLEN, S.F.; CRITSER, J.K. The Science of Cryobiology. **Cancer Treatment and Research**. v.138, p.83-109, 2007.
- NAGAI, S.; MABUCHI, T.; HIRATA, S.; HIRATA, S.; SHODA, T.; KASAI, T.; YOKOTA, S.; HOSHI, K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 210, n.2, p.137–144, 2006.

- NEWTON, H.; ILLINGWORTH, P. *In vitro* growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. **Human Reproduction**. v.16, p.423-429, 2001.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**. v.35, p.109-124, 1991.
- NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**. v.136, n.11, p. 1869-78, 2009.
- ONIONS, V.J.; MITCHELL, M.R.P.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. **Human Reproduction**. v. 23, n.3, p. 606-618, 2008.
- ONOS, K. D.; RIZZO, S. J. S.; HOWELL, G. R.; SASNER, M. Toward more predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. **Brain Research Bulletin**. v. 122, p. 1-11, 2016.
- PAIM, L. M. G. **Efeitos da vitrificação de complexos cumulus oócito imaturos de Rattus norvegicus utilizando diferentes concentrações de crioprotetores e tempos de exposição sobre a maturação nuclear e desenvolvimento embrionário**, 111f. Dissertação, programa de pós-graduação em ciências da saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2015.
- PAYTON, R.R.; COY, P.; ROMAR, R.; LAWRENCE, J.L.; EDWARDS, J.L. Heat shock increase glutathione in bovine oocytes. **Journal of Animal Science**. v.81 (Suppl.1), p.3, 2003b.
- PEDERSEN, T; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 17, n. 3, p. 555-557, 1968.
- PEGG, D.E. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. **Human Fertility**. v.8, p.231-239, 2005.
- PEREIRA, E. C. M.; BORGES, A. M.; OBA, E. Maturação in vitro de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento Embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.40, n.2, p.43-50, 2016.
- PINCTON, H; BRIGGS, D; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.145, p. 27-37, 1998.
- POPOVA, E.; BADER, M.; KRIVOKHARCHENKO, A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro*. **Genes (Basel)**.v. 2, n.2, p.332-44, 2011.
- PRADOS, F. J.; DEBROCK, S.; LEMMEN, J. G.; AGERHOLM, I. The cleavage stage embryo. **Human Reproduction**. v. 27, n. 1, p. i50-i71, 2012.

PYLES, E. Criopreservação de embriões e oócitos, **Bioembryo**. Disponível em: <<http://www.bioembryo.com.br/noticias.php?cat=1&subcat=2&id=188>>. Acesso em: 30 de dezembro, 2017

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista Bioética**. v. 10, n. 1, 2009.

REPOLÊZ, A.; SILVA, L.; MARTINS, K.; OLIVEIRA, A. P.; ABBAGLIATO, A.; CORRÊA, G.; BERBERT, L. R. Determinação dos índices de produtividade de colônia de produção da linhagem B6D2F1. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**. v. 4, n. 2, p. 138, 2017.

SALEHNIA, M.; TÖHÖNEN, V.; ZAVAREH S.; INZUNZ, J. Does Cryopreservation of Ovarian Tissue Affect the Distribution and Function of Germinal Vesicle Oocytes Mitochondria? **BioMed Research International** . p.1-8, 2013.

SAKI, G.; DEZFULY, F.G. Vitrification of human oocyte using cryoloop. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. v. 3, n.1, p. 19-24, 2005.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. p.1896-1912, 2012.

SANFINS, A.; LEE, G. Y.; PLANCHA, C. E.; OVERSTROM, E. W.; ALBERTINI, D. F. Distinctions in meiotic spindle structure and assembly during in vitro and in vivo maturation of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**. v. 69, p. 2059-2067, 2003.

SANFINS, A.; PLANCHA, C. E.; OVERSTROM, E. W.; ALBERTINI, D. F. Meiotic spindle morphogenesis in in vivo and in vitro matured mouse oocytes: Insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. **Human Reproduction**. v. 19, p. 2889-2899, 2004.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MELO, M.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n.2, p. 250-255, 2006.

SANTOS, R.R.; HURK, R.V.D.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**. v. 99, p. 53-64. 2007.

SENEDA, M.M.; SILVA K.C.F. Epigenética e neo-oogênese: novos conceitos em foliculogênese **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, n.3, p.111-117, 2009.

SERAPIÃO, R.V. **Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro cultivados em meio livre de soro**. Tese (Doutorado em Produção Animal) Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes – RJ, p. 82. 2007.

SHARMA, G.T.; KHARCHE, S.D.; MAJUMDAR, A.C. Vitrification of in vitro matured goat oocytes and the effect on in vitro fertilization. **Small Ruminant Research**. v. 64, p. 82-86, 2006.

SHAW, J.M.; COX, S.L.; TROUNSON, A.O.; JENKIN, G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.161, p.103-110, 2000.

SHI, L. Y.; JIN, H. F.; KIM, J. G.; KUMAR, B. M.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. **Animal Reproduction Science**. v. 100, n. 1-2, p. 128-140, 2007.

SILVA, A. A. R.; RODRIGUES, C. G.; SILVA, M. B. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. **Revista da Biologia**. v. 17, n.1, p.13-18, 2017.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**. v.55, p.1241-1254, 2001.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**. v. 3, p.147-160, 2005.

SOMFAI, T.; IMAI, K.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; HARAGUCHI, S.; MIZUTANI, E.; DANG-NGUYEN, T.Q.; INABA, Y.; GESHI, M.; NAGAI, T. The effect of ovary storage and in vitro maturation on mRNA levels in bovine oocytes; a possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. **he Journal of Reproduction and Development**. v.57, p.723-730, 2011.

STITZEL, M.L.; SEYDOUX, G. Regulation of the oocyte-to-zygote-transition. **Science**. v.316, p.407-408, 2007.

SZTEIN, J. M.; FARLEY, J. S.; MOBRAATEN, L. E. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1774-1780, 2000.

SZTEIN, J. M.; VASUDEVAN, K.; RABER, J. Refinements in the Cryopreservation of Mouse Ovaries. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v.49, n.4, p.420-422, 2010.

TILLY, J. L.; JOHNSON, J. Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary. **Cell cycle**. v. 8, p. 879-883, 2007.

THE JACKSON LABORATORY. Disponível em: <https://www.jax.org/strain/003303>. Acesso em: 02/02/2018.

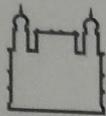
THE JACKSON LABORATORY. Disponível em: <https://www.jax.org/strain/002666>. Acesso em: 02/02/2018.

TSANG, W.H.; CHOW, K.L.; Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. **Biotechniques**. v. 46, n.7, p. 550-552, 2009.

- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J., et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v.51, p. 53-58, 1998.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**. v. 60-61, p.357-364, 2000.
- VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 12, p. 779-796, 2006.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v.63, p.1717-1751, 2005.
- WANG, X.; CATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**. v.141, p.183-191, 2012.
- WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. **Journal of Morphology**. v. 156, n. 2, p. 209-235, 1978.
- WEIDNER, C.; STEINFATH, M.; OPITZ, E.; OELGESCHLÄGER, M.; SCHÖNFELDER, G. Defining the optimal animal model for translational research using gene set enrichment analysis. **EMBO Molecular Medicine**. p. 1-8, 2016.
- WONG, C.C.; LOEWKE, K.E.; BOSSERT, N.L; BEHR, B; DE JONGE, C.J; BAER, T.M; REIJO PERA RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. **Nature Biotechnology**. v. 28, p. 1115 – 1121, 2010.
- YING, Y.; QI, X.; ZHAO, G-Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.98, n.14, p.7858-7862, 2001.
- YOUM, H.W.; LEE, J.R.; LEE, J.; JEE, B.C.; SUH, C.S.; KIM, S.H. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. **Human Reproduction**. v.29, p.720–730, 2014.
- ZHANG, J.; LI, L.; LIU, X.; YANG, Y.; WAN, X. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v. 26, p.137–142, 2009.
- ZHOU, X. L.; AL NAIB, A.; SUN, D. W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**. v. 61, p. 66-72, 2010.

ANEXO 1

CEUA (P-36/16-9)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-28/17

Certificamos que o protocolo (P-36/16-9), intitulado "Estabelecimento do protocolo de criopreservação de ovários de camundongos, com posterior transplante ou fertilização in vitro, no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz)", sob a responsabilidade de ISABELLA DE MOURA FOLHADELLA PIRES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 25/09/2021 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 60 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 4 Semana(s).

Mus musculus

- 120 Fêmeas de B6D2F1, Idade: 7 Semana(s).

Mus musculus

- 60 Machos de BALB/c An, Idade: 7 Semana(s).

Mus musculus

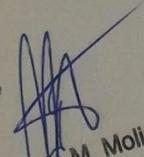
- 90 Machos de BALB/c An, Idade: 21 Dia(s).

- 90 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 21 Dia(s).

Mus musculus

Rio de Janeiro, 25 de setembro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA


Etelza M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096
25/09/2017

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

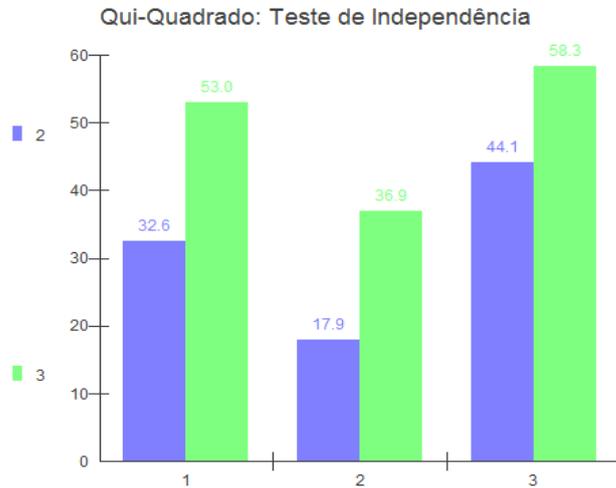
ANEXO 2

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

RESULTADOS COM 24 HORAS

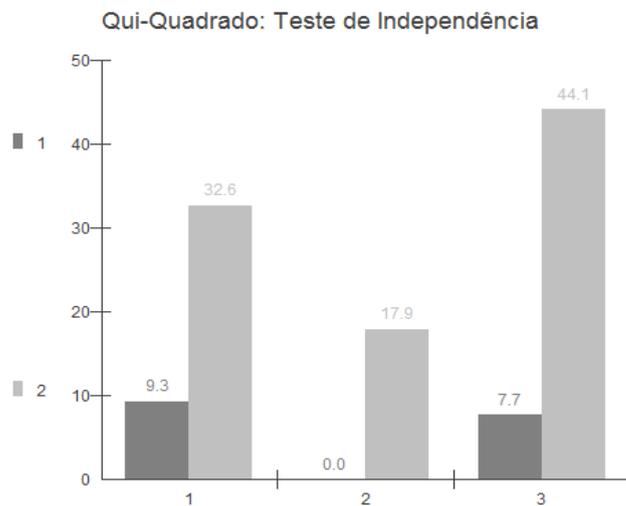
a. Comparação entre G2 e G3

Qui-Quadrado = 1.667; Graus de liberdade = 2; (p) = 0.4345 (**NÃO SIGNIFICATIVO**)



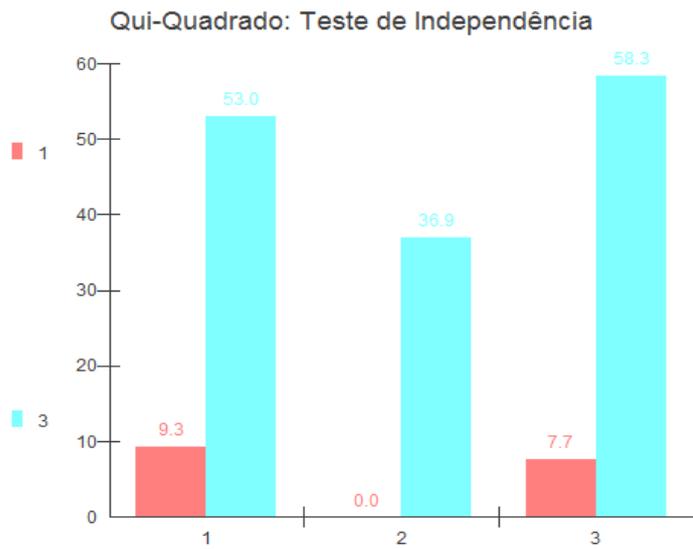
b. Comparação entre G1 e G2

Qui-Quadrado = 4.795; Graus de liberdade = 2; (p) = 0.0909 (**SIGNIFICATIVO A 10%**)



c. Comparação entre G1 e G3

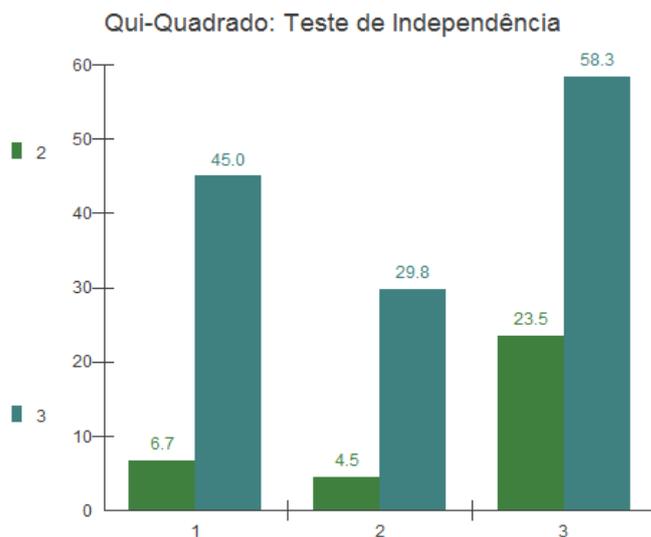
Qui-Quadrado = 5.819; Graus de liberdade = 2; (p) = 0.05 (**SIGNIFICATIVO A 5%**)



RESULTADOS 96 HORAS

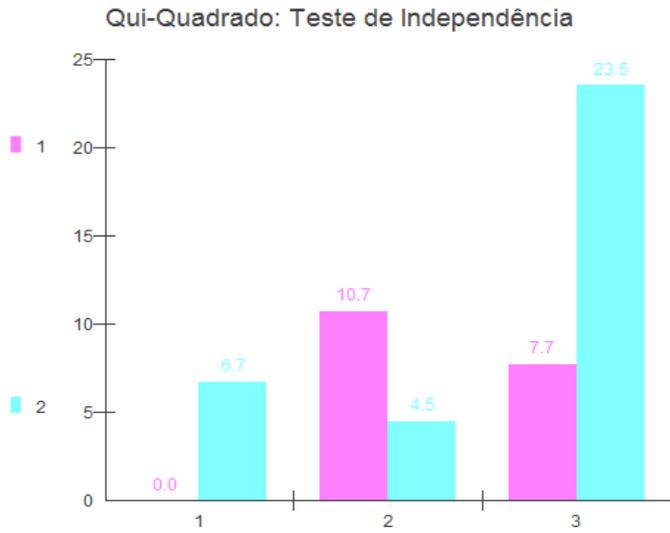
a. Comparação entre G2 e G3

Qui-Quadrado = 6.305; Graus de liberdade = 2; (p) = 0.0428 (**SIGNIFICATIVO A 5%**)



b. Comparação entre G1 e G2

Qui-Quadrado = 13.499; Graus de liberdade = 2; (p) = 0.001 (**SIGNIFICATIVO A 1%**)



c. Comparação entre G1 e G3

Qui-Quadrado = 13.969; Graus de liberdade = 2; (p) = 0.0009 (**SIGNIFICATIVO A 5%**)

