



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ÉRICA CAMILA GURGEL PRAXEDES

VITRIFICAÇÃO E CULTIVO *IN VIVO* DE TECIDO OVARIANO DE CUTIAS
(*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823)

MOSSORÓ – RN
2017

ÉRICA CAMILA GURGEL PRAXEDES

**VITRIFICAÇÃO E CULTIVO *IN VIVO* DE TECIDO OVARIANO DE CUTIAS
(*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

Co-orientadora: Profa. Dra. Gabriela Liberalino Lima - UFRR

MOSSORÓ – RN
2017

ÉRICA CAMILA GURGEL PRAXEDES

**VITRIFICAÇÃO E CULTIVO *IN VIVO* DE TECIDO OVARIANO DE CUTIAS
(*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823)**

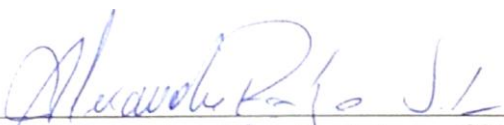
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

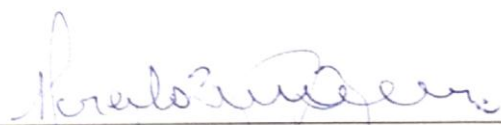
Co-orientadora: Profa. Dra. Gabriela Liberalino Lima – UFRR

APROVADA EM: ____/____/____.

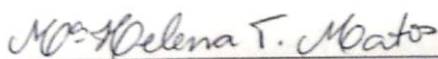
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva
Universidade Federal Rural do Semi-Árido



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra
Universidade Federal Rural do Semi-Árido



Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos
Universidade Federal do Vale do São Francisco

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

P919c PRAXEDES , ÉRICA CAMILA GURGEL .
VITRIFICAÇÃO E CULTIVO IN VIVO DE TECIDO
OVARIANO DE CUTIAS (*Dasyprocta leporina*
Lichtenstein, 1823)/ ÉRICA CAMILA GURGEL
PRAXEDES . - 2017.

105 f. : il.

Orientador: ALEXANDRE RODRIGUES SILVA. Co-
orientadora: GABRIELA LIBERALINO LIMA.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de
Pós-graduação em, 2017.

1. cutias. 2. folículos pré-antrais. 3.
vitricificação. 4. xenotransplante. I. SILVA,
ALEXANDRE RODRIGUES , orient. II. LIMA, GABRIELA
LIBERALINO , co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ÉRICA CAMILA GURGEL PRAXEDES – Nascida no Município de Caraúbas – RN, no dia 17.08.1991, filha de Josimary Araruna Gurgel Praxedes e Eni Alves Praxedes, concluiu o Ensino Médio no colégio Facex, RN. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2014.2, onde foi bolsista PIVIC por um mês e PIBIT por um ano. Durante a graduação, desenvolveu trabalhos sobre a conservação de material genético de espécies silvestres e Manipulação de oócitos inclusos em folículos Ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). Em Dezembro de 2014, foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGA/UFERSA). Durante o período do mestrado, foi colaboradora na disciplina de Fisiopatologia da Reprodução do curso de Medicina Veterinária da mesma instituição.

A minha mãe, Josimary Araruna, por todo o seu amor.

*A Gabriela Liberalino Lima, todo o meu conhecimento aqui apresentados e
adquiridos.*

Aos animais, exemplo de amor incondicional “in memoriam”.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelos 731 dias de oportunidades durante esses dois anos de mestrado, e por toda a força e a coragem a mim concedidos.

À mainha, Josimary Araruna, minha fonte inesgotável de amor e exemplo de vida. Obrigada, por todo o amor. AMO-TE eternamente!

A minha avó, Josinete Araruna, por todo o conforto, abraços e beijos. AMO-TE!

A painho, Eni Praxedes e ao meu irmão Ennyckson Praxedes que mesmo de longe, me transmitiu amor e confiança. AMO-TE!

Ao meu namorado, Toninho Araújo, por ser meu dia-a-dia, por toda a confiança, tranquilidade, amor e companheirismo. Obrigada, pelos 7 anos e 10 meses de alegrias constantes. AMO-TE!

À sogrinha, Zélia Araújo, por ser a minha mãe sempre que precisei, e por acreditar em todo o meu esforço e dedicação.

Aos meus cachorros, Duque e Lola, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

À Gabriela Liberalino Lima, sem ela, não teria jamais chegado aqui! Obrigada por todo o meu conhecimento, todos os aperreios e todos os puxões de orelha, por toda a sua inteligência e paciência. Muitíssimo obrigada!

À Andréia Silva e Livia Campos, por todos os momentos e gargalhadas inesquecíveis e por fazerem dos meus dias mais escuros, um arco-íris. Levarei-as comigo para sempre!

A minha segunda e eterna família do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) por me permitir alegrias, aperreios, risadas, lágrimas, dramas, desespero e amor diários. Em especial a Luana Bezerra por todos os momentos em que precisei estava presente; a Constância por todos os conselhos e sinceridades; a Gislayne Peixoto por ser tão presente mesmo que distante. Agradeço de coração a todos os outros que fazem do LCGA um ambiente tão fraterno e acolhedor.

Ao meu orientador Alexandre Rodrigues Silva, por me dar a oportunidade de integrar toda a sua equipe, por todo o seu exemplo de inteligência, competência e dedicação. E por ser um verdadeiro ORIENTADOR. Sem palavras pra agradecer todas as suas orientações.

Ao Profº. Dr. Moacir Franco de Oliveira, pela disponibilidade dos animais, ajuda na execução do experimento e todo o apoio dado desde a iniciação científica.

Aos funcionários do Centro de Multiplicação de Animais Silvestre (CEMAS), essenciais para a execução desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Transplante Gonadal e Produção de Embriões *in vitro* (LIGPIV/UFERSA), em especial ao Profº Dr. Marcelo Barbosa e a Fernanda Araujo dos Santos por me permitir realizar o xenotransplante de tecido ovariano. Obrigada por toda a ajuda!

A equipe do LAMOFOPA pela ajuda na realização de algumas análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

À banca que aceitou o convite para participar de um momento tão importante em minha vida.

Aos animais, por me mostrarem que vale a pena lutar por eles todos os dias e por serem vítimas dos maus tratos humanos.

À UFERSA por me dar a oportunidade de fazer amigos inesquecíveis, e me proporcionar momentos únicos todos os dias.

“O importante é o presente. Planejar e deixar para o futuro é correr o risco de nossos planos estarem sempre no futuro, e este nunca se tornar presente. O importante é sempre o agora, não é o ontem nem o amanhã. Faça o que lhe cabe hoje. Tarefas prontas darão lugar a outras. Fazendo sempre o que planeja, um dia terá concluído”.

Romance do espírito Antônio Carlos

VITRIFICAÇÃO E CULTIVO *IN VIVO* DE TECIDO OVARIANO DE CUTIAS

(*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823). Praxedes, Érica Camila Gurgel. Vitrificação e cultivo *in vivo* de tecido ovariano de cutias (*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823). 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017.

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi utilizar a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré antrais (MOIFOPA) como ferramenta para o resgate e conservação do uso de gametas femininos de cutias (*Dasyprocta leporina*). A dissertação foi dividida em duas fases experimentais. Na primeira, foi realizada a vitrificação em superfície sólida (SSV) utilizando diferentes concentrações de agentes crioprotetores (ACPs), na qual foram verificados os efeitos das concentrações de 3 e 6 M de dimetilsulfoxido (DMSO) e etilenoglicol (EG), bem como a associação de ambos os ACPs na concentração maior (6 M) sob a morfologia, viabilidade e apoptose celular de folículos ovarianos pré-antrais *in situ* (FOPAs). Um total de 865 FOPAs foi analisado antes e após a vitrificação. No grupo controle, foi observado $80,7 \pm 5,21\%$ de FOPA morfolologicamente normais. Após SSV, independentemente do ACP utilizado, foram obtidos até $76,7\% \pm 5,4$ de FOPAs. Na análise de viabilidade, DMSO 3 M, DMSO 6 M, EG 3, EG 6 M (70,0%; 81,11%; 76,6% e 71,11%; respectivamente) apresentaram valores semelhantes de FOPAs viáveis ao grupo controle (79,0%). Na segunda fase, foi realizada a SSV utilizando a associação dos ACPs (DMSO e EG), seguido do xenotransplante de tecido ovariano de cutias em camundongas C57Bl/6 SCID. Através do monitoramento do lavado vaginal, observou-se que 80% das camundongas do grupo controle e 42% do grupo vitrificado retornaram à atividade ovariana, confirmada pela dosagem hormonal. Microscopicamente, folículos primordiais, primários, transição e secundários foram observados nos enxertos, e todos tinham morfologia normal para as espécies estudadas. No entanto, os folículos primordiais e primários foram observados em maior quantidade após transplante. As Regiões organizadoras de nucléolos (NORs) revelaram que após o transplante ocorreu uma redução significativa de NORs no grupo vitrificado-xenotransplantado ($1,66 \pm 0,25$) quando comparados aos grupos controles (grupo controle fresco: $7,19 \pm 1,23$; grupo controle xenotransplantado: $9,10 \pm 0,64$). As células apoptóticas (TUNEL positivo) foram encontradas somente após o transplante das amostras vitrificadas e folículos saudáveis foram encontrados nos outros grupos tratado (TUNEL negativo). Assim, como conclusão geral, o uso da MOIFOPA em cutias permitiu o conhecimento de aspectos relacionados a sua morfofisiologia reprodutiva, possibilitando tanto a conservação do material genético, com a possibilidade de formação de bancos de germoplasma; e ainda a elucidação dos mecanismos relacionados à sobrevivência e ao desenvolvimento dos FOPA *in vivo*.

Palavras-chaves: cutias, folículos pré-antrais, vitrificação, xenotransplante.

VITRIFICATION AND *IN VIVO* CULTURE OF TISSUE OVARIAN OF AGOUTI (*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823). Praxedes, Érica Camila Gurgel. Vittrification and *in vivo* culture of tissue ovarian of agouti (*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823). 2017. Thesis (Master degree in Animal Science: Morphophysiology and Animal Biotechnology) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017.

ABSTRACT: The objective of the present thesis was to use the manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles (MOIFOPA) as a tool for the female gametes rescue and conservation, from wild species agouti (*Dasyprocta leporina*). The dissertation was divided into two experimental phases. At first, it was performed solid surface vitrification (SSV) using different concentrations of cryoprotectant agents (CPAs) in which the effects of the 3 and 6 M concentrations of dimethylsulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG) were verified, as well as the association of both CPAs in the high concentration (6 M) under morphology, viability and apoptosis cell on the *in situ* PFs. A total of 865 PFs was analyzed before and after vitrification, it was observed an average of $80.7 \pm 5.21\%$ of morphologically normal follicles in the control group and after SSV, indifferent the CPA used, it was possible to preserve until $76.7\% \pm 5.4$ OF PFs. At viability analysis, DMSO 3 M, DMSO 6 M, EG 3, EG 6 M (70.0%, 81.11%, 76.6% and 71.11%, respectively) presented similar values to the control group (79.0%). No apoptotic cells (TUNEL positive) were found before and after vitrification. At second, vitrification was performed using the association of CPAs, followed by xenografting of ovarian tissue in C57Bl/6 SCID Black mice. Through vaginal washing monitoring, was observed that 80% mice of the xeno-fresh group and 42% of the xeno-vitrified group returned to ovarian activity, confirmed by hormonal measures. Microscopically, primordial, primary and transitional follicles were observed in the grafts, and all had normal morphology for the species studied. However, major primordial and primary follicles were observed in transplants. The NORs revealed that after transplantation a significant reduction (1.66 ± 0.25) occurred when compared to the control groups (group fresh control: 7.19 ± 1.23 and xeno-fresh group: 9.10 ± 0.64). Apoptotic cells (TUNEL positive) were found only after transplantation of samples vitrified and the healthy follicles (TUNEL negative) observed in other groups (TUNEL negative). Thus, as the general conclusion, the use of MOIFOPA in agouti allowed the knowledge of aspects related to its reproductive morphology and physiology, enabling the germplasm conservation, with the possibility of germplasm bank formation, as the elucidation of mechanisms related to the PF survive and *in vivo* development.

Keywords: agouti, preantral follicles, vitrification, xenografting.

LISTAS DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

% Porcentagem

± Mais ou menos

+ Mais

- Menos

< Menor

> Maior

~ Semelhante

nº número

μ Micrometro

°C Graus Celsius

°C/min Graus Celsius por minuto

ACP Agente crioprotetor

ANOVA Análise de Variância

Ag-NOR Regiões organizadoras de nucléolo argentafins

CEMAS Centro de multiplicação de animais silvestres

CIV Cultivo *in vitro*

cm Centímetros

CPA Crioprotetor

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Deoxyribonucleic acid

DNA ácido desoxirribonucleico

EG Etilenoglicol

FCS fetal calf serum

FIV Fertilização *in vitro*

FOPA Folículos ovarianos pré-antrais

g Grama

g/mol gramas/mol

h Hora

ICMbio Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN (International Union for Conservation of Nature) União Internacional de Conservação da Natureza
Kg Kilograma
kV Quilovolt
LN2 Nitrogênio Líquido
M Molar
 $\mu\text{g/mL}$ Micrograma por mililitro
 μL microlitro
mL Mililitro
mm Milímetros
 mm^3 Milímetros cúbico
 m^2 Metro quadrado
min Minutos
Mm Milimolar
mol/L Mol por litro
mL/ml Miligramas por mililitros
mL/kg Mililitro por quilo
mg/l Miligrama por litro
MEM Meio Essencial mínimo
MIV Maturação *in vitro*
MOIFOPA Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
NORs Regiões Organizadoras de Nucléolos
PIVE Produção *in vitro* de embriões
PBS Phosphate Buffered Saline
PFs Folículos pré – antrais
pg/ml Picograma por mililitro
RN Rio Grande do Norte
s Segundos
SE Erro Padrão

SEM Erro Padrão e Média

SCID Imunodeficiência severa combinada

SFB soro fetal bovino

SSV vitrificação em superfície sólida

SV solução de vitrificação

SUC Sacarose

TdT Enzima terminal deoxinucleotidil transferase

UFERSA Universidade Federal Rural do Semi-árido

VS Vitrification solution

x Vezes

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 Percentage (normal/total) of morphologically normal ovarian preantral follicles from agouti (*Dasyprocta leporina*) from control and after solid surface vitrification (SSV) using 3 or 6 M of dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and combination (DMSO and EG).....63

Table 2 Percentage (viable/total) of viable ovarian preantral follicles from agouti (*Dasyprocta leporina*) from control and after solid surface vitrification (SSV) using 3 or 6 M of dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and association (DMSO and EG).....65

CAPÍTULO 2

Table 1. Reproductive monitoring of C57Bl/6 SCID mice submitted to xenografting of agoutis' (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue.....88

Table 2. Average number of nucleolar organizer regions argentafins (NOR) per nucleus of granulosa cells derived from agouti (*Dasyprocta leporina*) growing preantral follicles from fresh and vitrified ovarian tissues that were subjected to in vivo culture..... 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cutia adulta em cativeiro (<i>Dasyprocta leporina</i> Lichtenstein, 1823).....	21
Figura 2. Par de ovários de cutias (<i>Dasyprocta leporina</i>).....	24
Figura 3. Características histológicas do ovário de cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>). Folículos primordiais (A) exibindo um oócito com um grande núcleo, rodeado por uma camada de células pavimentosas. Folículos primários (B) caracterizados por um oócito que indica grande núcleo e citoplasma homogêneo rodeado por uma camada completa de células da granulosa cubóides. Folículo secundário (C) mostrando duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides. (D) folículos pluriovulares (seta) contendo dois oócitos rodeados por uma única camada de células da granulosa em formato pavimentoso. Barra de escala: 50 µm. (Fonte: LIMA, 2015).....	25
Figura 4. Representação esquemática da estrutura ovariana.....	26

CAPÍTULO 1

Figure 1. Histological characteristics from agouti (<i>Dasyprocta leporina</i>) before (A and B) and after solid surface vitrification (C and D). (A) Aggregates of primordial (arrows), (B) primary follicle, (C) secondary follicle (D) degenerated follicles (arrows); (E) polyovular follicles accessory (arrows) (F) corporea lutea (arrows). Scale bar: 100µm.....	64
---	----

Figure 2. Detection of apoptosis occurrence in agoutis' (<i>Dasyprocta leporina</i>) ovarian tissue using TUNEL assay. A cortex without counter staining (A - left) and with propidium iodide staining (A' - right) in the control group (B and B') and vitrification group: DMSO 3 M (C and C'), DMSO 6 M (D and D'), EG 3 M (E and E'), EG 6M (F and F'), DMSO and EG (G and G'). Arrows: primordial follicles; arrowheads: primary follicles. Scale bar: 20µm.....	66
--	----

CAPÍTULO 2

Figure 1. Macroscopic morphological aspect of ovarian cortex fragments from agouti (<i>Dasyprocta leporina</i>). (A) Fragment of ovarian tissue under the renal capsule, (B) parenchymal region with ovarian tissue and (C) hemorrhagic corporea after xenografting.....	86
---	----

Figure 2. Characteristics of recipients SCID mice's external genitalia (A C) and vaginal cytology (B,D). (A) Proestrus characterized for the beginning of mucus production and vulvar opening; (B) vaginal washing showing nucleated epithelial	
--	--

cells; (C) estrus characterized for increased mucus production and complete vulvar opening; (D) vaginal washing cornified cells 82

Figure 3. Histological characteristics of agoutis’ (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue submitted to xenografting to SCID mice. Aresh (A and B) and vitrified (C) after xenografting in mice C57Bl/6 female SCID. (A) primordial follicles; (B) primary follicles; (C) secondary follicles; (D) Corporea lutea (E) hemorrhagic corporea (white arrow) with presence of preantral follicles (Black arrow); (F) blood vessels. Scale bar: 40 µm.....89

Figure 4. Proportions of morphologically normal ovarian follicles (%) in agoutis’ (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue submitted to different treatments. *Asterisk indicate statistical difference among experimental groups.....90

Figure 5. Argentafins nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in agoutis’ (*Dasyprocta leporina*) preantral ovarian follicles submitted to different treatments. (A) Fresh control group; (B) xenograft fresh group; (C) vitrified group; (D) xenograft vitrified group. Scale bar: 100 µm.....91

Figure 6. Detection of apoptosis occurrence in agoutis’ (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue using TUNEL assay. Cortex without counter staining (A - left) and with propidium iodide staining (A’ - right) in the control group (B and B’), vitrification group (C and C’), xeno-control (D and D’) and xeno-vitrified group (E) with TUNEL-positive signals (E’). Scale bar: 20 µm.....92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. A CUTIA (<i>Dasyprocta leporina</i>).....	20
2.1.1. Importância ecológica e produtiva.....	20
2.1.2. Características gerais e reprodutivas.....	21
2.2. ASPECTOS GERAIS DA CRIOPRESERVAÇÃO E MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS (MOIFOPA).....	25
2.2.1. Métodos de criopreservação.....	27
2.2.2. Agentes crioprotetores.....	31
2.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E DA VIABILIDADE FOLICULAR.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	40
5. OBJETIVOS.....	41
5.1. Objetivo geral.....	41
5.2. Objetivos específicos.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
7. CAPÍTULO 1 Vitrification of agouti (<i>Dasyprocta leporina</i> , Lichtenstein, 1823) ovarian tissue using different cryoprotectants.....	55
8. CAPÍTULO 2 Development of fresh and vitrified agoutis' ovarian tissue after xenograft to SCID mice.....	76
9. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	104
10. ANEXOS.....	105

1. INTRODUÇÃO

O bioma caatinga possui diversas espécies animais já catalogados 148 espécies de mamíferos. Dentre estas, destacam-se as cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823), as quais têm sido caçadas pela população local para serem utilizadas como uma fonte alternativa de proteína animal, assim como para a produção de pele, couro e pelos (SILVA et al., 2010). Deste modo, esses animais apresentam um grande potencial de mercado, devendo-se, para tanto, direcionar um maior fluxo de pesquisas, no intuito de garantir sua conservação (SOUZA et al., 2003) e a formação de criatórios para fins comerciais (BONAUDO et al., 2005).

Nesse contexto, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas é de suma importância, como a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA). Essa consiste no isolamento ou resgate de folículos ovarianos pré-antrais (FOPAS), como na sua conservação. Dentre os métodos de conservação, a vitrificação vem ganhando destaque nos últimos anos (MOAWAD et al., 2012), bem como o método de superfície sólida (FAUSTINO et al., 2011).

No entanto, para que se tenha sucesso em protocolos de criopreservação, faz-se necessária a adição de ACPs. Os ACPs agem protegendo a célula a baixas temperaturas, prevenindo a formação de gelo intracelular e os possíveis danos causados pela desidratação (HAN et al., 2009). Assim dependendo do seu local de ação podem ser classificados em intracelulares e extracelulares. Dentre os ACPs intracelulares destacam-se o dimetilsufóxido (DMSO) e o etilenoglicol (EG) e entre os extracelulares, a sacarose.

Assim, diversos métodos de análise de folículos pré-antrais criopreservados vem sendo bastante utilizados, como a análise da morfologia mediada pelo método da histologia clássica, da viabilidade utilizando o corante azul de Trypan (MATOS et al., 2007b), bem como análises de imunohistoquímica e agNOR, através da análise da atividade proliferativa folicular das células da granulosa. Dentre esses, destaca-se o cultivo *in vivo* de tecido ovariano através da técnica de xenotransplante, capaz de favorecer o crescimento e maturação de oócitos de várias espécies, podendo garantir também, a preservação de espécies ameaçadas de extinção (KIKUCHI et al., 2011).

Em virtude da sua ampla aplicação na reprodução assistida associada ao transplante, a possibilidade de retomada da função ovariana e a facilidade de manuseio

do tecido, a maioria dos trabalhos tem se concentrado na criopreservação de tecido ovariano (FAUSTINO et al., 2011). O xenotransplante compreende a coleta de um tecido doador de certa espécie e a introdução deste tecido em um receptor de outra espécie (AUBARD, 2003). Estudos relatam o uso da técnica em primatas, (CANDY et al., 1995), marsupiais (WOLVEKAMP et al., 2001), e bovinos (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005). Resultados satisfatórios foram encontrados no xenotransplante de tecido ovariano bovino em camundongas imunodeficientes, onde os folículos pré antrais mostraram viabilidade e ocorreu aumento na porcentagem de folículos antrais presentes no tecido xenotransplantado (BEZERRA, 2010).

Dessa forma, estudos relacionados à conservação de material genético são de grande importância para espécies silvestres, como a cutia, pois além de possibilitar o estudo de suas particularidades fisiológicas, permitem a exploração de seu potencial zootécnico, contribuindo não apenas para compreensão de mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial, como também gerando conhecimentos fundamentais para a aplicação de outras biotécnicas, visando sua conservação e sua multiplicação dentro de um sistema produtivo.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cutia (*Dasyprocta leporina*)

2.1.1. Importância ecológica e produtiva

A cutia (*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823) é uma espécie mamífera silvestre pertencente à classe *Mammalia* e ordem *Rodentia*, com distribuição do Tocantins a Leste dos Andes (REIS et al., 2006), habitando a floresta Amazônica, Atlântica, Cerrado e Caatinga (KAISER et al., 2011).

Dentre as 148 espécies mamíferas encontradas no bioma caatinga, a cutia, é considerada uma fonte alternativa de proteína animal (NOGUEIRA; NOGUEIRA – FILHO, 2011), e vem sendo utilizada pela população, também, para a extração da sua pele, couro e pelos, sendo sua carne considerada, ainda, uma iguaria em alguns países da América Central (ROOPCHAND, 2002). Por essa razão, vem sofrendo com a crescente caça predatória e destruição de seu habitat natural (HOSKEN; SILVEIRA, 2001), no entanto sua população é considerada estável e não preocupante (CATZEFLIS et al., 2014).

Esta espécie é de suma importância para o equilíbrio da cadeia alimentar, servindo de alimento para raposas e felídeos (HOSKEN; SILVEIRA, 2001), bem como atuam como dispersores de sementes através das fezes e por se alimentarem de folhas, raízes, flores, sementes e especialmente de frutos caídos no solo, contribuem com a disseminação de diversas espécies vegetais (LANGE; SCHMIDT, 2007). Ao urinarem e defecarem em suas tocas auxilia no retorno dos nutrientes e sais minerais para o solo, e por fazerem tocas no solo, promovem também à aeração do terreno (COSTA et al., 2013).

Em decorrência da sua adaptação a diversos ambientes, a cutia pode ser explorada racionalmente, mediante a prática de manejo que favoreça a sobrevivência em seu habitat natural ou em cativeiro (PACHALY et al., 1999). A criação em cativeiro surge, assim, como uma alternativa para a sua preservação, exploração de seu potencial zootécnico, permitindo, ainda, o desenvolvimento de estudos sobre suas particularidades fisiológicas (PACHALY et al., 1999; LOPES et al., 2004).

Além de sua importância econômica e ecológica, esse roedor silvestre, pode ser utilizado como modelo experimental para outras espécies de roedores vulneráveis à extinção como, por exemplo, a *Dasyprocta ruatanica* (ICMBIO, 2014), por apresentarem baixo custo de manutenção, curto período de gestação e pequeno porte (PUKAZHENTHI et al., 2006). Espécies utilizadas como modelos experimentais como animais domésticos e silvestres não ameaçados são essenciais para o desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida que posteriormente possam ser aplicados a estas, auxiliando na sua conservação (WANDERLEY et al., 2012)

2.1.2. Características gerais e reprodutivas

As cutias (*Dasyprocta spp.* Lichtenstein, 1823) fazem parte da ordem dos roedores, constituindo o gênero *Dasyprocta* que engloba onze espécies, entre as quais podemos destacar a espécie *Dasyprocta leporina* (Figura 1), a qual apresenta distribuição do Tocantins ao leste dos Andes (LANGE, 1998; REIS et al., 2006), ocupando a floresta Amazônica, Atlântica, Cerrado e Caatinga (KAISER et al., 2011).

Figura 1 Cutia adulta em cativeiro (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823)



Fonte: arquivo LCGA

São roedores silvestres de tamanho médio de 50 cm de comprimento mensurados do focinho a base da cauda, sendo esta última geralmente sem pelo; apresenta altura média de 23 cm e peso variando entre 1,5 a 2,8 kg. Seu corpo é

espesso e sua cabeça, levemente alongada, sendo suas orelhas, relativamente pequenas. Os pelos que as revestem são ásperos e duros, predominando as cores marrons, claro ou escuro, amarelada ou dourada. Os membros são bem adaptados às longas caminhadas, onde os torácicos são mais curtos possuindo cinco dedos, enquanto os pélvicos são longos, apresentando apenas três dedos, todos eles dotados de fortes unhas semelhantes a cascos (OLIVEIRA et al., 2012).

Estes animais têm hábitos diurnos e crepusculares e quando ameaçados, podem apresentar hábitos noturnos (SANTOS, 2005). São naturalmente herbívoros, alimentando-se de folhas, raízes, flores, fungos, sementes e, especialmente, de frutos encontrados no solo (BOSSO, 2007).

Com relação às características reprodutivas atingem maturidade sexual por volta dos nove a dez meses de idade, podendo ser influenciada pela presença do macho (GUIMARÃES et al., 2009). As fêmeas tem ciclo estral poliéstrico contínuo com presença de uma membrana de oclusão vaginal, duração média de 28 dias, com variação de 24 a 31 dias (CAMPOS et al., 2015) e período de gestação de 105 a 120 dias com ninhadas médias de um a três filhotes, amamentados por um período de 20 semanas (NOWAK, 1999), tendo o sistema de acasalamento classificado como monogâmicos (KORZ; HENDRICH, 1995).

Segundo Almeida et al. (2003), os ovários (Figura 2), da espécie *Dasyprocta leporina* estão localizados na região sublombar, caudalmente ao rim, na cavidade abdominal apresentando um formato elipsóide ou ovalado, achatado dorso-ventralmente. Possuem cor amarela clara e superfície externa lisa com pequenas áreas translúcidas, sugestivas da presença de folículos em diferentes ordens. Histologicamente, são revestidos por um epitélio cúbico simples, tendo como base uma camada de tecido conjuntivo rico em fibras, sendo descrita uma grande quantidade de corpos lúteos acessórios nessa espécie (WEIR, 1974).

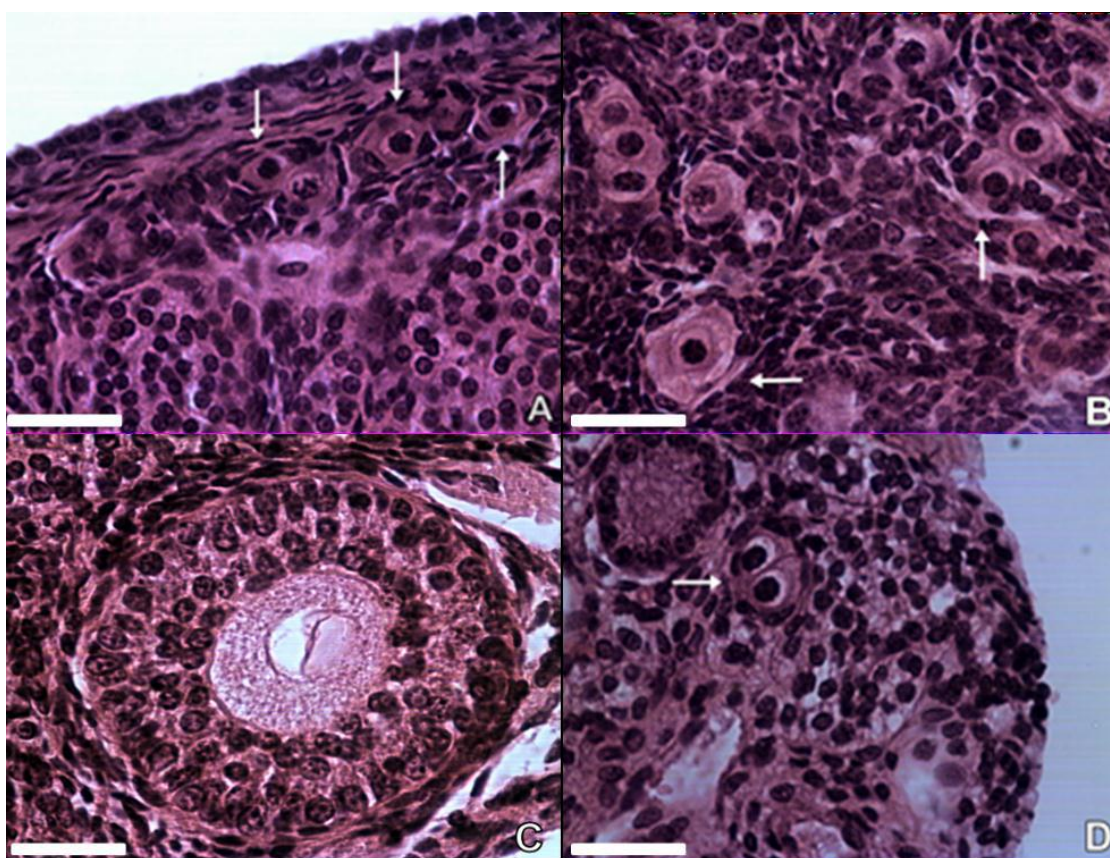
Figura 2. Par de ovários de cutias (*Dasyprocta leporina*).



Fonte: arquivo LCGA

De acordo com os dados morfométricos o ovário direito apresenta em média um peso de 0,082 g; comprimento de 0,83 cm; largura de 0,49 cm e espessura de 0,24 cm, enquanto que o ovário esquerdo possui um peso de 0,058 g; comprimento de 0,74 cm; largura de 0,45 cm e espessura de 0,23 cm (ALMEIDA et al., 2003). O folículo (Figura 3), unidade morfofuncional do ovário, apresenta dimensões variando entre as classes foliculares, onde o folículo primordial apresenta-se com $18,62 \pm 3,40\mu\text{m}$ de comprimento com oócito de $12,28 \pm 2,37\mu\text{m}$ e núcleo $6,10 \pm 0,93\mu\text{m}$, folículo primário, oócito e núcleo de $23,75 \pm 5,70\mu\text{m}$; $14,22 \pm 3,00\mu\text{m}$ e $6,70 \pm 1,24\mu\text{m}$, respectivamente; e ainda folículo secundário com $88,55 \pm 17,61\mu\text{m}$ de comprimento, oócito $52,85 \pm 17,56\mu\text{m}$ e núcleo de $22,33 \pm 17,61\mu\text{m}$ (SANTOS et al., 2012). Santos et al. (2012) observaram, ainda, uma grande quantidade de folículos pluriovulares, representando um total de 7,51% dos folículos encontrados.

Figura 3. Características histológicas do ovário de cutia (*Dasyprocta leporina*). Folículos primordiais (A) exibindo um oócito com um grande núcleo, rodeado por uma camada de células pavimentosas. Folículos primários (B) caracterizados por um oócito que indica grande núcleo e citoplasma homogêneo rodeado por uma camada completa de células da granulosa cubóides. Folículo secundário (C) mostrando duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides. (D) folículos pluriovulares (seta) contendo dois oócitos rodeados por uma única camada de células da granulosa em formato pavimentoso. Barra de escala: 50 µm. (Fonte: LIMA, 2015)



No tocante à aplicação de biotécnicas reprodutivas em cutias, até o momento foram descritas em fêmeas a criopreservação lenta de FOPA *in situ* de *D. leporina* criadas em cativeiro na Caatinga (WANDERLEY et al., 2012), bem como o diagnóstico de gestação por ultrassonografia em *D. prymnolopha* (SOUSA et al., 2012); a caracterização morfológica dos ovários (ALMEIDA et al., 2003), das tubas uterinas (FORTES et al., 2005) e a placentação (RODRIGUES et al., 2003). Em machos, já foram descritos alguns estudos acerca da validação de sondas fluorescentes

(BEZERRA et al., 2014); estabelecimentos de protocolos de eletroejaculação (CASTELO et al., 2015) e coleta, avaliação e criopreservação de espermatozoides epididimários (FERRAZ et al., 2011; SILVA et al., 2011) da mesma espécie.

Nesse contexto, devido à escassez de informações acerca das particularidades morfofisiológicas da cutia, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas que possibilitem a conservação do seu material genético é necessário, pois além de garantir a otimização destas biotécnicas reprodutivas a partir de um pequeno número de gametas femininos, permitem o aumento da variabilidade genética e do potencial reprodutivo da espécie em estudo.

1.2. Aspectos gerais da criopreservação e da Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)

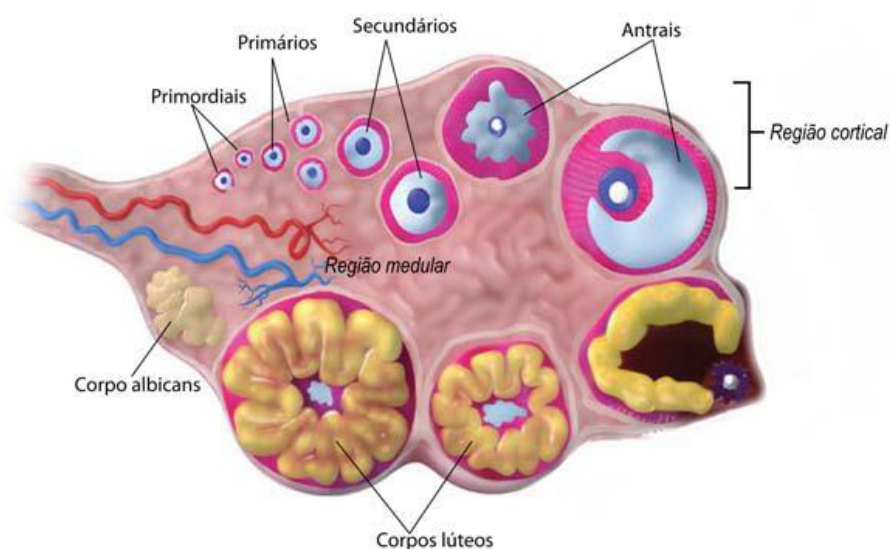
O ovário da maioria das espécies domésticas e silvestres é constituído de uma região cortical e outra medular formada por uma grande quantidade de células, que juntas, trabalham para exercerem as suas funções endócrinas e gametogênicas (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). A região cortical é responsável por conter milhares de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e a medular, por promover a sustentação e nutrição do ovário (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O folículo é a principal unidade morfofuncional do ovário, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento, maturação oocitária e produção de hormônios (GORDON, 1994; CORTVRINDT; SMITZ, 2001). É constituído por um oócito circundado por células da granulosa e pode ser classificado como pré-antral ou antral, dependendo da presença ou ausência de uma cavidade repleta de líquido folicular circundando o oócito, denominada cavidade antral, respectivamente (ARAÚJO, 2014).

A foliculogênese (Figura 3) pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com o desenvolvimento do folículo primordial e culminando para o estágio de folículos pré-ovulatórios (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), iniciando na vida fetal na maioria das espécies. Os folículos primordiais representam a grande maioria (95%) da população folicular presente no ovário, constituindo o *pool* de reserva de folículos quiescentes e somente uma pequena

parte (0,1%) dos folículos primordiais chega à ovulação, pois a maioria (99,9%) tornam-se atresícos durante as fases de crescimento e maturação oocitária (URBINA; LERNER, 2008).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura ovariana. Adaptado de http://faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P2_reproductive_system_lab.htm



Assim, no intuito de evitar a perda folicular e recuperar uma maior quantidade desses folículos ovarianos, que possivelmente entrariam em atresia, surge à Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA). Essa biotécnica consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, sua posterior conservação visando à estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período e no cultivo folicular, objetivando promover o crescimento, maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos previamente inclusos em FOPA, uma vez que, esses eventos não poderão mais ocorrer no próprio ovário (FIGUEIREDO et al., 2007).

A aquisição do material genético feminino pode ser realizada através de biopsias de tecidos ovarianos, punções foliculares, ovariectomia uni ou bilateral ou ainda através de colheita de ovários imediatamente após a morte do animal, permitindo

a conservação de tecido ovariano, dos folículos isolados ou dos oócitos imaturos ou maduros (DOMINGUES et al., 2007; LERMEN et al., 2009).

A criopreservação consiste na conservação de material biológico a baixas temperaturas, na maioria das vezes, a temperatura criobiológica do nitrogênio líquido (-196°C), possibilitando a célula ou tecido permanecerem viáveis por tempos indeterminados, podendo ser recuperados viáveis após processo de descongelação (BAKHACH, 2009) devido à redução do seu metabolismo, permanecendo em fase de anabiose.

Buscando manter a viabilidade folicular até que seja realizado o cultivo *in vitro* (CIV) ou transplante ovariano, a criopreservação de tecido ovariano surge como uma alternativa a qual permite a manutenção da integridade estrutural das células germinativas (FAUSTINO et al., 2010) e não somente por permitir salvaguardar o material genético feminino, mas também por possibilitar a restauração da fertilidade causada por falha ovariana prematura; tratamentos gonadotóxicos (quimioterapia e/ou radioterapia) e até mesmo após a morte do animal (FAUSTINO et al., 2011).

Todavia, para cada tipo celular existe uma temperatura ideal de armazenamento e as crioinjúrias estão diretamente relacionadas à natureza e cinética das células ao responderem às condições induzidas pela temperatura (FABBRI, 2006), dependendo do método de criopreservação estabelecido.

Existem vários métodos de conservação celular, entretanto, não há um método ideal que garanta a conservação perfeita das características morfológicas, fisiológicas e genéticas do material a ser criopreservado. Portanto, é imprescindível primeiramente avaliar o material biológico a ser conservado para realizar a escolha do método de conservação, considerando as vantagens e desvantagens de cada método (SOLA, 2012).

1.2.1. Métodos de criopreservação

Basicamente, a criopreservação é realizada através de dois métodos principais, a congelação lenta e a vitrificação.

A congelação lenta ou congelação convencional baseia-se na redução gradual da temperatura sob a utilização de um freezer programável, com a utilização de baixas

concentrações de ACPs, promovendo o aumento na concentração de solutos extracelulares, levando à cristalização da água no interior da célula (PAYNTER, 2000). Esta característica está diretamente relacionada com o equilíbrio osmótico, determinando a velocidade com que a água sai da célula (MAZUR, 1984; LUVONI, 2006). Na cutia (*Dasyprocta leporina*), espécie estudo do presente trabalho, este método já foi realizado com sucesso na criopreservação de tecido ovariano (WANDERLEY et al., 2012).

Entretanto, esse método traz danos irreversíveis à célula através da formação de cristais de gelo. Essa crioinjúria ocorre em decorrência da alta instabilidade provocada pelo super-resfriamento da água intracelular, sendo este fator principal para o rompimento das membranas plasmáticas celulares e consequentemente perda da integridade das mesmas, podendo induzir a morte celular por apoptose (LIEBERMANN et al., 2002)

Com o intuito de evitar estes danos, protocolos de vitrificação têm sido empregados, surgindo como uma alternativa ao processo de congelação lenta (BANDEIRA et al., 2015). A vitrificação foi rapidamente adotada como um método prático alternativo à congelação lenta de espermatozoides, oócitos e embriões, tanto na medicina reprodutiva humana quanto na veterinária, devido à simplicidade na sua execução, rentabilidade econômica e velocidade do procedimento de preservação (AMORIM et al., 2011), e principalmente pela não formação de cristais de gelo, o que permite maior preservação da morfologia celular (WIEDEMANN et al., 2012).

Essa biotécnica consiste na redução ultra-rápida da temperatura, em uma velocidade média de 20.000 a 40.000°C/min (WOWK, 2000). Utilizando altas concentrações de ACPs associadas a outros constituintes na solução de vitrificação (SV) por curtos períodos de tempo (25 segundos a 8 min), permite que o tecido ou a célula assumam um formato amorfo de não equilíbrio, sem cristalização, denominado estado vítreo (MUKAIDA; OKA 2012), em que partes das cadeias moleculares encontram-se desorganizadas, promovendo certa mobilidade às moléculas (CARVALHO et al., 2011). Esta particularidade permite uma melhor acomodação das estruturas celulares (VAJTA et al., 1998).

Dentre as suas principais vantagens, destacam-se a não formação de cristais de gelo devido à passagem rápida pelos estados críticos de redução da temperatura (-15 a

5°C), a não utilização de máquina de congelação e a redução no tempo de processamento (OLIVEIRA, 2013) e consequente redução de mão-de-obra com maior custo-benefício. Em geral, pode ser realizada em qualquer laboratório ou até na sala de cirurgia, simultaneamente a cirurgia do paciente/animal, e ainda a campo, até mesmo imediatamente após a morte do animal, sendo considerado o desenvolvimento mais significativo na criobiologia até hoje (AMORIM et al., 2011).

Diversos métodos de vitrificação têm sido desenvolvidos objetivando a redução da SV. Dentre as principais técnicas, destaca-se a vitrificação em superfície sólida (SSV) (TAKAHASHI et al., 2001; MIGISHIMA et al., 2003; CHEN et al., 2006; SOMFAI et al., 2007; GUPTA et al., 2007; SANTOS et al., 2007; MOAWAD et al., 2012). Esse método consiste na sobreposição da amostra em uma superfície de metal, a qual pode, inclusive, ser confeccionada artesanalmente com o uso de papel alumínio (SANTOS et al., 2007). Esta superfície, posicionada acima do nitrogênio líquido (N₂), proporciona um rápido resfriamento da amostra, condição necessária para uma vitrificação eficiente.

Este método vem sendo utilizado com sucesso para a criopreservação de tecido ovariano em espécies silvestres como catetos (LIMA et al., 2012) e em roedores em como ratas (XING et al., 2010), camundongas (FATEHI et al., 2014) e preás (*Galea spixii spixii*) (PRAXEDES et al., 2015) em que foi possível preservar quase 70% dos FOPAs após aquecimentos de fragmentos vitrificados. Todavia, não há relatos da aplicação desta técnica em cutias (*Dasyprocta leporina*), o que seria uma biotécnica promissora para a preservação do material genético da espécie em estudo, com aplicação em outros roedores, ou até mesmo, em animais domésticos e silvestres ameaçados de extinção.

Por oferecer inúmeras vantagens, a criopreservação de tecido ovariano, garante a conservação de células germinativas femininas, primeiramente pelos ovários conterem um grande número de oócitos inclusos em FOPAs, em que 90% são folículos primordiais, o que permitiria o estoque de uma grande quantidade de material genético feminino (SANTOS et al., 2010) e segundo, por estes folículos serem mais resistentes às crioinjúrias. Esta resistência se dá devido ao pequeno tamanho do oócito, ausência do fuso meiótico, baixa taxa metabólica, estágio do ciclo celular parado em prófase I, pequenas quantidades de lipídeos, grânulos da cortical e células de suporte e

ausência ou pequeno desenvolvimento da zona pelúcida, além da alta permeabilidade da membrana plasmática (SANTOS et al., 2010).

Muitos estudos vêm demonstrando com sucesso a conservação de material genético feminino incluso em tecido ovariano utilizando o método de vitrificação em animais selvagens como em catetos (*Pecari tajacu*) onde foi possível preservar morfollogicamente mais de 70% dos FOPAs após aquecimento (LIMA et al., 2012). Estudos com lobos cinzentos (BOUTELLE et al., 2011), veados (*Cervus elaphus hispanicu*) (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011), cangurus (*Macropus giganteus*) (RICHINGS et al., 2006) evidenciaram que os FOPAs se mantiveram viáveis quando criopreservados em tecido ovariano. Em babuínos (AMORIM et al., 2013), os autores relataram a sobrevivência folicular, crescimento e ovulação após autotransplante de tecido ovariano previamente vitrificado.

Assim, criopreservar tecido ovariano ainda é um desafio devido à diversidade dos componentes do tecido, além dos vasos sanguíneos e nervos essenciais para o restabelecimento da função ovariana após transplante e protocolos devem ser otimizados para lidar com essa diversidade (HAVOTTA, 2005). Em animais silvestres, ainda não é uma técnica bem estabelecida, mas sua relevância é indiscutível, constituindo-se de um elo entre os programas de conservação animal *in situ* e *ex situ* (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

No entanto, para se alcançar o sucesso em um protocolo de vitrificação algumas propriedades principais precisam ser consideradas: a taxa de resfriamento, resultando em queda da temperatura de centenas para dezenas de milhares de graus Celsius por minuto; a viscosidade do meio, adquirida através dos constituintes da solução de vitrificação e o volume, quanto menor o volume celular, mais rápido a transferência de calor e consequentemente maior taxa de resfriamento (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

Diante disso, alguns fatores podem influenciar em um protocolo de criopreservação e consequentemente em sua taxa de sucesso, seja através da vitrificação ou da congelação lenta. Acredita-se que as principais estruturas a sofrerem as crioinjúrias relacionam-se à membrana plasmática por serem responsáveis pelo fluxo de água e ACPs e por apresentarem na sua composição a bicamada lipídica, tornando-as mais sensíveis ao processo de desidratação celular (CASTRO et al.,

2014b); as organelas celulares como as mitocôndrias, retículo endoplasmático (LOWTHER et al., 2009; GUALTIERI et al., 2011; CASTRO et al., 2011; LEI et al., 2014) e o núcleo (MARTINO et al., 2013). Mais recentemente, foi verificado que algumas proteínas como as histonas, responsáveis pela instabilidade da cromatina, expõe o ácido desoxirribonucleico (DNA) às ações nocivas de radicais livres e das endonucleases, sendo possível a ocorrência significativas de lesões ao DNA (KOPEIKA et al., 2014).

Uma vez identificadas as crioinjúrias, faz-se necessário encontrar alternativas para diminuir, ou até mesmo, torna-las inexistentes, através da otimização e ajustes nos protocolos de criopreservação (CASTRO et al., 2014a), seja através da escolha do melhor método, ou até mesmo, nos constituintes da solução de criopreservação, os quais muitas vezes, possibilitam uma maior taxa de viabilidade celular. Desde modo, a aplicação de determinadas biotécnicas reprodutivas tem evidenciado a necessidade de preservação de células e tecidos de diferentes espécies ou raças de animais em vias de extinção, bem como a formação e manutenção de bancos de germoplasma (BOGLIOLO et al., 2007).

Entretanto, a capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende, principalmente, da sua tolerância aos agentes crioprotetores, além do processo de desidratação celular, resfriamento e descongelamento/aquecimento.

1.2.2. Agentes crioprotetores (ACPs)

O sucesso de um protocolo de criopreservação, na maioria das vezes, relaciona-se diretamente com a escolha de concentrações e crioprotetores ideais para cada tipo de célula ou tecido, sendo necessária uma seleção criteriosa dos mesmos, primeiramente devido à toxicidade gerada após metabolização e a permeabilidade individual de cada agente (AGCA et al., 2012). Essas características são essenciais uma vez que a maior parte das células mamíferas não sobrevive a temperaturas inferiores a 20°C (WHITTINGHAM, 1980).

Os ACPs são substâncias que protegem as células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura (HAN, 2009). Em geral, esses agentes podem agir penetrando nas células (crioprotetores intracelulares) e

substituindo as moléculas de água da célula, reduzindo o ponto de congelação; e ainda protegendo as membranas celulares (crioprotetores extracelulares) por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos, aumentando a viscosidade do meio, ou diminuindo a concentração de eletrólitos durante a criopreservação, reduzindo, assim, o risco de danos osmóticos (SANTOS, 2007).

Porém, para que um ACP apresente bons resultados, faz-se necessário que o mesmo possua alta solubilidade, baixo peso molecular para proporcionar uma rápida e eficiente penetração na célula ou tecido a fim de interagir e influenciar a dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (DOBRINSKY, 2000), baixa toxicidade (PEGG et al., 2007) e alta estabilidade às temperaturas reduzidas (DE LA VEJA; WILDE, 1991).

De acordo com a permeabilidade celular e dependendo do seu local de ação, os ACPs podem ser classificados em intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes. Dentre os ACPs intracelulares mais utilizados, destacam-se o DMSO e o EG, e entre os extracelulares, a sacarose (SAC).

Os crioprotetores intracelulares são aqueles em que agem ligando-se a moléculas de hidrogênio da água no interior da célula, aumentando a viscosidade da solução, deste modo, impedindo a formação de cristais de gelo, favorecendo o processo de desidratação celular (RODRIGUES et al., 2006).

O DMSO, por ser um álcool dipolar com massa molar de 78,13 g/mol (CARPENTER, 1994), vem sendo amplamente utilizado para solubilizar moléculas orgânicas (CAMICI et al., 2006) e na vitrificação, por induzir muito facilmente o estágio vítreo, além de preservar a integridade de proteínas isoladas e membranas lipídicas (WOOD et al., 1993). Por interagir com as membranas celulares, passa rapidamente por meio de difusão, evitando a cristalização da água. Ao sofrer metabolização, acidifica o meio gerando metabólitos de baixo potencial tóxico, quando comparado com os outros ACPs intracelulares, além de inibir a atividade da catalase e peroxidase, diminuindo a produção de radicais livres causada pela congelação (RODRIGUES et al., 2012).

Por ser um álcool dipolar, o DMSO é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas. O produto da sua metabolização é o dimetilsulfona (DMSO₂), também conhecida com metilsulfonilmetano (MSM), e tanto

o DMSO como seus metabólitos apresentam baixos efeitos tóxicos (OTSUKI et al., 2002).

Em caprinos, a utilização de DMSO foi capaz de manter a morfologia dos FOPAs após a criopreservação (CASTRO et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados em hamster (KAGABU; UMEZU, 2000), bem como em bovino (LUCCI et al., 2004), ovino (PINTO et al., 2008), coelho (HASEGAWA et al., 2006), suíno (GANDOLFI et al., 2006), cão (ISHIJIMA et al., 2006), rato (FATEHI et al., 2014) e preá (PRAXEDES et al., 2015).

Por outro lado, o EG tem sido amplamente utilizado na criopreservação de tecido ovariano de diversas espécies silvestres, como cutias (WANDERLEY et al., 2012) em decorrência do seu pequeno efeito osmótico, manutenção do tamanho ou volume celular durante a criopreservação. Entretanto, devido ao seu baixo peso molecular e ponto de fusão, sua metabolização origina metabólitos tóxicos como o ácido glicólico e oxalato (CORLEY et al., 2005), sendo seus subprodutos potencialmente tóxicos (CORLEY et al., 2005). Em relação aos outros crioprotetores, possibilita uma maior penetração nas células devido ao seu baixo peso molecular (62,07 g/mol).

Esse crioprotetor tem sido empregado na criopreservação de tecido ovariano de coelho (HASEGAWA et al., 2006), felino (LIMA et al., 2006), ovino (AMORIM et al., 2006) caprino (CELESTINO et al., 2008), humano (HUANG et al., 2008), suíno (BORGES et al., 2009), macaco (SUZUKI et al., 2012), murino (AMORIM et al., 2011) e bovino (LUNARDI et al., 2012).

Em animais silvestres como catetos (*Pecari tajacu*), o uso do EG e do DMSO isolados na vitrificação de tecido ovariano em diferentes concentrações (3 ou 6 M) revelou que tanto o EG (3 M: $80,3 \pm 9,1$; 6 M: $75,3 \pm 3,4$) como o DMSO (3 M: $76,0 \pm 2,5$; 6 M: $72,6 \pm 3,5$) promoveram a preservação da morfologia dos FOPA independente de concentração utilizada (LIMA et al., 2012b).

Dentre os ACPs extracelulares, destaca-se a SAC. Sua função é atuar no aumento da viscosidade da solução de vitrificação, não promovendo alterações nas propriedades da criopreservação por ser utilizada em baixa concentração, além de agir como um tampão osmótico contra o estresse causado durante a adição e remoção do ACP intracelular. São agentes que se ligam aos fosfolipídeos da membrana plasmática

através de ligações de hidrogênio, mantendo assim a integridade celular, auxiliando na desidratação e reduzindo os efeitos tóxicos provocados pelo ACP intracelular na solução de vitrificação (FABBRI et al., 2001).

No entanto, a eficiência dessas substâncias depende do tipo de célula ou tecido a ser criopreservado, tempo de exposição e concentração utilizadas (FULLER, 2004). Para a criopreservação de tecido ovariano pode-se utilizar um crioprotetor isolado ou em associação a outros crioprotetores (RODRIGUES et al., 2004; AMORIM et al., 2006). Em associação, os crioprotetores têm seus efeitos tóxicos equilibrados com a finalidade de reduzir a toxicidade específica de cada crioprotetor individualmente em decorrência do uso de concentrações relativamente baixas (WUSTEMAN et al., 2004), o que pode consequentemente, maior preservação da morfologia e viabilidade celular. Além disso, o uso de crioprotetores associados possui uma permeabilidade maior do que o uso do crioprotetor individual (VICENTE; XIMENEZ, 1994).

Hasegawa et al. (2006), obtiveram duas crias de camundongos após exposição e vitrificação do tecido ovariano, a uma solução de vitrificação contendo 15% de EG e 15% de DMSO. Além disso, a associação de ACPs já foi realizada em espécies como suínos (MONIRUZZAMAN et al., 2009), ovinos (TSURIBE et al., 2009), caprinos (CARVALHO et al., 2014), bovinos (SRIPUNYA et al., 2014), camundongos (LEE et al., 2015; ZHANG et al., 2015) e humanos (LIERMAN et al., 2015).

Assim diferentes estratégias estão sendo utilizadas para minimizar os danos osmóticos e tóxicos, através da aplicação de ACPs menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três ACPs (VAJTA, 2000), fornecendo a célula ou tecido viabilidade após exposição ao processo de criopreservação para aplicação e otimização em outras biotécnicas reprodutivas. A redução da formação de cristais de gelo ou a ausência destes, não elimina a possibilidade da ocorrência de danos de origem tóxica ou osmótica. Fahy (2004) relata que existem três tipos de efeitos tóxicos dos crioprotetores sobre as células. O primeiro é denominado toxicidade específica, que é própria de cada agente crioprotetor e o segundo a toxicidade indireta, mediada pelas alterações na localização da água nas moléculas hidratadas e o último é o da desnaturação das proteínas. Até mesmo, as diferenças estruturais entre as espécies animais são também um fator que pode influenciar na eficácia de um ACP (LUNARDI et al., 2012).

1.3. Métodos de avaliação da morfologia e viabilidade folicular

Após criopreservação de tecido ovariano, diversas técnicas vêm sendo utilizadas para avaliar tanto a morfologia quanto viabilidade folicular ovariana através da manutenção da morfologia folicular (CASTRO et al., 2011; YOUM et al., 2014) e do estroma (BANDEIRA et al., 2015); viabilidade (CASTRO et al., 2011; CARVALHO et al., 2014); proliferação celular (BANDEIRA et al., 2015), capacidade de desenvolvimento *in vitro*, ou até mesmo *in vivo* (SNOW et al., 2001) e detecção de apoptose celular (LIU et al., 2003).

Um método rápido, simples, com baixo custo e mais difundido para avaliar a qualidade folicular é através da histologia clássica que consiste na avaliação da morfologia do citoplasma e do núcleo, e permite, ainda, verificar a ocorrência da ativação folicular, através da observação das mudanças ocorridas na morfologia das células da granulosa (MATOS et al., 2007b), assim como os sinais da atresia (DEMIRCI et al., 2002). Além disso, tem grande relevância por ser um método quantitativo, no qual um grande número de folículos pode ser avaliado (OLIVEIRA, 2013). Contudo, nem sempre pode ser correlacionada com a viabilidade e capacidade de desenvolvimento folicular (MARTINEZ-MADRID et al., 2004).

Nesse contexto, por não estarem correlacionadas e devido a rupturas na membrana plasmática, muitas vezes ocasionada pelo processo de criopreservação, faz-se necessário a avaliação da integridade dessas membranas utilizando corantes vitais como o azul de Trypan ou através de marcadores fluorescentes (MERDASSI et al., 2011; SANFILIPPO et al., 2013), sendo ambos os métodos eficientes na identificação da integridade da membrana (MERDASSI et al., 2011). A coloração com azul de Trypan é um método rápido, de baixo custo, prático e bastante eficiente na identificação de rupturas de membranas plasmáticas, visto que penetra somente em células com membrana rompida. Desde modo como as células mortas tem suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula, fornecendo uma coloração azul. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração o que tem sido muito utilizada para avaliar a viabilidade de folículos ovarianos (SANTOS et al., 2007).

Outro método bastante adotado atualmente é a avaliação do desenvolvimento *in vivo* de FOPAs após criopreservação, através de transplantes. Dentre os tipos de transplantes, pode-se destacar o xenotransplante, caracterizado pela utilização de animais imunosuprimidos como receptores objetivando a obtenção de oócitos maduros aptos para FIV e posterior transferência de embriões (AUBARD, 2003). Esse método, quando realizado com tecidos reprodutivos pode presumir para a contribuição da manutenção do potencial reprodutivo do animal doador e associado à criopreservação, as perspectivas para aplicação desta técnica, vão desde a restauração da fertilidade feminina (DONNEZ et al., 2004) à conservação de animais silvestres em risco de extinção (KIKUCHI et al., 2011; SANTANA et al., 2012).

Assim, a utilização de tecido ovariano criopreservado em xenotransplante visa, principalmente, desenvolver ou aperfeiçoar os protocolos de criopreservação, uma vez que lesões foliculares não detectadas após a descongelação ou aquecimento podem evoluir e serem manifestadas após um período de incubação (OLIVEIRA, 2013). Vários estudos tem sido realizado em diversas espécies como vombats (WOLVEKAMP et al., 2001); marsupiais (MATTISKE et al., 2002); saguis (VON SCHONFELDT V et al., 2011); leoas (WIEDEMANN et al., 2012); babuíños (AMORIM et al., 2013); suínos (KANEKO et al., 2013); ovelhas (BARROS et al., 2014) e humanos (DITTRICH et al., 2015).

Para a avaliação da proliferação celular, utiliza-se a quantificação das regiões organizadoras de nucléolos após coloração com nitrato de prata (Ag-NOR). Estudos realizados por Silva et al. (2003d) demonstraram que a técnica de Ag-NOR detecta o número de regiões organizadoras de nucléolos (NOR) em células da granulosa e que o aumento da quantidade de NOR nessas células é um sinal de proliferação celular. As regiões organizadoras do nucléolo (NOR) são áreas de DNA nucleolares, contendo genes que codificam o RNA ribossomal e devido às proteínas não histonas associadas a essas regiões, apresentam uma alta afinidade por prata. Células em intensa atividade mitótica necessitam produzir ribossomos suficientes para as células filha, isso implica em maior transcrição destes genes e consequentemente, um aumento no número de regiões visualizadas (DERENZINI, 2000). Esse método já foi utilizado em ratas (SILVA et al., 2003); bovino (CASTRO et al, 2014) e em ovino (BANDEIRA et al., 2015).

Desde modo, o desenvolvimento e avanço na biologia celular e molecular tem proporcionado uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos, sendo o TUNEL um método que vem mostrando eficiência na detecção da apoptose celular. Esse método consiste na avaliação da fragmentação do DNA utilizando a enzima terminal deoxinucleotidil transferase (TdT) em secções histológicas, promovendo a detecção do grau de apoptose, bem como a avaliação histológica (PEDERSEN et al., 2003). A coloração do núcleo das células apoptóticas aparece mais escura ou marrom, enquanto que as células normais ficam com uma coloração mais clara (LIU et al., 2003). Esse método já foi utilizado em algumas roedoras como camundongas (LEE et al., 2015; ZHANG et al., 2015) e ratas (DAMOUS et al., 2015) após transplante de tecido ovariano.

3. JUSTIFICATIVA

A cutia (*Dasyprocta leporina*) mesmo com sua população mundial estável, vem apresentando diminuição significativa devido à sua caça predatória e à destruição de seus habitats naturais. Nesse contexto, a criação em cativeiro surge como uma alternativa a sua conservação e multiplicação, bem como favorece uma maior produção comercial de carne, pele, couro e pelos.

Por apresentar pequeno porte, curto período de gestação, fácil manejo e boa adaptação em cativeiro, é considerada um excelente modelo experimental para espécies silvestres como a *Dasyprocta ruatânica* e *Dasyprocta coibae* vulneráveis a extinção, e ainda, para a *Dasyprocta mexicana*, considerada criticamente ameaçada. A adaptação e aperfeiçoamento de técnicas de reprodução assistida poderia tanto elucidar mecanismos relacionados à foliculogênese inicial das cutias, como ainda, contribuir para o aumento do potencial reprodutivo das fêmeas desta espécie e de outras relacionadas a esta, surgindo como uma alternativa para a sua preservação e exploração de seu potencial zootécnico, permitindo, ainda, o desenvolvimento de estudos sobre suas particularidades fisiológicas.

Assim, estudos com o material genético de cutias, através do aperfeiçoamento ou desenvolvimento de protocolos de conservação, como a vitrificação do tecido ovariano são necessários, uma vez que garantem maiores ajustes nos protocolos de criopreservação de espécies silvestres, visando à obtenção de melhores taxas de sobrevivência folicular. A vitrificação é considerada simples, prática e econômica, além de permitir uma rápida conservação do material e, principalmente, por não permitir a formação de cristais de gelo, o que leva, conseqüentemente a morte celular.

Neste sentido, o uso de técnicas histológicas associadas a transplantes, bem como, estudo acerca da fisiologia reprodutiva de cada espécie, podem assumir função primordial no avanço e aprimoramento dos protocolos já desenvolvidos, com reflexos positivos nas taxas de desenvolvimento embrionário. Ainda, o CIV e MIV de oócitos, através do xenotransplante pode ser uma ferramenta para a análise de protocolos de criopreservação, disponibilizando uma maior quantidade de oócitos a serem utilizados em outras biotécnicas reprodutivas como a FIV.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- As concentrações de 3 M e 6 M do dimetilsufóxido (DMSO) e do etilenoglicol (EG), bem como a sua associação em menor concentração (3 M) são eficientes para a manutenção da morfologia e da viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais *in situ* de cutias (*Dasyprocta leporina*) após vitrificação em superfície sólida;
- O xenotransplante de tecido ovariano fresco e vitrificado em camundongas C57Bl/6 SCID é eficiente para promover o desenvolvimento folicular.

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

- Conservar o tecido ovariano de cutias (*Dasyprocta leporina*) através do método de vitrificação em superfície sólida.

5.2. Específicos

- Comparar os efeitos do uso do dimetilsulfoxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) em concentrações de 3M e 6M, e sua associação, na solução de vitrificação sobre a morfologia e viabilidade de folículos ovarianos de cutias;
- Avaliar o desenvolvimento de tecidos ovarianos xenotransplantados de cutias (*Dasyprocta leporina*) em camundongas SCID C57B1/6 antes e após vitrificação em superfície sólida;
- Relacionar os achados de citologia vaginal, mensuração hormonal com as modificações na genitália externa em fêmeas camundongas SCID C57B1/6 após xenotransplante.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals, **Theriogenology**, v.78, p.1653–1665, 2012

ALMEIDA, M.M.; CARVALHO, M.A.M.; CAVALCANTE FILHO, M.F.; MIGLINO, M.A.; MENEZES, D.J.A. Estudo morfológico e morfométrico do ovário de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.55–62, 2003.

AMORIM, C.A.; JACOBS, S.; DEVIREDDY, R.V.; VAN LANGENDONCKT, A.; VANACKER, J.; JAEGER, J.; LUYCKX, V.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.28, n.8, p.2146–56, 2013.

AMORIM, C.A.; CURABA, M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v.23, p.160–186, 2011.

AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; LUCCI, C.M.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v.85, n.1, p.1077–1081, 2006.

ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science** v.99, p.223–243, 2007.

ARAÚJO, V. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.12, n.1, 2014. (DOI: D10.1186/1477-7827-12-78)

AUBARD, Y. Ovarian tissue xenografting. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v.108, p.14–18, 2003.

BEZERRA, L.G.P.; LIMA, G.L.; COSTA, C.Y. M.; CASTELO, T.S.; SOUZA, A.L.P.; SILVA, A.R. Validação de sondas fluorescentes na avaliação da viabilidade de espermatozoides epididimários de cutias (*Dasyprocta azarae*). In: **Anais XX Seminário de Iniciação Científica** – SEMIC, Mossoró-RN, 2014.

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v.5, n.3, p.119–126, 2009.

BANDEIRA, F.T.; CARVALHO, A.A.; CASTRO, S.V.; LIMA, L.F.; VIANA, D.A.; EVANGELISTA, J.; PEREIRA, M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction in domestic animals**, v.50, p.177–185, 2015.

BARROS, F.F.P.C.; TEIXEIRA, P.P.M.; SILVA, M.A.M.; SILVA, A.S.L.; MEDEIROS, R.M.; COELHO, C.M.M.; BANDARRA, M.B.; MACEDO, M.F.;

BEZERRA, M.B.; VICENTE, W.R.R. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.38, n.2, p.121–126, 2014.

BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; ROSATI, I.; ZEDDA, M.T.; LEONI, G.; SUCCU, S.; PAU, S.; LEDDA, S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. **Theriogenology**, v.68, n.8, p.1138–1149, 2007.

BONAUDO, T.; LE PENDU, Y.; FAURE, J.F.; QUANTZ, D. The effects of deforestation on wildlife along the transamazon highway. **European Journal of Wildlife Research**, v.51, n.3, p.199–206, 2005.

BOSSO, P.L. **Zoológico de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.zoologico.sp.gov.br/peca7.htm>>

BOUTELLE, S.; LENAHA, K.; KRISHER, R.; BAUMAN, K.L.; ASA, C.S.; SILBER, S. Vitrification of oocytes from endangered Mexican gray wolves (*Canis lupus baileyi*). **Theriogenology**, v.75, p.647–654, 2011.

BJÖRKMAN, N.; DANTZER, V.; LEISER, R. Comparative placentation in laboratory animals – a review. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**. v.16, p.129–58, 1989.

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

CATZEFLIS, F.; PATTON, J.; PERCEQUILLO, A.; BONVICINO, C.; WEKSLER, M. 2008. **Galea spixii**. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. Disponível em <www.iucnredlist.org> Acessado em 17 de outubro de 2016.

CAMICI, G.G.; STEFFEL, J.; AKHMEDOV, A. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation. **Circulation**, v.114, p.1512–1521, 2006.

CAMPOS, L.B.; PEIXOTO, G.C.X.; LIMA, G.L.; CASTELO, T.S.; SOUZA, A. L.P.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.2, p.188–192, 2015. (DOI: 10.1590/S0100-736X2015000200016).

CASTELO, T.S., SOUZA A.L.P., LIMA G.L., PEIXOTO G.C.X., CAMPOS L.B., OLIVEIRA M.F., SILVA A.R. Interactions among different devices and electrical stimulus on the electroejaculation of captive agoutis (*Dasyprocta leporina*), **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.492–496, 2015.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.; SANTOS, F.W.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P. Frozen and fresh ovarian tissue require

different culture media to promote *in vitro* development of bovine preantral follicles. **Biopreservation and biobanking**, v.12, p.317-324, 2014a.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.; SANTOS, F.W.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P. Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during *in vitro* culture. **Cell and tissue banking**, v.15, p.591–601, 2014b.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; CAMPELLO, C.C.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Freezing solution containing dimethylsulfoxide and fetal calf serum maintains survival and ultrastructure of goat preantral follicles after cryopreservation and *in vitro* culture of ovarian tissue. **Cell Tissue Research**, v.346, p.283–292, 2011.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LOBO, C.H.; SANTOS, F.W.; SANTOS, R.R.; CAMPELLO, C.C.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, v.97, p.140–147, 2014.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.; CASTRO, S.V.; LUZ, H.K.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, A.P. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v.76, p.933–941, 2011.

CARPENTER, R.J.; ANGEL, M.F.; MORGAN, R.F. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. **Otolaryngology - head neck surgery**, v.110, p.228–231, 1994.

CELESTINO, J.J.D.; DOS SANTOS, R.R.; LOPES, C.A.P.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; MELO, M.A.P.; BAO, S.N.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.309–318, 2008.

COSTA, P.M.; MARTINS, C.F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Universitas Ciências da Saúde**, v.6, p.39–55, 2008.

COSTA, A.F.; PEREIRA, A.L.M.; ALMEIDA, K.S. Fauna helmintológica de cutias (*dasyprocta spp.*): implicações para produção comercial – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v.21, 2013.

CORLEY, R.A.; BARTELS, M.J.; CARNEY, E.W.; WEITZ, K.K.; SOELBERG, J.J.; GIES, R.A.; THRALL, K.D. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for ethylene glycol and its metabolite, glycolic acid, in rats and humans. **Toxicological Science**, v.85, p.476–490, 2005.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.E.J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 3-9, 2001.

DAVOODIAN, N.; MESBAH, F.; KAFI, M. Oocyte Ultrastructural Characteristics in Camel (*Camelus dromedarius*) primordial to large antral follicles. **Anatomia Histologia Embryologia**, v.40, p.120–127, 2011.

DAMOUS, L.L.; NAKAMUTA, J.S.; CARVALHO, A.E.T.S.; SOARES JUNIOR, J.M.; SIMÕES, M.J.; KRIEGER, J.E.; BARACAT, E.C. Adipose tissue-derived stem cell therapy in rat cryopreserved ovarian grafts. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, n.57, 2015. (DOI 10.1186/s13287-015-0068-3).

DEMIRCI, B.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing–thawing of ovarian cortex in sheep. **Fertility and Sterility**, v.77, p.595–600, 2002.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v.31, p.117–120, 2000.

DITTRICH, R.; LOTZ L.; FEHM, T.; KREUSSEL, J.; VON WOLFF, M.; TOTH, B.; VAN DER VEN, H.; SCHEURING, A.N.; W€URFEL, W.; HOFFMANN, I.; MATTHIAS, W.; BECKMANN, M.D. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue—a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. **Fertility and Sterility**, v.103, n.6, 2015. (dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.001).

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; MARTINS, N.; CARVALHO, R.A. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (*Capuchin monkeys*). **Theriogenology** v.68, p.1251–1259, 2007.

DOBRINSKY, J.R.; PURSEL, V.G.; LONG, C.R.; JOHNSON, L.A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biology of Reproduction**, v.62, p.564–570, 2000.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The Lancet**, v.364, n.9443, p.1405–1410. 2004.

FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.35, n.1, p.3–15, 2011.

FAUSTINO, L.R.; SANTOS, R.R.; SILVA, C.M.G.; PINTO, L.C.; CELESTINO, J.J.H.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of

primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.90–97, 2010.

FAHY, G. M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v.48, p.22–35, 2004.

FATEHI, R.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSSEINI, M.; FARROKHI, A.; FATHI, R. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. **Theriogenology**, v.15, p.302–8, 2014.

FABBRI, R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. **Cell Tissue Bank**, v.7, p.113–122, 2006.

FERRAZ, M.S.; MENEZES, D.J.A.; PESSOA, G.T.; CABRAL, R.; M ILLERA, M.J.; SILVA, A.R.. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). **Theriogenology**, v.75, p.459, 2011.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.143–152, 2007.

FORTES, E.A.M.; CARVALHO, M.A.M.; ALMEIDA, M.M.; CONDE JÚNIOR, A.M.; CRUZ, N.E.A.; ASSIS NETO, A.C. Aspectos morfológicos da tuba uterina de cutias (*Dasyprocta aguti*, *Mammalia: Rodentia*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.2, p.135–142, 2005.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reprod BioMed Online**, v.9, p.680–91, 2004.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; BERLINGUER, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, MR.; ESESO, M.C.; MERMILLOD, P.; ORTIZ, J.A.; RAMON, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; GARDE, J.J.; SOLER, A.J. Effect of storage temperature during transport of ovaries on *in vitro* embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). **Theriogenology**, v.75, p.65–72, 2011.

GANDOLFI, F.; PAFFONI, A.; PAPASSO-BRAMBILLA, E.; BONETTI, S.; BREVINI, T. A., RAGNI, G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1150–1156, 2006.

GORDON, I. Storage and criopreservation of oocytes and embryos. **In:** GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos, Cambridge: CAB International, Raven Press, p.293–328, 1994.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; IACCARINO, M.; TALEVI, R. Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. **Human Reproduction**, v.26, n.9, p.2452–2460, 2011.

GUIMARÃES, D.A.A.; RAMOS, R.S.L.; GARCIA, G.W.; OHASHI, O.M. The stimulatory effect of male agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) on the onset of female puberty. **Acta Amazônica**, v.39, n.4, p.759–762, 2009.

HAN, X.; MAB, L.; BENSON, J.; BROWN, A.; CRITSER, J.K. Measurement of the apparent diffusivity of ethylene glycol in mouse ovaries through rapid MRI and theoretical investigation of cryoprotectant perfusion procedures. **Cryobiology**, v.58, p.298–302, 2009.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução feminina. **In:** Hafez B, Hafez ESE. Reprodução animal, v.7., p.13–29; 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, p.1182–1192, 2006.

HOSKEN, F.M.; SILVEIRA, A.C. Criação de cutias. Viçosa, MG: **Aprenda fácil**, v.4, p.21-22, 2001.

HOVATTA, O. **Methods for cryopreservation of human ovarian tissue**. Reprod. Biomed. Online 10, 729–734, IUCN - Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Versão 2011.2. Acesso em 08 de junho de 2016. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>.

HUANG, L.L.; MO, Y.Q.; WANG, W.J.; LI, Y.; ZHANG, Q.X.; YANG, D.Z. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v.139, p.193–198, 2008.

HUANG, KY.; GROOT, S.A.; WOELDERS, H.; VAN DER HORSTD, G.T.J.; THEMME A.P.N.; COLENBRANDERA, B.; VAN VLISSINGEN, J.M.F. Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. **Cryobiology**, v.60, n.2, p.129–137, 2010.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBIO). **Seis espécies de mamíferos dotados de casco correm risco de extinção no Brasil**. Disponível em <www.icmbio.org.br> Acesso em: 07 de março de 2015.

ISHIJIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; LEE, D.S.; UETA, Y.Y.; MATSUI, M.; LEE, J.Y.; SUWA, Y.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **The Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.293–299, 2006.

KAISER, S.K.; MARGARIDO T.C.C.; FISCHER, M.L. Avaliação do comportamento de cutias *Dasyprocta azarae* e *Dasyprocta leporina* (Rodentia: *Dasyproctidae*) em cativeiro e semicativeiro em parques urbanos de Curitiba, Paraná, Brasil. **Revista de etologia**, v.10, n.2, p.68–82, 2011.

KAGABU, S.; UMEZU, M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. **Journal of Experimental Animal Science**, v.49, p.17–21, 2000.

KANEKO, H.; NAKAI, M.; TANIHARA, F.; NOGUCHI, J.; KIKUCHI, K. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. **Theriogenology**, v.80, n.8, p.887–892, 2013.

KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; KASHIWAZAKI, N.; KANEKO, H. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. **Animal Science Journal**, v.82, p.495–503, 2011.

KORZ, V.; HENDRICHS, H. Spontaneous behavior and body temperature in male Central American agoutis (*Dasyprocta punctata*) under different social conditions. **Physiology & Behavior**, v.58, n.4, p.761–768, 1995.

KOPEIKA, J.; THORNHILL, A.; KHALAF, Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. **Human Reproduction Update**, v.21, n.2, p.209–227, 2014.

LANGE, R.R.; SCHIMIDT, E.M.S. **Tratado de animais selvagens** Roca, São Paulo, Brasil, . 2007, p.476.

LANGE, R.R. Criação e Relocação de Cutias *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823 (*Dasyproctidae*, *Mammalia*) em Área Verde Urbana, Curitiba-PR. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1998.

LERMEN, D.; BLÖMEKE, B.; BROWNE, R.; CLARKE, A.; DYCE, P.W.; FIXEMER, T.; FUHR, G. R.; HOLT, W.V.; JEWGENOW, K.; LLOYD, R.E.; LÖTTERS, S.; PAULUS, M.; MCGREGOR REID, G.; RAPOPORT, D.H.; RAWSON, D.; RINGLEB, J.; RYDER, O.A.; SPÖRL, G.; SCHMITT, T.; VEITH, M.; MÜLLER, P. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. **Molecular ecology**, v.18, p.1030–1033, 2009.

LEE, J.; KIM, S.K.; YOUM, H.W.; KIM, H. J.; LEE, J.R.; SUH, C. S.; KIM. S.H. Effects of Three Different Types of Antifreeze Proteins on Mouse Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation. **Plos One**, v.1, p.16, 2015. (DOI:10.1371/journal.pone.0126252).

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction**, v.124, p.483–489, 2002.

LIMA, G.L.; LUZ, V.B.; ALVES, A. M.C.V.; LUNARDI, F.O.; SOUZA, A.L.P.; RODRIGUES, A.P.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Vitrification of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) ovarian tissue using various. In: **IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, 2012, Campinas. Proceedings of IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2012.

LIMA, A.K.F.; SILVA, A.R.; SANTOS, R.R.; SALES, D.M.; EVANGELISTA, A.F.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**, v.66, p.1664–1666, 2006.

LIU, Z.H.; YUE, K.Z.; MA, S.F.; SUN, X.S.; TAN, J.H. Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cell apoptosis in the pig. **Theriogenology**, v.59, p.775–785, 2003.

LIERMAN, S.; TILLEMANN, K.; CORNELISSEN, M.; DE VOS, W.H.; WEYERS, S.; T'SJOEN, G.; SUTTER, P. Follicles of various maturation stages react differently to enzymatic isolation: a comparison of different isolation protocols. **Reproductive biomedicine online**, v.30, n.2, p.181–190, 2015.

LOPES, L.H.R.; LUCCI, C.M.; GARCIA, M.P.; AZEVEDO, R.B.; BÁO, S.N. Light Microscopical and Ultrastructural Characterization of Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) ovarian Follicles. **Anatomia, Histologia, Embryologia.**, v.35, p.196–201, 2006.

LOPES, J.B.; CAVALCANTE, R.R.; ALMEIDA, M.M.; CARVALHO, M.A.M.; MOURA, S.G.; Filho, L.A.D.; Conceição, W.L.F. Desempenho de Cutias (*Dasyprocta prymnolopha*) Criadas em Cativeiro do Nascimento até o Desmame em Teresina, Piauí. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.33, n.6, p.2318-2322, 2004.

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.1, 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.

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

LUNARDI, F.O.; ARAÚJO, V.R.; FAUSTINO, L.R.; CARVALHO, A.A.; GONÇALVES, R.F.B.; BASS, C.S.; BÁO, S.N.; NAME, K.P.O.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v.107, p.121–130, 2012.

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, 2007b.

MARTINO, N.A.; DELL'AQUILA, M.E.; CARDONE, R.A.; SOMOSKOI, B.; LACALANDRA, G.M.; CSEH, S. Vitrification preserves chromatin integrity,

bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.27, 2013.

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M. M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFREERE, S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with device a passive cooling. **Fertility and Sterility**, v.82, p.1390–1394, 2004.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.247, p.125–142, 1984.

MATTISKE, D.; SHAW, G.; SHAW, J.M. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. **Reproduction**, v.123, n.1, p.143–153, 2002.

MERDASSI, G.; MAZOYER, C.; GUERIN, JF.; SAAD, A.; SALLE, B.; LONARGE, J. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, p.1–7, 2011.

MIGISHIMA, F.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; SONG, S.Y.; KURAMOCHI, T.; AZUMA, S.; NISHIJIMA, M.; YOKOYAMA, M. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. **Biology Reproduction**, v.68, p.881–887, 2003.

MOAWAD, A.R.; FISHER, P.; ZHU, J.; CHOI, I.; POLGAR, Z.; DINNYES, A.; CAMPBELL, K.H.S. *In vitro* fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage. **Cryobiology**, v.65, n.2, p.139–144, 2012.

MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R.M.; TAKETSURU, H.; MIYANO, T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**, v.72, p.280–288, 2009.

MUKAIDA, T.; OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.26, p.789–803, 2012.

NOGUEIRA, S.S.C.; SÉRGIO NOGUEIRA-FILHO, L.G. Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? **Biodiversity and Conservation**, v.1, p.1-13, 2011. (doi:10.1007/s10531-011-0047-7).

NOWAK, R.M. Order Rodentia. In: Walker's Mammals of the World. v.1. [S.l.]: JHU Press, Paginação irregular. 1999.

OLIVEIRA, F.T.B. **Análise do desenvolvimento de folículos pré-antrais e da matriz extracelular ovariana após vitrificação de tecido ovariano ovino** — 70f.:il. (algumas color.) Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

OLIVEIRA, F.S.; MARTINS, L.L.; CANOLA, J.C.; OLIVEIRA, P.T.; PÉCORA, J.D.; PAULONI, A.P.; Macroscopic description of teeth of Azarae agouti (*Dasyprocta azarae*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.93–95, 2012.

OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.; WOLKERS, W. F.; SIEME, H. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents. **Biology of Reproduction**, v.88, n.3, p.68, 2013.

OTSUKI, S.; QUINA, W.; ISHIHARA, A.; KAE, T. Elucidation of dimethylsulfone metabolism in rat using a 35S radioisotope tracer method. **Nutrition Research**, v.22, p.313–322, 2002.

OSKAM, I.C.; ASADI, B.A.; SANTOS, R.R. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. **Fertility and Sterility**, v.93, p.2764–2766, 2010.

PACHALY, J.R.; LANGE, R.R.; MARGARIDO, T.C.C. Punção venosa em cutias (*Dasyprocta* sp.). **Hora Vet**, v.18A, p.62–64, 1999.

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

PEGG, D.E. Principles of cryopreservation. **In:** DAY, J.G.; STACEY, G.N. (EDS.) Cryopreservation and freeze-drying protocols, 347p. NEW JERSEY: HUMANA PRESS, 39-57p. 2007.

PEDERSEN, H.G.; WATSON, E.D.; TELFER, E.E. Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. **Reproduction**, v.125, p.417–423, 2003.

PINTO, L.C.; SANTOS, R.R.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.; LUZ, V.B.; MAIA JUNIOR, J.E.; SOARES, A.A.; CELESTINO, J.J.H.; MAFEZOLI, J.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Quantification of dimethyl sulfoxide perfusion in sheep ovarian tissue: a predictive parameter for follicular survival to cryopreservation. **Biopreservation and Biobank**, v.6, n.4, p.269–276, 2008.

PUKAZHENTHI, B.S.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.; WILDT, D.E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development** v.18, p.77–90, 2006.

PRAXEDES, É.C.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; APOLINÁRIO, C.A.; BEZERRA, J.A.; SOUZA, A.L.P.; OLIVEIRA, M.F.; RODRIGUES, A.P.; SILVA, A.R. Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population Spix's yellow-toothed caviés (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Reproduction, Fertility and Development**, 2015. (doi.org/10.1071/RD15249).

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Mamíferos do Brasil. **In** Oliveria, J. A. & Bonvicino, C. R., Sobre Ordem *Rodentia*, p.347-399. Londrina, PR, 2006.

RODRIGUES, R.F.; MIGLINO, M.A.; FERRAZ, R.H.S.; MORAIS-PINTO, L. Placentação em cutias (*Dasyprocta aguti*, CARLETON, M.D.): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.133-137, 2003.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÃO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.211–227, 2006.

ROOPCHAND, A. **Wildlife and the Oil Industry**: Catshill Reserve a Case Study. M.Sc. 14 Student project, The Department of Food Production, Faculty of Science and 15 Agriculture, University of the West Indies, St Augustine, Trinidad and Tobago, 2002.

RICHINGS, N.M.; SHAW, G.; TEMPLE-SMITH, P.D.; RENFREE, M.B. Growth and histology of ovarian follicles after cold storage in the tammar wallaby. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, n.6, p.677–88, 2006.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.7–19, 2004.

SANTOS, C.R.; FILHO, H.O.; BARBOSA, O.R.; CARDOZO, R.M.; ARAUJO, D.N.; FORNARI, D.C.; GUARAGNI, M.; FREGADOLLI, R.M. Etologia de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* L. 1766) jovens semiconfinadas no Norte do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum – Animal Sciences**, v.1, n.27, p.163–169, 2005.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Res**, v.327, p.167–176, 2007.

SANTOS, R.R.; AMORIM, C.; CECCONI, S.; FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.; PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.151–163, 2010.

SANTOS, E.A.A.; LIMA, G.L.; SOUSA, P.C.; CORDEIRO, L.S.; BORGES, P.A.C.; SILVA, A.R. Caracterização da população de folículos ovarianos pré-antrais de cutias 47 (*Dasyprocta agouti*) criadas no semi-árido nordestino do Brasil. **Trabalho apresentado no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**, 2012.

SANFILIPPO, S.; CANIS, M.; ROMERO, S.; SION, B.; DÉCHELOTTE, P. Quality and functionality of human ovarian tissue after cryopreservation using an original slow freezing procedure. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.30, p.25–34, 2013.

SANTANA, L.N.; BRITO, A.B.; BRITO, D.C.; LIMA, J.S.; DOMINGUES, S.F.; SANTOS, R.R. Adaptation of a trap door technique for the recovery of ovarian cortical biopsies from *Cebus apella* (capuchin monkey). **Zygote**, v.21, n.2, p.158–161, 2012.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E.A; VELOJERDI, M.R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.78, p.644–5, 2002.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1–19, 2011.

SILVA, A.R.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; PEIXOTO, G.C.X. Conservation of germplasm from wild animals of the Caatinga biome. **Acta Science Veterinary**, v.38, p.373–389, 2010.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SANTOS, E.A.A.; CASTELO, T.S.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders, 468 **Theriogenology**, v.76, p.1084–1089, 2011.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; NASCIMENTO, E.F.; NUNES, V.A.; RIBEIRO, A.F.C. Quantification of the nucleolar organizer regions (NORs) as a parameter to measure proliferation of granulosa cells. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.55, p.551-556, 2003d. (doi:10.1590/S0102-09352003000100019).

SOUZA, P.C.; RAMOS, R.S.L.; GUIMARÃES, D.A.A.; FERREIRA, A.C.S.; BASTOS, L.V.; BATISTA, C.R.; OHASHI O.M. Determinação da população folicular em cutias (*Dasyprocta* sp.) criadas em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.286–287, 2003.

SOLA, M.C. **Manutenção de micro-organismos: conservação e viabilidade**. Seminários aplicados, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás, 2012.

SOUSA, F.C.A.; ALVES, F.R.; FORTES, E.A.M.; FERRAZ, M.S.; MACHADO JÚNIOR, A.A.N.; MENEZES, D.J.A.; CARVALHO, M.A.M. Pregnancy in Hystricomorpha: gestational age and embryonic fetal development of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831) estimated by ultrasonography. **Theriogenology**, v.78, n.6, p.1278–1285, 2012.

SOMFAI, T.; DINNYÉS, A.; SAGE, D.; MAROSÁN, M.; CARNWATH, J.W.; OZAWA, M.; KIKUCHI, K.; NIEMANN, H. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated *in vitro* matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). **Theriogenology**, v.66, n.2, p.415–422, 2006.

SRIPUNYA, N.; LIANG, Y.; PANYAWAI, K.; SRIRATTANA, K.; NGERNSOUNGNERN, A.; NGERNSOUNGNERN, P.; KETUDAT-CAIRNS,

M.; PARNPAI, R. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. **Cryobiology**, v.69, n.3; p.496–9, 2014. (doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.09.001).

SUZUKI, N.; HASHIMOTO, S.; IGARASHI, S.; TAKAE, S.; YAMANAKA, M.; YAMACHI, T.; TAKENOSHITA, M.; HOSOI, Y.; MORIMOTO, Y.; ISHIZUKA, B. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. **Human Reproduction**, v.27, p.2420–2429, 2012.

SNOW, M.; CLEARY, M.; COX, S.L.; SHAW, J.M.; PARIS, M.C.J.; JENKIN, G. Comparison of the effects of in vitro and in situ storage on the viability of mouse ovarian tissue collected after death. **Reproduction Fertility and Development**, v.13, p.389–94, 2001.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v.126, p.663–676, 2006.

TSURIBE, P.M.; GOBBO, C.A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.D. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. **Fertility and Sterility**, v.91, p.1976-1983, 2009.

URBINA, M.; LERNER, J. **Fertilidad y Reproducción Asistida**. Primeira edição. Venezuela: Médica Panamericana C.A, 2008.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocyte and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717–1751, 2005.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v.51, p.53– 8, 1998.

VATJA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.357–364, 2000.

VICENTE, J. S.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. **Theriogenology**, v.42, p.1205–1215, 1994.

VON SCHONFELDT, V.; CHANDOLIA, R.; KIESEL, L.; NIESCHLAG, E.; SCHLATT, S.; SONNTAG, B. Assessment of follicular development in cryopreserved primate ovarian tissue by xenografting: prepubertal tissues are less sensitive to the choice of cryoprotectant. **Reproduction**, v.141, n.4, p.481–490, 2011.

WANDERLEY, L.S.; LUZ, H.K.; FAUSTINO, L.R.; LIMA, I.M.; LOPES, C.A.; SILVA, A.R.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO,

J.R. Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. **Theriogenology**, v.77, n.2, p.260–7, 2012.

WIEDEMANN, C.; HRIBAL, R.; RINGLEB, J.; BERTELSEN, M. F.; RASMUSSEN, K.; ANDERSEN, C. Y.; JEWGENOW, K. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into immunodeficient mouse. **Reproduction Domestic Animal**, v.47, n.6, p.300–4, 2012.

WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. **In:** Ashwood-Smith, M.J.; Farrant, J., editors. Low temperature preservation in medicine and biology. Kent, Pitman Medical; 1980. cap 4, 65–83.

WEIR, B.J.; ROWLANDS, J.W. Functional anatomy of the hystricimorph ovary. **Symposia of the Zoological Society of London.**, v.34, p.303–332, 1974.

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C. M.; MESBAH-KARIMI, N.; HARRIS, S. B.; FAHY, G.M. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v.40, p.228–236, 2000.

WOOD, M.J.; BARROS, C.; CANDY, C.J.; CARROLL, J.; MELENDEZ, J.; WHITTINGHAM, D.G. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. **Biology of reproduction**, v.49, p.489–95, 1993.

WOLVEKAMP, M.C.; CLEARY, M.L.; COX, S.L.; SHAW, J.M.; JENKIN, G.; TROUNSON, A.O. Follicular development in cryopreserved common Wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.135–47, 2001.

WUSTEMAN, M.; ROBINSON, M.; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. **Cryobiology**, v.48, p.179–189, 2004.

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, n.4, p.720–730, 2014.

ZHANG, A.Q.; WANGB, S.; PING-BAO, Y.C.; ZHANG, D.L.; YA-JIE Z.D.; RU-XIN, C.D.; FU, Y.; ZHANG, J. Effects of L-carnitine on follicular survival and graft function following autotransplantation of cryopreserved-thawed ovarian tissues. **Cryobiology**, v.71, p.135–140, 2015.

**CAPÍTULO 1 - Vitrification of agouti (*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823)
ovarian tissue using different cryoprotectants**

Érica Camila Gurgel Praxedes^a; Gabriela Liberalino Lima^b; Andréia Maria da Silva^a;
Lívia Batista Campos^a; Moacir Franco de Oliveira^a; Alexandre Rodrigues Silva^{a*}

Vitrification of agouti (*Dasyprocta leporina*, Lichtenstein, 1823) ovarian tissue using different cryoprotectants

Érica Camila Gurgel Praxedes^a; Gabriela Liberalino Lima^b; Andréia Maria da Silva^a; Livia Batista Campos^a; Moacir Franco de Oliveira^a; Alexandre Rodrigues Silva^{a*}

^a *Laboratory on Animal Germplasm Conservation, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), BR 110, Km 47, Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil.*

^b *Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Roraima, Campus Cauamé, BR-174 KM 12, Monte Cristo, Boa Vista, RR 69300-000, Brazil.*

^c *Department of morphology, Universidade Federal do Ceará – UFC, Rodolfo Teófilo, 60.430-170, Fortaleza, CE.*

*Corresponding author. Tel.: 55 84 33178374; fax: 55 84 33178360.

E-mail address: legio2000@yahoo.com (A.R. Silva).

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of isolate use of dimethylsulfoxide (DMSO) or ethylene glycol (EG) at 3 or 6 M, as well as its association on the morphology and viability of vitrified *in situ* preantral follicles from agoutis *D. leporina*. For this purpose, ovaries were obtained from nine female agoutis. Each ovarian pair was divided into seven fragments, from which one was immediately fixed for histology, constituting the control group, and the remaining fragments were subjected to solid surface vitrification process (SSV), further submitted to the same morphological analyses. Moreover, both fresh and vitrified samples were evaluated for viability by the Trypan blue test and for apoptosis occurrence by TUNEL. A total of 865 FOPAs were analyzed before and after vitrification. At control group it was observed $80.7 \pm 5.21\%$ of morphologically normal PF. After SSV, regardless the ACP used, up to $76.7\% \pm 5.4$ were obtained. At viability analysis, DMSO 3 M, DMSO 6 M, EG 3, EG 6 M (70.0 %, 81.11 %, 76.6 % and 71.11 %, respectively) presented values of viability similar to control group (79.0 %). Only negative TUNEL follicles were found before and after vitrification. In conclusion, in the present study it was possible to preserve PFs included in ovarian tissue of agoutis (*Dasyprocta leporina*) by the solid surface vitrification method using concentrations DMSO 6 M; EG 3 M and their association (3 M DMSO and 3 M EG).

Keywords: Preantral follicles, solid surface vitrification, cryoprotectants, morphology, TUNEL assay

1. Introduction

The agouti (*Dasyprocta* sp.) is a Neotropical rodent found predominantly in South America [1, 2]. The *Dasyprocta leporine*, commonly named red-rumped agouti is one of the 11 agoutis' species comprised into the Caviidae family [3]. This species presents an important role on food chain, being involved in the spread of many plant species [4]. Due to the interest on its meat and the destruction of its habitat, its population has been reduced along the years [5]. In this context, captive breeding programs are important for supporting meat demand, providing an alternative source

of protein for humans, also helping the species preservation [6]. Studies focused on the conservation biology, such as germplasm cryopreservation of red-rumped agouti, would be helpful for the preservation of many threatened species as the *D. ruatanica*, *D. coibae* and *D. mexicana* [1].

In this context, the development and adaptation of assisted reproductive techniques are required [7], being important for the multiplication and preservation of agoutis. However, most of the studies conducted in this species are focused on the males, where promisor results are reported for epididymal sperm collection [8] and cryopreservation [9]. Only recently, Wanderley et al. [10] gave the first step for female germplasm preservation by using a slow freezing procedure for ovarian tissue conservation. Due the possibility of the cryoinjuries caused by such method, mainly by the ice crystal formation [11], some alternatives are required. Thus, the vitrification arises as a viable alternative for ovarian tissue preservation, avoiding the ice crystal formation [12]. It is considered a cheap and practical method that can be conducted under field conditions with no need for special equipment [13]. In recent years, this method has shown satisfactory results for several rodents as mice [14] and cavies (*Galea spixii spixii*) [15].

The choice of the cryoprotectants agents (CPAs) is a critical step for the vitrification efficiency [16], as the toxicity of cryoprotectant is one of the major challenges in cryobiology studies. Among the intracellular CPAs, the dimethyl sulfoxide (DMSO) and the ethylene glycol (EG) are the most used due to their relatively low densities and molecular weights, which allow an efficient perfusion into the tissue [13]. These CPAs have been used for the cryopreservation of ovarian tissue from various rodents as the rat [17], the mouse [18] and the Spix's yellow-toothed cavy [15]. Regarding agoutis, both DMSO and EG were successfully used in a slow freezing protocol for its ovarian tissue preservation [10], but there is no report of their use for ovarian tissue vitrification in this species.

The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of DMSO and EG, used separately or in association, on the morphology, ultrastructure, viability, and apoptosis of *D. leporine* preantral follicles vitrified *in situ*.

2. Materials and methods

The experimental protocols and the animal care procedures used in the present study were approved by the Ethics Committee of Universidad Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) (Opinion no. 23091.005916/2015-74). Unless stated otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

2.1. Animals

The animals used in the present study were part of the population maintained by the Centre of Multiplication of Wild Animals, UFERSA (Mossoró, Brazil; 58100S, 378100W). The climate in this region is a typical semi-arid climate, with an average annual temperature of 27°C. A programmed slaughter is conducted every year for population control and the animals are then allocated for use in different experiments. In the present study, nine sexually mature (2-3 years of age) females of agouti (*Dasyprocta leporina*) were used, weighting 2.42 ± 0.19 kg (minimal 2.21 and maximal 2.70 kg). Before they were euthanatized, the animals were kept in captivity and fed with fruits and balanced ration produced at UFERSA and water *ad libitum*.

2.2. Source and preparation of ovaries

After slaughtering, the ovaries were collected and immediately washed in 70% ethanol, followed by two washes in Minimum Essential Medium (MEM). Finally, the ovaries were transported to the laboratory in MEM plus antibiotics (75mg/L penicillin and 50 mg/L streptomycin) placed in insulated boxes.

2.3. Vitrification of ovarian tissue

For ovarian tissue vitrification, nine ovarian cortex were divided into seven fragments (3 x 3 x 1 mm). One fragment was immediately fixed in Carnoy solution for 12 hours, constituting the control group. The remaining fragments were then individually placed in 1.8 ml plastic tubes containing the vitrification solution (VS) constituted of MEM supplemented with 10 mg/ml fetal bovine serum (FCS), 0.25M

sucrose (SAC) and 3M or 6M ethylene glycol (EG) or dimethylsulfoxide (DMSO), or the combination of both cryoprotectants at 3M each. After exposure in VS for 5 min, samples were dried (using sterile gauze) and placed on an aluminum foil placed on the liquid nitrogen (LN₂) surface for vitrification. Once vitrified, samples were transferred (with nitrogen-cooled forceps) to cryovials for storage in LN₂ at -196°C [19].

After two weeks, samples were warmed at room temperature (~25°C) for 1 min and then immersed in a water bath at 37°C for 5s. The cryoprotectants were removed from the ovarian cortex by three consecutive washes for 5 min in MEM supplemented with 10% FCS and decreasing sucrose concentrations (0.50, 0.25 and 0 M). Finally, samples were fixed in Carnoy solution for 12 hours for subsequent histological processing.

2.4. Morphological evaluation of preantral follicles

2.4.1 Histological evaluation

For morphological examination, after fixation in Carnoy solution for 12 h, the ovarian fragments were dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin wax. Then, the agouti ovarian tissue samples were serially sectioned at 7 µm, mounted on a glass slide, and stained with hematoxylin and eosin and evaluated under a light microscope (×100; Carl Zeiss Optical, Chester, VA, USA). The preantral follicles (PFs) were classified according to their developmental stage as primordial, primary or secondary [20]. Each PF was examined in each section in which it appeared and matched with the same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once, regardless of its size. The morphology of PFs was also evaluated according to the integrity of the oocytes, granulosa cells and basement membrane.

The PFs were also counted and classified as morphologically normal (if they contained an oocyte with a regular shape and uniform cytoplasm, as well as organized layers of granulosa cells) or degenerated (when the oocyte exhibited a pyknotic nucleus and/or ooplasm shrinkage, and the granulosa cell layers became disorganized, detached from the basement membrane and/or included enlarged cells).

To avoid evaluating and counting a follicle more than once, PFs were analyzed only in the sections where the oocyte nucleus was observed [20].

2.5. Viability analysis by Trypan Blue staining

Preantral follicles were isolated from the control and frozen-thawed ovarian fragments using the mechanical method described by Figueiredo et al [21] adapted. For that, four pairs of ovaries were used. The ovaries were divided into eight fragments, one of which was immediately submitted to mechanical isolation for the evaluation of follicular viability using the Trypan Blue (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) while the other fragments were subjected to vitrification protocol as described before.

First, ovaries were sliced and the fragments were placed on a stirrer plus MEM for 10 min. After agitation, solution was filtered in a 500 µm filtration screen and the suspension was centrifuged at 40 g for 10 min. The suspension (90 µL) containing isolated PFs was added of 10 µl of 0.4% Trypan blue and subsequently incubated at room temperature for 5 min. Samples were evaluated under an inverted microscope and classified as viable when the oocyte and <10% of granulosa cells remained without staining or as non- viable when the oocyte and/or >10% of granulosa cells were stained [22].

2.6. TUNEL procedure

The fragmentation of DNA in tissue sections was assessed using the kit DeadEndTMFluorometric TUNEL System, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA, with terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant (rTdT). For immunohistochemistry, the ovarian tissue fragments were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, serially sectioned at 5µm and finally mounted on positively charged poly-L-lysine coated slides (Starfrost, Knittel, Germany). Samples from the control and vitrified groups were cleared and further rehydrated with graded ethanol, fixed in 4% paraformaldehyde and finally stored in phosphate-buffered saline (PBS). After washing, the samples were immersed in

20µg/ml proteinase K at 37°C for 10 min. The slides were incubated in a humidified chamber with 50 µL of TUNEL reaction mixture at 37°C for 60 min in the dark [23].

Negative control sections consisted of omitting the terminal deoxynucleotidyl transferase recombinant enzyme and the samples were mounted with propidium iodide (Sigma, P4170). TUNEL-positive (+) fragmented DNA appeared green owing to the co-localization of PI (red) and fluorescein (green). TUNEL-negative (-), non-fragmented DNA appeared red. All tissue sections were examined and total follicle numbers were recorded, along with the number of TUNEL positive follicles. TUNEL control tissue and vitrified sections were included in all evaluations, according to the manufacturer's recommendations.

2.7. Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using the software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data were subjected to Smirnov-Kolmogorov and Batlett tests to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. The percentages of morphologically normal follicles in the control group and after vitrification were evaluated by ANOVA followed by PLSD Fisher. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$. Follicles were taken as a pool and analyzed by dispersion of frequency with Chi-square test. For all statistical analyses, $P < 0.05$ was considered significant, and results were expressed as mean $\pm$ standard error (SE).

3. Results

3.1. Preantral follicles morphology

The results are shown in table 1. A total of 865 PFs were analyzed (~ 50 per treatment), being 151 from the control group and 713 from the vitrified group. Most PFs from the control group were classified as morphologically normal ($80.7 \pm 5.2\%$). After vitrification, a significant decrease on this parameter was observed ($44 \pm 4.5\%$) when DMSO 3M was used ($P < 0.05$). Moreover, the use of EG 6 M ($60.0 \pm 19.0 \%$)

and DMSO 3 M ($66.9 \pm 11.7 \%$) also decreased the percentage of morphologically normal primary follicles in comparison to control group ($P < 0.05$). Among treatments, a significant reduction of morphologically normal primary follicles was observed when EG 6M ($60.0 \pm 19.0\%$) was used in comparison of DMSO 6 M ($88.7 \pm 7.4 \%$).

Table 1

Percentage (normal/total) of morphologically normal ovarian preantral follicles from agouti (*Dasyprocta leporina*) from control and after solid surface vitrification (SSV) using 3 or 6M of dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) or combination (DMSO and EG)

Follicle category	Control	EG		DMSO		EG+DMSO
		3M	6M	3M	6M	6M
Primordial	81.7 ± 5.3^{aA} (97/119)	75.5 ± 6.4^{aA} (91/122)	56.9 ± 7.0^{abA} (65/120)	38.3 ± 5.9^{bA} (48/120)	49.3 ± 10.3^{abA} (52/94)	76.9 ± 4.3^{abA} (68/88)
Primary	91.3 ± 8.8^{aA} (24/31)	75.1 ± 10.7^{abcA} (24/33)	60.0 ± 19.0^{cA} (21/30)	66.9 ± 11.7^{bcB} (23/35)	88.7 ± 7.4^{abA} (31/39)	77.1 ± 15.8^{abcA} (23/32)
Secondary*	100 (1/1)	100 (1/1)	-	-	-	-
Total	80.7 ± 5.21^a (121/151)	73.3 ± 4.9^{ab} (115/155)	61.3 ± 9.6^{ab} (89/150)	44 ± 4.5^b (71/155)	55.3 ± 11.8^{ab} (83/133)	76.7 ± 5.4^a (91/120)

^{a, b, c} Within a row, means without a common superscript differed ($P < 0.05$);

^{A, B} Within a column, it means without a common superscript differ ($P < 0.05$);

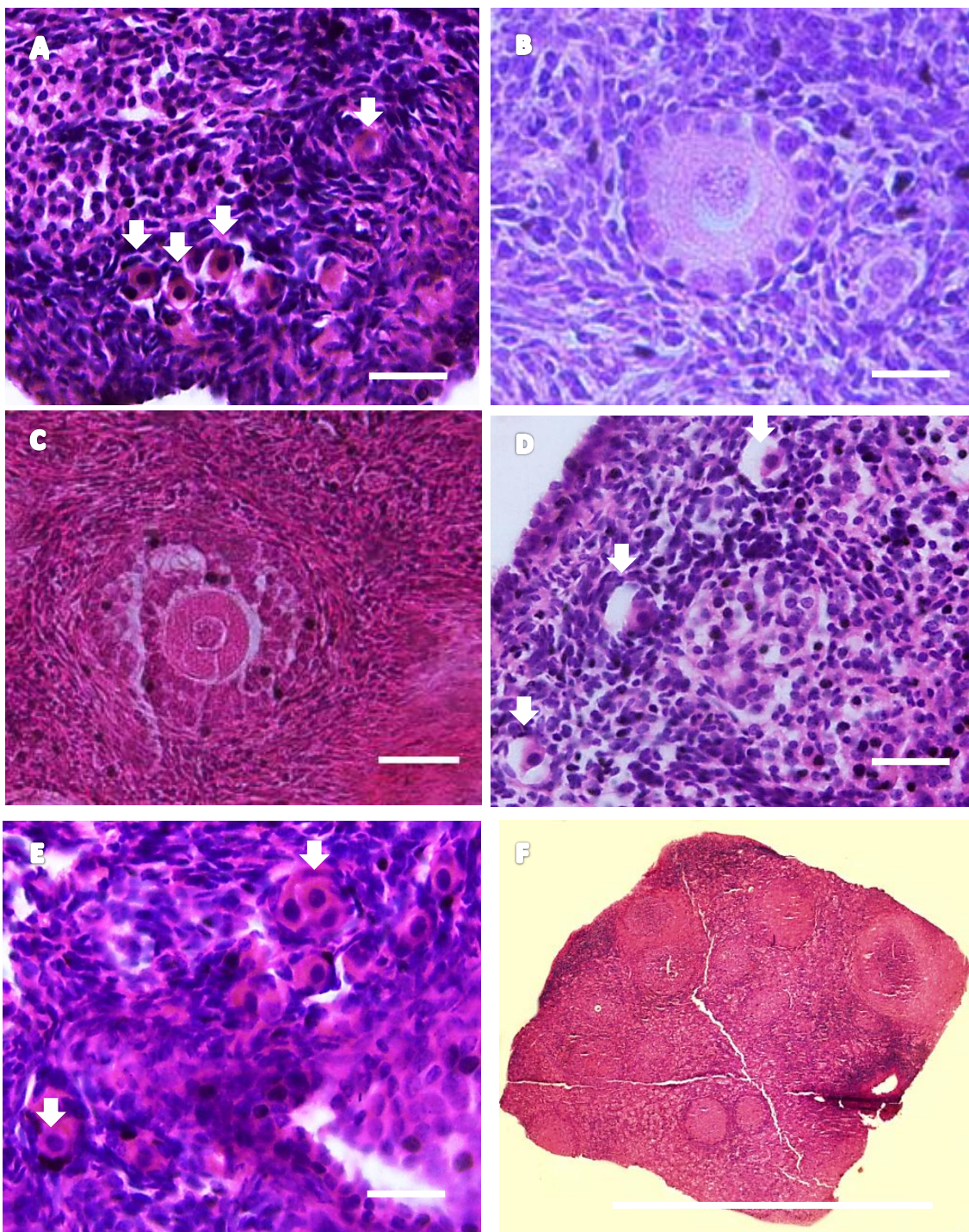
*It was not possible to apply a statistic test because it was not found that follicular class.

The PFs showed morphologically normal spherical oocyte, with the nuclei occupying most of the cytoplasm and positioned centrally or eccentrically in the oocyte. The granulosa cells were well organized around the oocyte, forming concentric layers. These features were found in normal PFs from both control (Figure 1A and 1B) and vitrified groups (Figure 1C), regardless of the cryoprotectant used. After the vitrification process, the main changes observed were the oocyte retraction, detachment of granulosa cells from the basement membrane and pyknotic oocyte nuclei (Figure 1D) in all treated groups, however, was evidenced in the DMSO 3M group. We verified the presence of some polyovular follicles in both the control and

vitrified groups. The presence of corpora lutea, occupying almost all the ovary area, was determined in most ovaries (Figure 1E and 1F).

Figure 1

Histological characteristics from agouti (*Dasyprocta leporina*) before (A and B) and after solid surface vitrification (C and D). (A) Aggregates of primordial (arrows), (B) primary follicle, (C) secondary follicle (D) atretic follicles (arrows) (E) polyovular follicles (arrows); (F) accessory corporea lutea (arrows). Scale bar: 100µm



3.2. Preantral follicles viability

The percentage of viable preantral follicles (Table 2) was among fresh control group and those using isolated CPAs, regardless of the concentration used ($P>0.05$). Furthermore, the DMSO+EG association even differing ($P<0.05$) from the control group, was able to maintain 59% of follicular viability.

Table 2

Percentage (viable/total) of viable ovarian preantral follicles from agouti (*Dasyprocta leporina*) from control and after solid surface vitrification (SSV) using 3 or 6 M of dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) or association (DMSO and EG)

Treatments	% Viable
Control	79.00% (49/60) ^a
DMSO 3 M	70.00(34/60) ^{ab}
DMSO 6 M	81.11(44/60) ^a
EG 3M	76.66(46/60) ^a
EG 6 M	71.11(45/60) ^{ab}
EG+DMSO	59.00(34/60) ^b

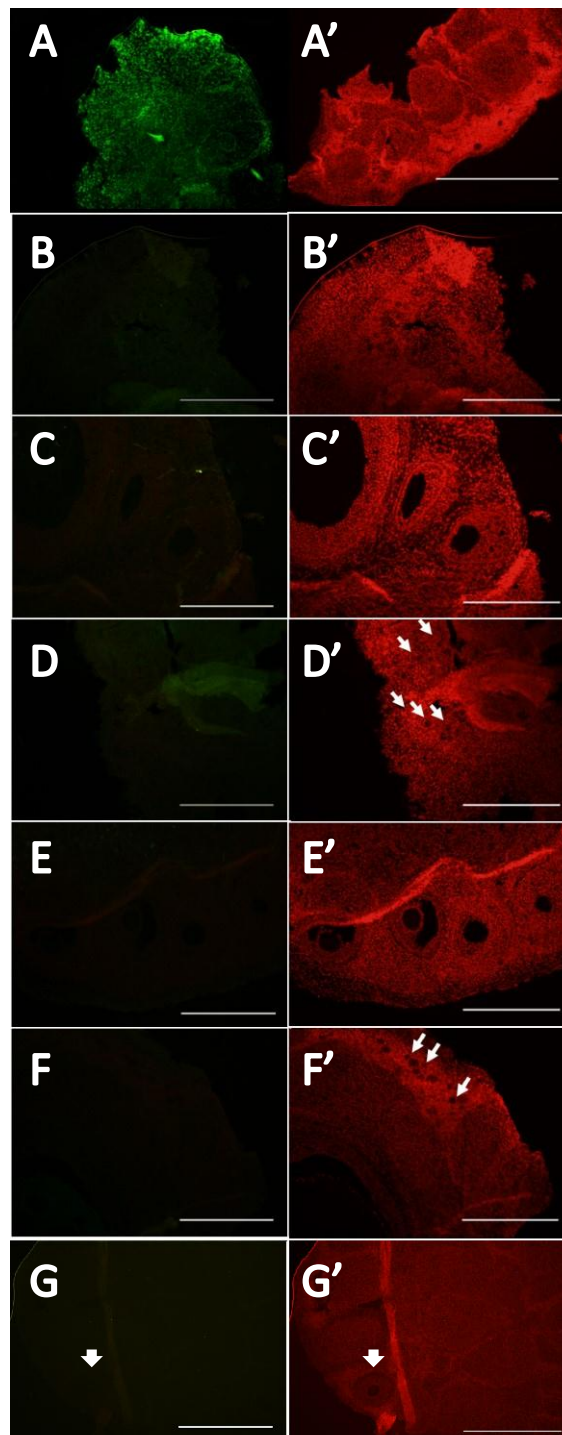
a,b – at the same column different superscript denotes significant differences ($P < 0.05$).

3.3. Analysis of ovarian tissue apoptosis

Only follicles with visible oocyte nuclei were analyzed. None of the negative controls marked with TUNEL technique showed any immunoreactivity, while signal-positive TUNEL marked was observed in the positive controls (Figure 2A). The healthy (primordial, primary and secondary) follicles were determined as TUNEL negative for both the control group (Figure 2B) and vitrified groups (Figure 2C; 2D; 2E). TUNEL-positive signals, which would indicate fragmented nuclei of granulosa cells in degenerate follicles, were not observed in the present study.

Figure 2

Detection of apoptosis occurrence in agoutis' (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue using TUNEL assay. A cortex without counter staining (A - left) and with propidium iodide staining (A' - right) in the control group (B and B') and vitrification group: DMSO 3M (C and C'), DMSO 6M (D and D'), EG 3M (E and E'), EG 6M (F and F'), DMSO and EG (G and G'). Arrows: primordial follicles; arrowheads: primary follicles. Scale bar: 20µm



4. Discussion

The present study is the first to describe the process of cryopreservation by solid surface vitrification method (SSV) of red-rumped agouti (*D. leporina*) ovarian tissue. In addition, it was the pioneer to verify the effects of different concentrations of CPAs used isolate or in association on the morphological aspects of preantral follicles, their viability and the incidence of apoptosis after vitrification.

In the current study, it was possible to preserve up to 76.7% (± 5.4) of preantral follicle morphology after SSV, which represents a significant progress for agoutis' germplasm preservation. In a previous study, when the slow freezing process was applied, only 64.0% PFs morphology was preserved [10], which could highlight the advantages of SSV process when compared to slow freezing. In fact, the SSV has been successfully applied for ovarian tissue preservation in many species, as mice [17], wild rodents as the *Galea spixii spixii* [15]) and caprine [19, 24].

Among the advantages of using the SSV, it can be pointed out the rapid cooling of sample, due the use of a metal as a heat conductor [25]. This method has low costs and practicality, since an aluminum foil can be used as a metal surface [26]. Moreover, the use of a programmable freezer is dispensable, making possible the conduction of the process under field conditions [27]. Additionally, it avoids intracellular ice crystal formation [28] which could explain the promising results observed at present study.

The exposure of agoutis' ovarian fragments to DMSO 3M was insufficient to provide an efficient preservation of PFs morphology when compared to control group. Probably, the DMSO low concentration (3M) would take a longer time for total tissue perfusion due to its higher density (1.1 g/cm^3) and molecular weight (78.13 g/mol) when compared to EG (density: 1.1132 g/cm^3 ; molecular weight: 62.07 g/mol), for example [29,30]. This characteristic was probably overtaken when it was used in association with EG, in which a higher percentage of morphologically normal PFs was found in comparison to the use of DMSO 3 M isolate.

The use of EG 6 M induced a significant decrease on the morphology of primary PFs when compared to control group and to DMSO at same concentration. Although the EG presented favorable effects for total PFs, it was previously reported that the glycolic acid resulted from its metabolism leads to the intracellular acidification.

Depending on the quantity of the EG, the glycolic acid formed could exceed the cell buffering ability causing the pH reduction and, consequently, resulting in cell acidosis [31]. Choi et al. [32] reported a major resistance of primordial follicle to cryodamage in mice vitrified ovarian tissues when compared to other PFs categories. In addition, the primordial follicles present more potential to repair organelles' sublethal damage during their growing phase [33]. In this sense, some studies report the high toxicity of EG when compared to DMSO [34], being suggested that CPAs association would increase PFs preservation as reported for many species as rabbit [35], rat [30] and mouse [36].

The use of DMSO associated to EG provided a more effective agoutis' PFs morphology preservation when compared to isolate use of DMSO 3M. In fact, studies conducted in mice by Ghavami et al. [37] revealed that the association between EG and DMSO was more efficient on follicles morphology preservation than the isolate use of such CPAs for vitrification. Therefore, the CPAs association seems to be most effective alternative for the preservation of follicular morphology, once it promoted enough penetration into cells, thus avoiding the intracellular ice formation, and reducing the osmotic stress [37].

It is important to highlight that even the isolate use of DMSO 3 M or EG 6 M preserved more than 40% or 60% of morphologically normal agoutis' PFs, respectively. Therefore, it still represents the conservation of a large number of ovarian follicles, since the follicular population in this agouti's species was estimated in 4419.8 ± 532.26 and 5397.52 ± 574.91 PFs for the right and left ovaries, respectively [38].

In contrast to morphological analysis, when the samples vitrified in the use of CPAs association were analyzed for follicular viability, a significant reduction in the percentage of viable follicles (59%) compared to control group (79%), DMSO 6 M (81%) and EG 3 M (76%) was verified. Such result could be attributed to the DMSO property of inducing and expanding the phospholipid bilayer and increasing fluidity of hydrophobic core [39]. This way, DMSO could have promoted an accentuated diffusion of the EG into the oocyte membrane, leading to an excessive cell dehydration when a high concentration was used. Since the use of CPAs association was not efficient enough for the preservation of follicular viability, studies focused on

other CPAs concentrations are suggested. In addition, the use of more specific fluorescent markers as calcein [40], *Hoescht* [41] and propidium iodide [42] could be adopted for the analysis of follicular viability, applying more accurate analysis on the structural integrity of cellular components.

The TUNEL staining was used to identify apoptosis through the identification of DNA fragmentation [43], thus allowing the quantification of PFs health. For agoutis, the success of ovarian tissue vitrification was confirmed by the absence of apoptotic cells in the control group and after SSV process. Similar results were obtained after the vitrification of ovarian tissue from bovine [44] and human [45]. This result suggests that cryoinjuries induced by the vitrification method occur mainly in cell membranes and cytoplasmic organelles, thus preserving the nuclear compartment [46]. In this context, studies have shown that a high rate of apoptotic cells is directly related to low rates of embryonic development [47]. Moreover, Bedaiwy and Hussein [23] proposed that the combination of morphology analysis and TUNEL is a useful strategy for the detection of apoptotic ovarian tissue, providing accurate information when transplants are conducted. Actually, the damages caused by the cryoinjuries observed in the present work may be related to aspects of necrosis instead of apoptosis, as it was evidenced by the absence of TUNEL label. In fact, the necrotic cells do not maintain the integrity of the plasma membrane in consequence to the progressive action of enzymes [48]. Consequently, for the improvement of cryopreservation protocols, the elucidation of species-specific variations found in the gametes physiology of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*), as well as other wild and domestic species, are necessary.

In conclusion, the present study showed that solid surface vitrification is a promising method to conserve the female germplasm from *D. leporina*. Although all the CPA promoted great maintenance of DNA integrity, based on morphology and viability analysis, it is recommended the use of DMSO 6M, EG 3M or the association of DMSO 3M and EG 3M for the vitrification of red-rumped agouti ovarian tissue. Besides more studies must be carried out in order to improve the vitrification protocols, the present work represents a great alternative and improvement for the female germplasm preservation in order to form female germplasm banking in such species.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Authors' contributions

E.C.G. Praxedes; G.L. Lima; A.M. Silva; L.B. Campos; R.M.P. A.R. Silva* performed the experiment and collected the data generated. All authors contributed to analysis, interpretation of the result and writing of the paper

Acknowledgements

CNPq (Process N ° 407302/2013-1) supported this research. The authors would like to thank Dr. MF Oliveira from the CEMAS/UFERSA for providing the animals used in the experiments.

References

- [1] Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. In Oliveria JA, Bonvicino CR. Sobre Ordem *Rodentia*. Londrina PR: 2006;347–399.
- [2] Kaiser SK, Margarido TCC, Fischer ML. Avaliação do comportamento de cutias *Dasyprocta azarae* e *Dasyprocta leporina* (Rodentia: *Dasyproctidae*) em cativeiro e semicativeiro em parques urbanos de Curitiba, Paraná, Brasil. Rev etol 2011;10:68–82.
- [3] IUCN. Red list of threatened animals. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, <http://www.iucnredlist.org> 2011 [accessed 26.11.16].
- [4] Fontana CS, Bencke GA, Reis RE. Livro vermelho de fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Edipucrs; 2003;632.
- [5] Hosken FM, Silveira AC. Criação de cutias. Viçosa MG: Aprenda fácil; 2001;4:21–22.

- [6] Nogueira Filho SLG, Nogueira SSC. Criação comercial de animais silvestres: produção e comercialização da carne e subprodutos na região sudeste do Brasil. *Rev Econ Nordeste* 2000;1(2):188–195.
- [7] Silva AR, Souza ALP, Santos EAA, Lima GL, Peixoto GCX, Souza PC, et al. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. *Ci Anim* 2012;22(1):219–234.
- [8] Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology* 2011;76:1084–1089.
- [9] Castelo TS, Silva AM, Bezerra LGP, Costa CYM, Lago AEA, Bezerra JAB, et al. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta leporina*). *Cryobiology* 2015;71:442–447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.09.005>.
- [10] Wanderley LS, Luz HK, Faustino LR, Lima IM, Lopes CA, Silva AR, et al. Ultrastructural features of agouti (*Dasiprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. *Theriogenology* 2012;15:77(2):260–7.
- [11] Wiedemann C, Hribal R, Ringleb J, Bertelsen MF, Rasmussen K, Andersen CY, et al. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reprod Domest Anim* 2012;47:300–304.
- [12] Bandeira FT, Carvalho AA, Castro SV, Lima LF, Viana DA, Evangelista J, et al. Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. *Reprod Domest Anim* 2015;50:177–185.
- [13] Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;23:160–186.
- [14] Sadr SZ, Ebrahimi B, Shahhoseini M, Fatehi R, Favaedi R. Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. *Eur J Obstet Gyn R B* 2015;194:206–211.

- [15] Praxedes ÉCG, Lima GL, Silva AM, Apolinário CA, Bezerra JA, Souza AL, et al. Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population Spix's yellow-toothed caviar (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Reprod Fertil Dev* 2015. <http://dx.doi.org/10.1071/RD15249>.
- [16] Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla J. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008;90:1480–86.
- [17] Fatehi R, Ebrahimi B, Shahhosseini M, Farrokhi A, Fathi R. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. *Theriogenology* 2014;15:302–8.
- [18] Mathias FJ, Souza FD, Uppangala S, Salian SR, Kalthur G, Adiga SK. Ovarian tissue vitrification is more efficient than slow freezing in protecting oocyte and granulosa cell DNA integrity. *Syst Biol Reprod Med Early Online* 2014; 60(6):317–22. <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2014.923542>.
- [19] Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lopes CA, Santos RR, et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC). *Anim Reprod Sci* 2013;138:220–7.
- [20] Silva JRV, Van DHR, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, et al. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci* 2008;81:273–286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.09.006>
- [21] Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van Den Hurk R. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* 1993;40:789–799.
- [22] Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JRV, et al. Effect in the interval sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 1999;56:39–49.
- [23] Bedaiwy and Hussein. Histological evaluation and *in situ* localization of apoptosis in fresh and cryopreserved ovarian tissue. *Middle East Fertil Soc J* 2004; 9(2): 1110-5690.
- [24] Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Luz HKM, Rossetto R, et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of

preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology* 2011;76:933–941.

[25] Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification; *Theriogenology* 2007;67:238–248.

[26] Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage, J, et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Ani Reprod Sci* 2010;122:151–163.

[27] Santos RR, Celestino JJH, Lopes CAP, Melo MAP, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Rev Bras Reprod Anim* 2008;32:9–15.

[28] Mukaida T, Oka C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Pract Res Cl Ob* 2012;26:789–803.

[29] Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Costa SHF, Gonçalves PBD, Figueiredo JR. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology* 2003;60:735–742.

[30] Fathi R, Valojerdi MR, Salehnia M. Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification of whole rat ovary. *CryoLetters* 2013;34(3):228–238.

[31] Carney E. Ethylene glycol developmental toxicity: unraveling the roles of glycolic acid and metabolic acidosis. *Toxicol Sci* 1999;50:117–126.

[32] Choi WJ, Yeo HJ, Shin JK, Lee SA, Lee JH, Paik WY. Effect of vitrification method on survivability, follicular growth and ovulation of preantral follicles in mice. *J Obstet Gynaecol Res* 2007;33(2):128–33.

[33] Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 2004;82:679–85.

[34] Aye M, Giorgio C, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, Ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1905–1912.

[35] Neto V, Samuel BDVM, Jacqueline LM.D, Bottollier B, Pierre Guérin DVM, Joly T. Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of

- preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertil Steril* 2008;89(5):1348–1356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.046>.
- [36] Lee J, Kim SK, Youm HW, Kim HJ, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Effects of Three Different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Plos One* 2015;10:15. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126252>.
- [37] Ghavami M, Mohammadnejad D, Beheshti R, Solmani-rad J, Abedelahi A. Ultrastructural and Morphological Changes of Mouse Ovarian Tissues Following Direct Cover Vitrification with Different Cryoprotectants. *J Reprod Infertil* 2015;16(3):138–147.
- [38] Santos EAA, Lima GL, Sousa PC, Cordeiro LS, Borges PAC, Silva AR. Caracterização da população de folículos ovarianos pré-antrais de cutias (*Dasyprocta agouti*) criadas no Semi-Árido nordestino do Brasil. Trabalho apresentado no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal 2012.
- [39] Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J Phys Chem* 2007;111:453–460.
- [40] Van Den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T, Ralph JH, Schotanus K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod* 1998;4:833–841.
- [41] Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Bol Biotechnol* 2001;77:32–40.
- [42] Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2000;63:27–39.
- [43] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493–501.
- [44] Mouttham L, Fortune JE, Comizzoli P. Damage to fetal bovine ovarian tissue caused by cryoprotectants exposure and vitrification is mitigated during tissue culture. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1239–1250. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-015-0543-x>.
- [45] Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, Pasquinelli G, Paradisi R, Battaglia C, et al. Good Preservation of Stromal Cells and No Apoptosis in Human Ovarian Tissue after Vitrification. *Biomed Res Int* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/673537>.

- [46] Sheikhi M, Hultenby K, Niklasson BRNM, Lundqvist M, Hovatta O. Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectants. *Fertil Steril* 2013;100(1):170–7. <http://dx.doi.10.1016/j.fertnstert.2013.03.018>.
- [47] Oosterhuis GJ, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 1998;70:747–9.
- [48] Salvetti N, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:68. <http://dx.doi.10.1186/1477-7827-7-68>.

CAPÍTULO 2 - Development of fresh and vitrified agoutis' ovarian tissue after xenograft to SCID mice

Érica Camila Gurgel Praxedes¹; Gabriela Liberalino Lima²; Luana Grazielle Pereira Bezerra¹; Fernanda Araujo dos Santos³; Marcelo Barbosa Bezerra³; Denise Damasceno Guerreiro⁴; Ana Paula Ribeiro Rodrigues⁴; Sheyla Farhayldes Souza Domingues⁵; Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

Artigo submetido à Revista Reproduction, fertility and development

**Development of fresh and vitrified agoutis' ovarian tissue after xenograft to
SCID mice**

Xenografting of agoutis' ovarian tissue

Érica Camila Gurgel Praxedes¹; Gabriela Liberalino Lima²; Luana Grazielle Pereira Bezerra¹; Fernanda Araujo dos Santos³; Marcelo Barbosa Bezerra³; Denise Damasceno Guerreiro⁴; Ana Paula Ribeiro Rodrigues⁴; Sheyla Farhayldes Souza Domingues⁵; Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), BR 110, Km 47, Costa e Silva, 59625-900, Mossoró, RN, Brazil.

²Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Roraima, Campus Cauamé, Brazil.

³Laboratory of Gonadal Transplantation and *in vitro* Embryo Production, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

⁴Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculdade de Veterinária, Universidade do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

⁵Laboratory of Amazon Wild Animals Biology and Medicine, Universidade Federal do Pará (UFPA), Castanhal, PA, Brazil.

^{1*}Corresponding author. E-mail: legio2000@yahoo.com

Abstract. The objective was to evaluate the development of fresh and vitrified agoutis' ovarian tissue after xenografting to C57Bl/6 SCID female mice. Ovaries were obtained from five female agoutis and divided into 16 fragments. Five fragments were immediately transplanted to SCID mice and the others were vitrified and transplanted only after rewarming. Transplantation was performed under the renal capsule of the recipients. Recipients' ovarian activity return was monitored by observation of external estrus signs and vaginal cytology during 40 days, when the grafts were removed and evaluated for morphology, cell proliferation and apoptosis occurrence. As the main results, we verified that 4/5 mice that received agoutis' fresh ovarian tissue and 1/6 that received vitrified tissue returned to ovarian activity at 20.6 ± 8.6 days after the xenotransplantation. After graft removal, a predominance of primordial and primary follicles was observed in all the grafts. However, vitrification provoked a reduction in cell proliferation and increased the apoptosis occurrence in grafted agoutis' ovarian tissue. In conclusion, we demonstrated that xenografted agoutis' ovarian tissue, as fresh or vitrified, is able to promote the ovarian activity return in SCID C57B1/6 mice. However, the improvement of vitrification protocols for agoutis' ovarian tissue is suggested.

Keywords: wildlife, hystricognath, rodent, xenotransplantation, preantral follicles.

INTRODUCTION

The agouti (*Dasyprocta leporine* Lichteinstein, 1823) is a Neotropical hystricomorphic rodent of the Caviidae family. It presents an important ecological function on the dynamics of plant and animal populations (Fontana et al. 2003). Due to the interest on its meat and the destruction of its habitat, its population has been reduced along the years, although they are not under imminent risk of extinction (IUCN, 2017). In this context, captive breeding programs are important not only for providing an alternative source of protein for local communities, but also for preserving the species (Nogueira & Nogueira-Filho, 2011). Besides, conservative studies conducted in a non-threatened agouti species as *D. leporine* could be extrapolated for those endangered ones (Pukazhenthil et al. 2006) as *D. ruatanica*, *D. coibae* and *D. mexicana* (IUCN, 2017).

Captive breeding programs can be benefited from assisted reproduction techniques, which can be applied for recovering and conserving the genetic material from both wild and domestic animals (Stoops et al. 2011). Among them, artificial insemination, *in vitro* fertilization, embryo transfer, gamete and embryo cryopreservation, as well as xenotransplantation of gonadal tissues, can be highlighted (Donnez et al. 2015). The germplasm banking stands out to prevent the total extinction of vulnerable and critically endangered species, providing an effective means for germ cell storage and fertility preservation (Motohashi & Ishibashi, 2016).

The association of ovarian tissue cryopreservation and grafting is a target of many studies (Wiedemann et al. 2012; Lee et al. 2015; Damous et al. 2015; Damásio et al. 2016), once it can revive fertility (Tahaei et al. 2015). Grafts are a tool to measure the survival of tissue after cryopreservation and for obtaining knowledge on follicular dynamics of various species. It should be mentioned that studies directed to the cryopreserved ovarian tissue transplant aim to develop or improve cryopreservation protocols (Scalercio et al. 2015). After cryopreservation, oocytes can be used for other assisted techniques as *in vitro* maturation (MIV), transplantation, or a combination of both techniques. These factors allows xenografting an attractive technique for animal assisted reproduction (Snow et al. 2001).

Several studies combining tissue cryopreservation and transplants have been recently reported for several species such as marmosets (Von Schonfeldt et al. 2011), lionesses (Wiedemann et al. 2012), baboons (Amorim et al. 2013), pigs (Kaneko et al. 2013), sheep (Barros et al. 2014) and humans (Dittrich et al. 2015). For agoutis, the combination of these techniques could also be useful for promoting germplasm conservation and multiplication, especially for those genetically valuable. Thus, the aim of this study was to evaluate the development of fresh and vitrified agoutis' ovarian tissue after xenograft to severe combined immunodeficiency (SCID) female mice.

MATERIAL AND METHODS

The Ethics Committee of UFERSA (Opinion no. 23091.005916/2015-74) approved the experimental protocols and the animal care procedures used in the

present study. Unless stated otherwise, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

Ovary donors – the agoutis

The agoutis used in the present study were part of the population maintained by the Centre of Wild Animals Multiplication, UFERSA (Mossoró, Brazil; 58100S, 378100W). The climate in this region is a typical semi-arid climate, with an average annual temperature of 27°C. A programmed slaughter is conducted every year for population control and the animals are then allocated for use in different experiments.

For the present study, five sexually mature (2-3 years of age) females of agouti (*Dasyprocta leporina*), weighting 2.42 ± 0.19 (minimal 2.21 and maximal 2.70 kg), were used as ovary donors. Before they were euthanatized, the animals were kept in captivity and fed with fruits and balanced ration produced at UFERSA and water *ad libitum*.

The females were anesthetized (Ketamine and Xylazine IV, 1 mg/kg each), and subjected to an intracardiac administration of potassium chloride (1Ml/kg) (Castelo et al. 2015). After euthanasia, the ovaries were collected and immediately washed in 70% ethanol, followed by two washes in Minimum Essential Medium (MEM). Finally, the ovaries were transported to the laboratory in MEM plus antibiotics (75 mg/L penicillin and 50 mg/L streptomycin) placed in insulated boxes at 27°C. In the laboratory, each ovarian pair was divided into 16 fragments. One fragment was immediately fixed in 4% paraformaldehyde solution during 12 h for subsequent histological analysis consisting on the fresh control group. The other fragments were destined to immediate xenografting or to vitrification then followed by xenografting.

Recipients – the SCID mice

Twelve immunodeficient C57BL/6 female SCID mice with assured sexual maturity (60 days) and reproductive cyclicity were used. All the animals were kept on shelves with mini-isolators designed to operate at a positive pressure at 22°C under a 14:10 h (light: dark) photoperiod. They were fed and watered *ad libitum* with autoclaved sunflower seeds and filtered water, respectively. Mice were manipulated

under aseptic conditions in a laminar airflow and daily monitored for possible changes in behavior or health (Santos et al. 2016).

Experimental design

After recovered, the agoutis' ovarian fragments were randomly distributed for four groups: fresh control group; vitrified control group; xeno-fresh group and xeno-vitrified group. For transplantation, each mouse received five fragments (1 mm^3) of fresh control and vitrified samples, which were implanted under its renal capsule. Five days after surgery, mice were monitored for any reproductive manifestation by observation of external estrus signs and vaginal cytology. After 40 days, the blood collection was conducted for estrogen measurements and the agoutis' ovarian tissue fragments, which were adhered to the mice' kidney, were recovered. The transplanted and non-transplanted samples were analyzed for gross and microscopic morphology, cell proliferation and occurrence of apoptosis.

Vitrification of agoutis' ovarian tissue

Fragments ($3 \times 3 \times 1\text{ mm}$) of agoutis' ovarian tissue were individually placed in 1.8 mL plastic tubes containing the vitrification solution (VS) constituted of MEM supplemented with 10 mg/mL fetal bovine serum (FCS), 0.25 M sucrose (SUC) and added of 3.0 M dimethylsulfoxide (DMSO) plus 3.0 M ethylene glycol (EG) as cryoprotectant agents (CPAs). After exposure to VS for 5 min, samples were dried (using a sterile gauze) and placed on an aluminum foil placed on the liquid nitrogen (LN_2) surface for vitrification. Once vitrified, samples were transferred (with nitrogen-cooled forceps) to cryovials for storage in LN_2 (Carvalho et al. 2013).

On the day of transplantation, the samples were warmed at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) for 1 min and then immersed in a water bath at 37°C for 5 s. The CPAs were removed from the ovarian fragments by three consecutive washes (for 5 min each) in MEM supplemented with 10% FCS and decreasing sucrose concentrations (0.50, 0.25 and 0 M).

Xenografting procedure

For this stage of the experiment, twelve sexually mature females of SCID strain C57BL/6 mice were used as recipients. All SCID females were submitted to prior bilateral ovariectomy, aiming to prevent possible interference from its hormonal activity on ovarian tissue to be transplanted. Five females received the agouti xenografts derived from the fresh control group. After two weeks of storage in LN₂, the vitrified samples were warmed and grafted on seven females of the same strain.

Before surgical procedure, mice were individually weighed to calculate the anesthetic dose. Each recipient mice was anesthetized with 18 mL/kg Avertin (2,2,2-tribromoethanol, 2.5%) that was administered intraperitoneally (Hoff, 2000). For the surgical procedure, bilateral sublumbar incisions of 1 cm were conducted caudally to the last rib. After identification of mice ovaries, they were removed using serrated, curved dissecting forceps. The left kidney was then located and exteriorized, and five cortical fragments (1 mm³) of the agoutis' ovaries were carefully grafted under the renal capsule. Finally, the kidney was repositioned and the abdominal cavity was closed.

Reproductive monitoring of the recipients

Five days after xenografting, mice were monitored for any reproductive manifestation through observation of external genitalia and vaginal cytology. This monitoring was conducted during 40 days.

For observation of external genitalia, every 12 h, recipients' external genitalia was monitored for any modification. Hyperemia, swelling and vulvar opening with little mucus production and presence of urine characterized the proestrus phase, which indicated the return of ovarian activity. The typical signs of estrus were verified as vulvar intumescence and presence of mucous secretion. Metestrus was observed through decreasing mucosal secretion and vaginal opening.

For vaginal washes, the recipients were subjected to vaginal washes with 0.9% physiological saline every 12 h using a 20 mL micropipette with 10 to 100 mL tips. The washings were evaluated using a light microscope, without staining, at a ×20 magnification. Evaluations of the vaginal washes were conducted according to the criteria established by Nelson et al. (1982) for mice, which identified round and nucleated cells as epithelial cells; irregular ones without nucleus as the cornified cells;

and the little round ones as the leukocytes. Regarding the relation among cells and estrus cycle phases, authors suggested that a proestrus smear consisted of a predominance of nucleated epithelial cells; an estrous smear consisted of a predominance of anucleated cornified cells; a metestrus smear consisted of the same proportion among leukocytes, cornified, and nucleated epithelial cells; and a diestrus smear primarily consisted of a predominance of leukocytes and mucus.

At 40 days, just before the grafts removal, recipients were subjected to a cardiac puncture for blood collection (Hoff, 2000) aiming the measurement of estrogen profile. The total blood volume collected was approximately 1 mL per individual. Samples were stored in graduated microtubes previously identified and centrifuged at 2000 g for 10 min at room temperature to obtain the plasma. The samples were run in duplicate and the concentrations of 17 β -estradiol were measured by amplified electrons chemiluminescence using an immunoassay system (Vitros Eci/EciQ Immunodiagnostic System; Johnson & Johnson Company, Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's instructions, following a technique described by Bartoskova et al. (2014). The results obtained were presented in pmol/L, which were transformed in pg/mL.

Grafts removal

Grafts were kept in the recipients for 40 days. After this period, mice were submitted to general anesthesia with intraperitoneal administration of 2.2.2 tribromoethanol 2.5% (20 mL/kg) and euthanized by cervical dislocation. The transplanted ovarian tissue was removed from the renal capsule together with the surrounding tissues that served as the receptor site. All the collected material was properly identified by animal, immersed in paraformaldehyde solution and destined for the same analyzes conducted for the control groups.

Histology of agoutis' ovarian fragments

Immediately after the agoutis' ovaries recovery, vitrification and xenografting, ovaries' fragments were fixed in paraformaldehyde for 48 h and destined to histological analysis. The fragments included in paraffin blocks were serially sectioned at 5 μ m thickness. The sections were then stained with hematoxylin and

eosin. Preantral ovarian follicles were classified as morphologically normal or degenerated, considering the presence or absence of pyknotic bodies, cytoplasmic retraction and organization of granulosa cells (Lopes et al. 2009). Beside this evaluation, the transplanted ovarian tissue was also assessed for integrity of the parenchyma, quality and classification of preantral and antral ovarian follicles, as well as vascularization (Santos et al. 2016).

Assessment of cell proliferation in agoutis' ovarian tissue fragments

To estimate the cell proliferation index, a staining was conducted in order to quantify the number of argentafins nucleolar organizer regions (Ag-NORs). For this purpose, fragments of ovarian tissue derived from all the experimental groups were fixed in paraformaldehyde solution. After histological processing, fragments were sectioned at 5 µm and placed in 1% metabisulfite potassium. Slides were stained with 50% silver nitrate solution in a colloid solution (2:1) in a dark room, then, the slides were placed in a solution of sodium metabisulphite and sodium thiosulphate. For quantification, the follicles were visualized under a light microscope (x1000), and the NORs of all the nuclei of visible granulosa cells were counted in accordance with a protocol adapted from Castro et al. (2014). To quantify the NORs, a total of 30 granulosa cells from five follicles (150 granulosa cells/group) were visualized.

Assessment of apoptosis in agoutis' ovarian tissue fragments

The occurrence of fragmentation of DNA in tissue sections was assessed using the kit DeadEndTMFluorometric TUNEL System, PROMEGA with terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant (rTdT). For immunohistochemistry, the ovarian tissue fragments were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, serially sectioned at 5 µm and finally mounted on positively charged poly-L-lysine coated slides (Starfrost, Knittel, Germany). The slides were immersed in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol, fixed in 4% paraformaldehyde and finally placed in phosphate buffered saline (PBS). After washing, the samples were immersed in 20 µg/mL proteinase K (37°C, 10 min). Then the slides were incubated with 50 µL of TUNEL reaction mixture and incubated at 37°C for 60 min in the dark, inside a humidified chamber (Bedaiwy & Hussein 2004).

Negative control sections consisted of omitting the terminal deoxynucleotidyl transferase recombinant enzyme and the samples were mounted with propidium iodide (Sigma, P4170). TUNEL-positive (+) fragmented DNA appeared green owing to the co-localization of propidium iodide (red) and fluorescein (green). TUNEL-negative (−), non-fragmented DNA, appeared red. All tissue sections were examined and total follicle numbers were recorded, along with the number of TUNEL positive follicles. TUNEL for control and vitrified samples were evaluated according to the manufacturer's recommendations.

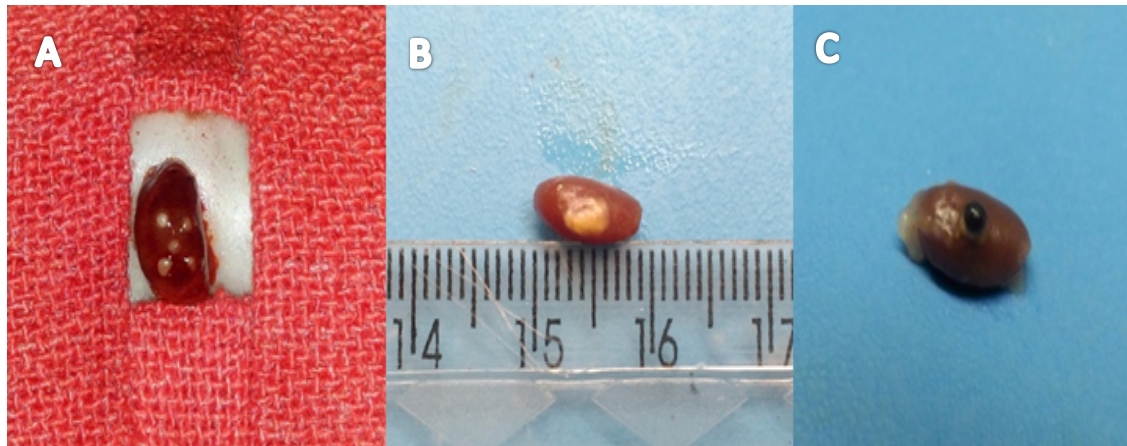
Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using the software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data were initially subjected to Smirnov-Kolmogorov and Batlett tests to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Difference in the number of NORs among experimental groups were evaluated by ANOVA followed by PLSD Fisher's test. The proportions of the different ovarian follicles were compared by chi-square test. Values were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

From the five C57BL/6 female SCID mice used as recipients for the graft control group, all survived after 40 days; while six from the seven female used for the graft vitrified group survived after receiving the graft under its renal capsule (Figure 1A). After removal, the transplanted tissues presented a gross morphology compatible to parenchymal region of ovarian tissue (Figure 1B), as confirmed by histological evaluation. Macroscopically, the presence of a hemorrhagic corporea was observed in one individual from the xeno-fresh group (Figure 1C).

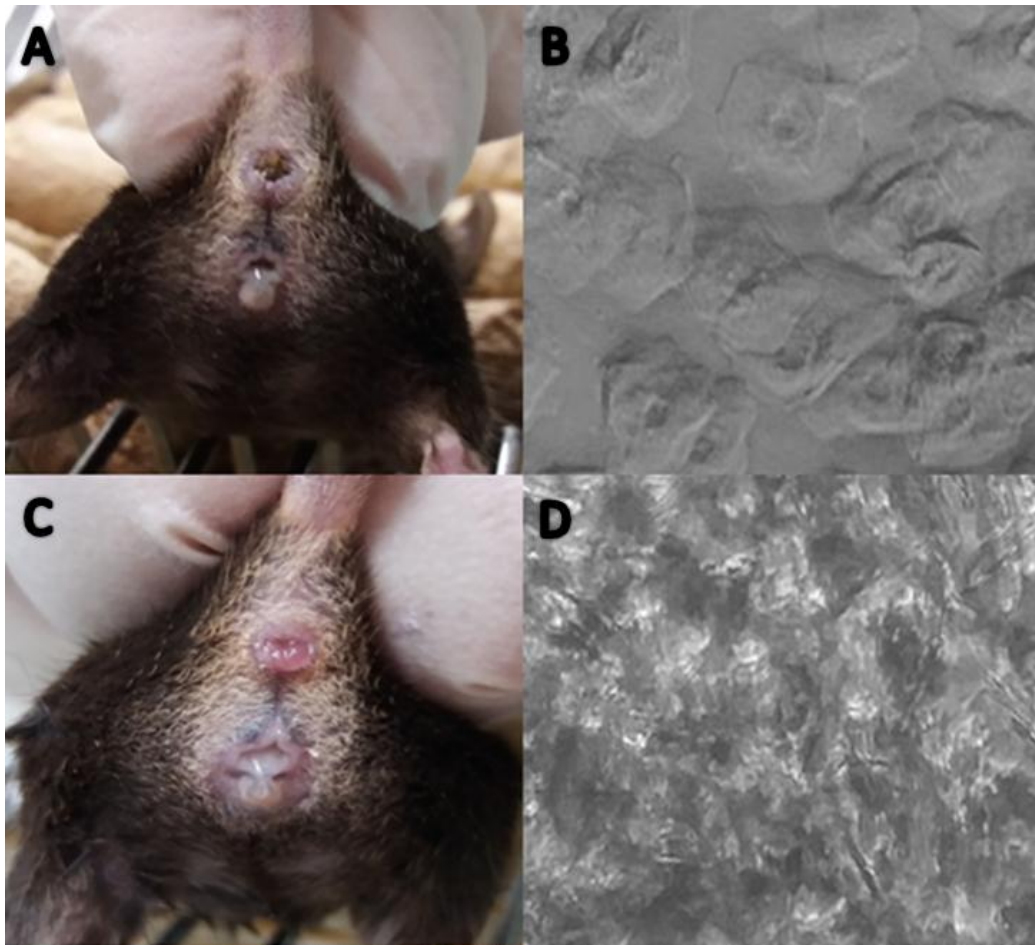
Figure 1. Macroscopic morphological aspect of ovarian cortex fragments from agouti (*Dasyprocta leporina*). (A) Fragment of ovarian tissue under the renal capsule, (B) parenchymal region with ovarian tissue and (C) hemorrhagic corporea after xenografting.



Reproductive monitoring of the recipients

According to the characteristics of external genitalia and the predominance of cornified cells on the vaginal cytology, we observed that four females (4/5; 80%) from the xeno-fresh group and one female (1/6; 16.7%) from the xeno-vitrified group returned to ovarian activity at 20.6 ± 8.6 days after the xenotransplantation. Typical signs of proestrus (Figure 2A) and estrus (Figure 2C), which characterize the ovarian activity return, included hyperemia, swelling, vulvar opening, the presence of mucous secretion, associated to the cytological findings as the predominance of nucleated superficial (Figure 2B) and cornified (Figure 2D) cells, respectively.

Figure 2. Characteristics of recipients SCID mice's external genitalia (A,C) and vaginal cytology (B,D). (A) Proestrus characterized for the beginning of mucus production and vulvar opening; (B) Vaginal washing showing nucleated epithelial cells; (C) Estrus characterized for increased mucus production and complete vulvar opening; (D) Vaginal washing showing cornified cells.



For occasion of grafts removal, we identified that three individuals from the xeno-fresh group and one from the xeno-vitrified group were in estrus. Besides the characteristics of external genitalia and vaginal cytology, we determine the increase in estrogen values (Table 1). Moreover, one individual from the xeno-fresh group presented metestrus signs.

Table 1 Phase of estrous cycle and estrogen profile of mice C57Bl/6 SCID submitted to the xenografting of ovarian tissue of agouti (*Dasyprocta leporina*) for forty days.

Tratamentos	Animal	Dia do retorno da atividade ovariana	Após 40 dias de xenotransplante	
			Fase do ciclo estral	Valores de estrógeno (pg/ml)
Grupo xeno-fresco	1	22	Estro	26,34
	6	12	Estro	23,00
	7	12	Metaestro**	16,56
	11	32	Estro*	18,71
Grupo xeno-vitrificado	4	25	Estro	15,13

* Presença de corpo lúteo;

**Presença de corpo hemorrágico e corpo lúteo.

Histology of agoutis' ovarian fragments

After removal and inspection of the fragments, we verified that the blood supply to the transplanted tissue was reestablished and appeared not to have been affected by the procedure. In four individuals from the xeno-fresh group (4/5) and one from the xeno-vitrified group (1/6), there was revascularization of the ovarian tissue due to the presence of blood vessels (Figure 3A).

The presence of preantral follicles classified as primordial (Figure 3B) and primary (Figure 3C) was observed in all the groups analyzed, as well as transitional follicles, except for the vitrified control group. Secondary follicles (Figure 3D) were observed only in the control group and xeno-fresh group. In two individuals from the xeno-fresh group (40%), corporea lutea were identified in the xenografts (Figure 3E). The presence of a hemorrhagic corporea was noted in one animal from the xeno-fresh group (Figure 3F). Data related to the morphologically normal follicles were expressed

in percentage (%) and are presented in Figure 4, in which the predominance of primordial follicles is highlighted.

Figure 3. Histological characteristics of agoutis' (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue submitted to xenotransplantation to SCID mice. Fresh (A and B) and vitrified (C) after xenografting in mice C57Bl/6 female SCID (A) blood vessels (arrows); (B) primordial follicles (arrows); (C) primary follicles (D) secondary follicle; (E) Corporea lutea (arrows); (F) hemorrhagic corporea. Scale bar: 40 μ m

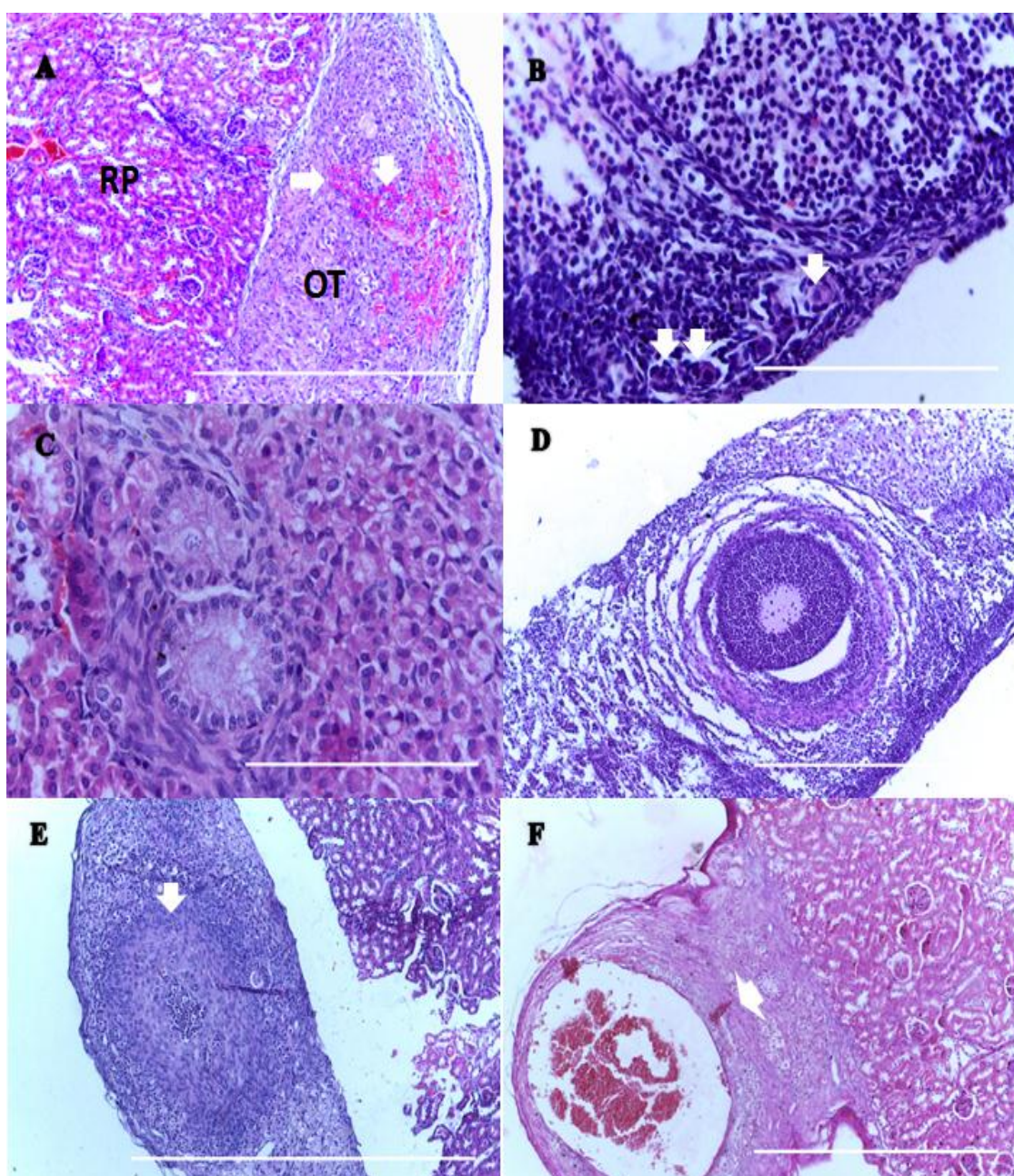
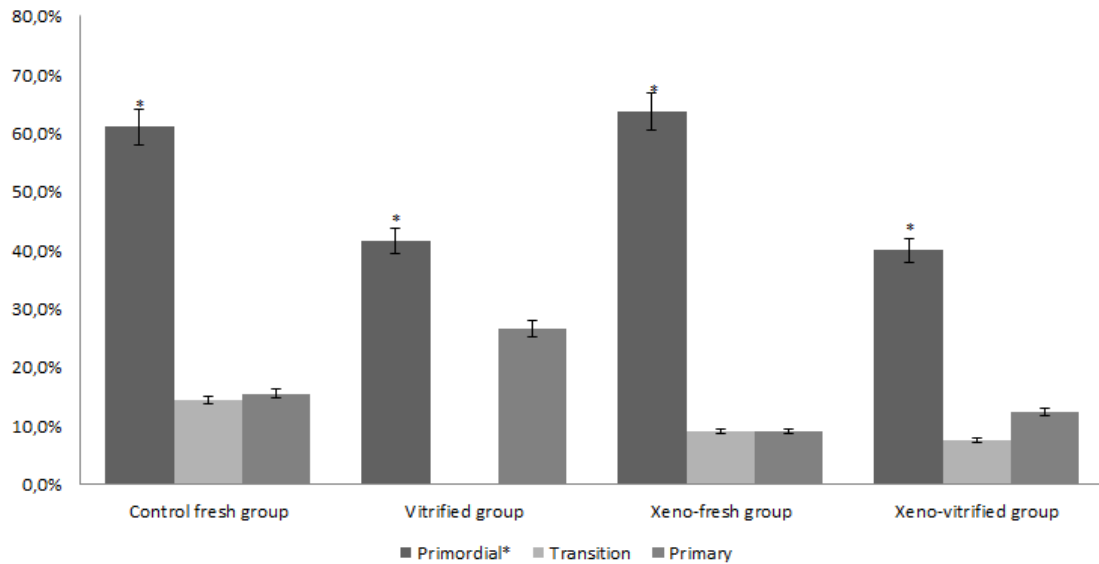


Figure 4. Proportions of morphologically normal ovarian follicles (%) in agoutis' (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue submitted to different treatments. *Asterisk indicate statistical difference among experimental groups.



Assessment of cell proliferation in agoutis' ovarian tissue fragments

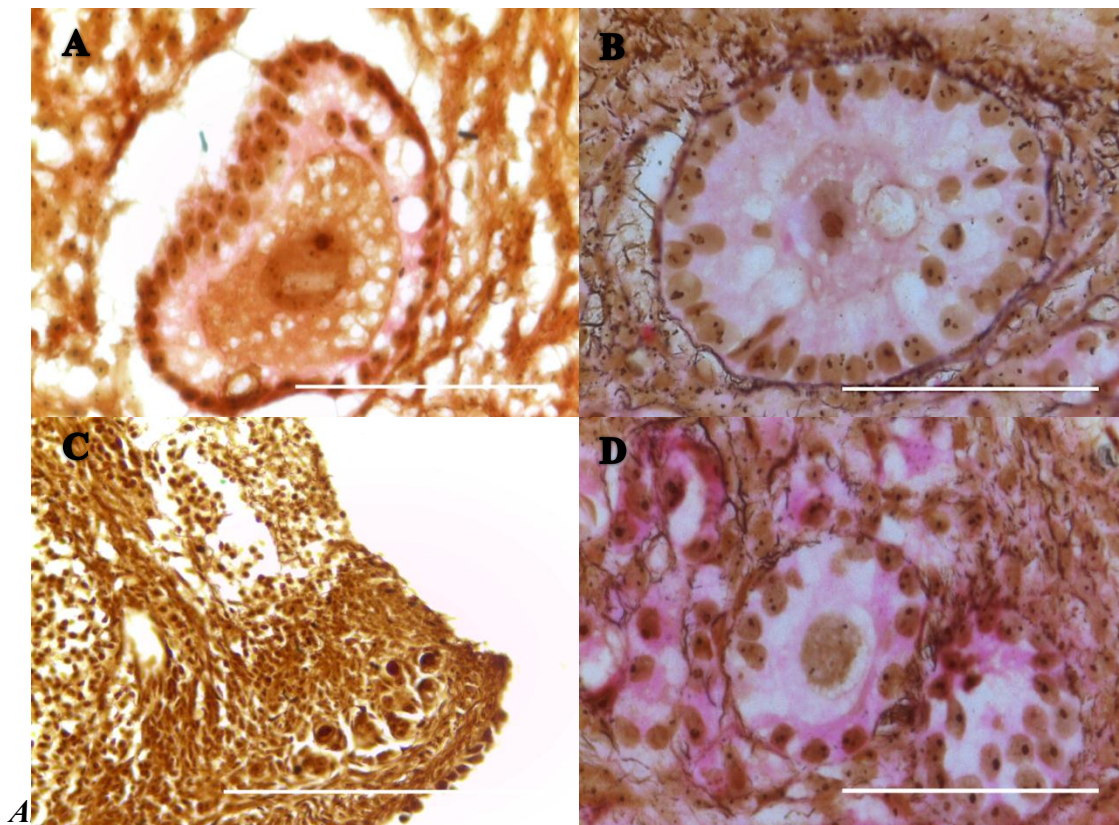
The Ag-NOR technique (Table 2) determined that the mean of the NORs (Figure 5) was similar among the follicles from both fresh and vitrified groups ($p < 0.05$). However, the combination between xenografting and vitrification provoked a significant decrease in the cell proliferation, as verified by a reduction in the mean NORs (1.66 ± 0.25) when compared to the fresh control and xeno-fresh groups ($p < 0.05$).

Table 2 Average number of nucleolar organizer regions (NOR) per nucleus of granulosa cells derived from agouti (*Dasyprocta leporina*) growing preantral follicles from fresh and vitrified ovarian tissues that were subjected to *in vivo* culture.

Treatments	Number de NORs
Group fresh control	7.19 ± 1.23^a
Vitrified control	4.88 ± 1.48^{ab}
Xeno-fresh group	9.10 ± 0.64^a
Xeno-vitrified group	1.66 ± 0.25^b

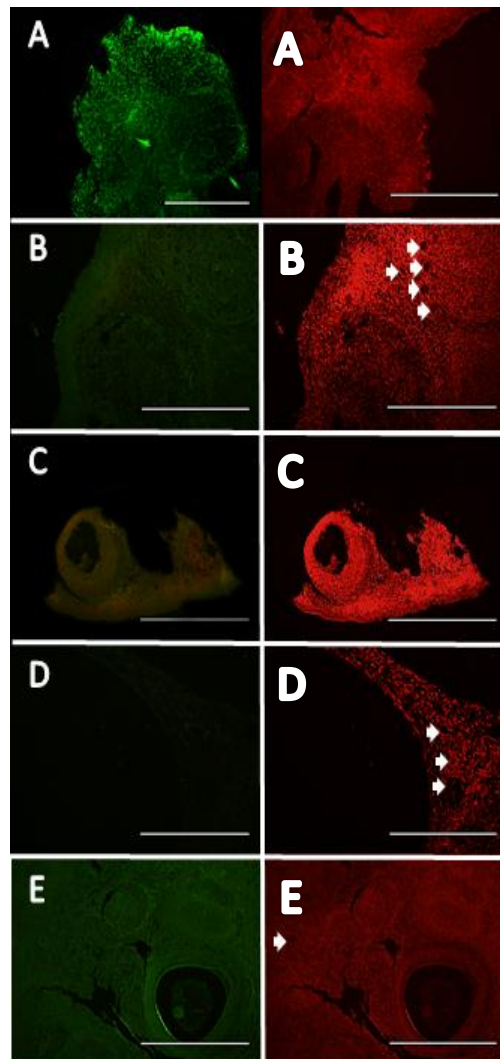
^{a,b} Within a row, means without a common letter differed ($P < 0.05$).

Figure 5. Argentafins nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in agoutis' (*Dasyprocta leporina*) preantral ovarian follicles submitted to different treatments. (A) Fresh control group; (B) xeno-fresh group; (C) vitrified group; (D) xeno-vitrified group. Scale bar: 100 μ m



Only follicles with visible oocyte nuclei were analyzed. None of the negative controls marked with TUNEL technique showed any immunoreactivity, while signal-positive TUNEL marked was observed in the positive controls (Figure 6A – A'). The healthy (primordial and primary) follicles were TUNEL negative observed in the entire control fresh group (Figure 6B), vitrified control (Figure 6C) and xeno-fresh group (Figure 6D). TUNEL-positive signals were detected in the degenerate follicles as indicated by the fragmented nuclei of granulosa cells and oocyte nuclei, observed after transplanted of samples submitted to the solid surface vitrification (Figure 6E).

Figure 6. Detection of apoptosis occurrence in agoutis' (*Dasyprocta leporina*) ovarian tissue using TUNEL assay. A.cortex without counter staining (A - left) and with propidium iodide staining (A' - right) in the control group (B and B'), vitrification group (C and C'), xenograft control (D and D') and xenograft group vitrified (E) with TUNEL-positive signals (E'). Scale bar: 20 μ m.



4. DISCUSSION

The efficiency of xenotransplantation has been reported in several rodents as mice (Lee et al. 2015) and rats (Damous et al. 2015), but this is the first study to demonstrate the xenografting of fresh or vitrified ovarian tissue derived from a hystricognath wild rodent, the red-rumped agouti, to C57Bl/6 SCID mice. The satisfactory results obtained, demonstrated through the ovarian activity return and the presence of a greater number of primordial follicles after graft, confirmed the hypothesis that graft represents a useful tool to evaluate the ovarian function recovery and to elucidate the revascularization mechanisms of fresh or cryopreserved tissues (Youm et al. 2015). Nevertheless, fertility preservation using ovarian tissue banking and transplantation is still in the experimental stages (Lee et al. 2015) and has been slowly adapted to some animal groups as felids (Wiedemann et al. 2012), non-human primates (Amorim et al. 2013) and ungulates (Damásio et al. 2016).

Trough observation of external signs associated to vaginal cytology findings, we verify that four recipients from the xeno-fresh and one from the xeno-vitrified groups exhibit proestrus followed by estrus at 20 days after xenografting surgery, characterizing the return to ovarian activity. Similar studies conducted in other rodents as mice (Cox et al. 1996) and rats (Damous et al. 2015) also obtained the ovarian activity return at 15 to 20 days after xenografting, as evidenced by the estrus arising detected through vaginal cytology.

After 40 days of xenografting, five mice, being four from the xeno-fresh and one from the xeno-vitrified groups, presented external signs of estrus. These observations assent with the use of vaginal cytology for reproductive monitoring o recipients, since we identified the cell features previously described by Nelson et al. (1982) and Byers et al. (2012). Many authors reported the successful application of vaginal cytology for the evaluation of ovarian tissue xenografts derived from various species as elephants (Guanasena et al. 1998), non-human primates (Schnorr et al. 2002) and cats (Santos et al. 2016). In addition, the five recipients exhibiting estrus for occasion of agoutis' grafts removal presented increased estrogen levels in blood, which can be highlighted as the main reason for the alterations in the external genitalia

and the predominance of superficial cells verified through the vaginal cytology (Campos et al. 2015).

Xenograft involves tissue transfer between an individual donor and recipients of different species (Santos et al. 2016), so the fabric is prone to rejection by the recipient. At present study, female severe combined immunodeficiency (SCID) mice were used in order to avoid rejection of agoutis' xenograft tissue, as previously reported by xenotransplantation studies conducted in mice (Aerts et al. 2008) and lions (Wiedemann et al. 2012). The SCID mice devoid of humoral immune response, which provides a great safety and efficient recovery of the transplanted organs (Pimentel et al. 2015). In spite of this fact, one recipient did not survive for 40 days after the xenografting procedure, probably because they did not resist to the surgery. In fact, the recipient's death after receiving a transplant due to the damage caused by the surgery was described in several species as rabbits, swine, ovine and primates (Hamilton et al. 1984).

In present study, we were able to recover all the agoutis' ovarian fragments transplanted. Furthermore, the formation of blood vessels was noted, thus indicating the vascularization of the agoutis' ovarian tissue in the site where they were grafted in the SCID mice. A similar vascularization of xenografted tissue was previously described by when mice (Youm et al. 2015) and cats (Santos et al. 2016) were used as tissue donors. The efficient tissue revascularization may be associated to the use of kidney capsule as the transplantation site (Kaneko et al. 2013). Various authors (Aerts et al. 2008; Lee et al. 2015; Santos et al. 2016) have chosen this site as the main destiny of grafts because it is highly vascularized and provides good angiogenic conditions for a rapid revascularization of the transplanted ovarian tissue (Youm et al. 2015). The tissue revascularization is indeed important in order to preserve the viability of donors' ovarian follicles (Youm et al. 2015), as observed in the present study. Moreover, it is well known that there are angiogenic factors, as vascular endothelial growth factor and angiopoietins, in ovarian tissue of rodents that can stimulate the rapid migration of endothelial cells and allow the restoration of blood flow (Israely et al. 2003), thus contributing for tissue revascularization.

The presence of primordial, transitional, primary and secondary follicles was observed in the agoutis' ovarian tissue after grafts' removal. These findings

demonstrated the ability of transplanted tissue to conserve viable follicles that are able to develop for further stages, even if no antral ovarian follicles were observed in this study. We emphasize, however, the presence of a hemorrhagic corporea and some corporea lutea in the grafts, which are indicative of ovulation occurrence. Moreover, the predominance of normal follicles characterized as primordial and primary ones in the transplants is highlighted. This result could be attributed to the low metabolic rates required by these follicular categories, which can contribute to their resistance to post-transplant ischemia (Huang et al. 2010). Similar results were described for rats (Israely et al. 2003), in which primordial and primary follicles present simple morphology and are concentrated in the periphery of the ovarian cortex, which suggests that they are the first to benefit from revascularization (Nugent et al. 1997).

After grafting of agoutis' vitrified ovarian tissue, the number of viable follicles decreased in comparison to the other groups. Probably, follicles were affected by cryoinjuries originated from the vitrification procedure (Herraiz et al. 2014) associated to the hypoxia present in the first days after transplantation (Laschke et al. 2003). It is well known that cryoinjuries could affect the follicular development, through the reduction of cellular respiration, increase of degeneration of the deoxyribonucleic acid and release of intracellular material (Laschke et al. 2003). However, the current consensus is that ischemia prior to graft revascularization rather than cryopreservation-induced damage is the main cause of follicular loss (González et al. 2012). We emphasize that similar follicular densities among the fresh control and experimental groups were verified, which ensures a large pool of follicles capable of growing after the vitrification procedures if this would be improved.

Transplants are considered an efficient tool to measure tissue survival after a cryopreservation process. In fact, the present study demonstrate that is possible to recover normal agoutis' PFs after 40 days of xenotransplantation of previously vitrified ovarian tissue. This is an interesting result that highlights that activation of preantral follicles (PFs) after transplantation of cryopreserved ovarian tissue is a challenge. Some factors that hinder the success of the procedure include not only the high variability between species, but also the challenges resulted from the exposure of tissue to the vitrification solution (Fabbri et al. 2001) and the steps of the cryopreservation procedure themselves (Faustino et al. 2011). Many authors have been

reporting variable success at performing the transplantation of cryopreserved ovarian tissue in several species as wombats (Wolvekamp et al. 2001), mice (Hemadi et al. 2009; Lee et al. 2015), lions (Wiedemann et al. 2012), rats (Damous et al. 2015) and boars (Damásio et al. 2016). The common consensus, however, is that is necessary to improve the vitrification protocols and to establish adequate *in vivo* culturing procedures in order to obtain most satisfactory results.

When grafted agoutis' ovarian tissue was evaluated for cell proliferation, it was observed that a significant reduction in the number of NORs occurred after the xenografting of vitrified samples. Bandeira et al. (2015) reported similar results in goat. The decrease in the number of NORs may be related to the cryopreservation process that increases the sensibility of cells to the culture conditions (Segino et al. 2005), thus exacerbating the toxic effect of CPAs (Huang et al. 2010). In fact, previous studies conducted in mice demonstrated that excessive dehydration and exposure to metabolites could increase the exposure of cells to the toxic effects of CPAs (Zhang et al. 2009).

In addition, TUNEL revealed the occurrence of apoptosis mainly in the xeno-vitrified group, which could also be a result from the damage associated to the ischemia that occurs before tissue revascularization. These findings are similar to those reported by Damásio et al. (2016) that attributed the presence of apoptosis in wild boar ovarian follicles to structural changes consequently from the prolonged ischemia suffered by the tissue since its removal from the donor to the revascularization after transplant. In this context, studies have shown that presence of apoptosis was not only related to the cryopreservation protocol and the cryoprotectants used (Zhou et al. 2010), but also to the manipulation of the transplanted fragments after removal (Damous et al. 2015). It is necessary to emphasize, however, that apoptosis occurrence in transplanted ovaries is not yet completely understood (Abir et al. 2011).

In general, we emphasize that xenografting of agoutis' cortical ovarian tissue is an excellent tool to increase knowledge about the development of follicular dynamics in this species. Furthermore, it provides a validation method for other assisted reproductive techniques as it investigates follicular growth *in vivo*. In addition, the xenotransplantation method may allow preservation and multiplication of the genetic

resources of this species, and serve as a method for PFs analysis that can be applied for other hystricognath rodents that are threatened or vulnerable to extinction.

CONCLUSION

In conclusion, we demonstrate the efficiency of agoutis' ovarian tissue to promote the ovarian activity return in SCID C57B1/6 mice after xenografting of fresh and vitrified fragments. We believe that this promising technique represents a valuable contribution for female germplasm conservation as for agoutis as for other valuable wild hystricognath rodents. However, we emphasize that further studies must be conducted in order to improve the combination between ovarian tissue vitrification protocols and *in vivo* culture.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Funding

This work was supported by CNPq (Process N ° 407302/2013-1).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. MF Oliveira from the CEMAS/UFERSA for providing the animals used in the experiments.

References

- Abir R, Fisch B, Jessel S, Felz C, Ben-Haroush A & Orvieto R 2011 Improving posttransplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. *Fertility and Sterility* **95** 1205–10. (doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.07.1082).
- Aerts JMJ, Clercq JPB, Andries S, Leroy JLMR, Van Aelst S & Bols PEJ 2008 Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical

transplants after cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology* **57** 163–9. (doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.07.011.)

Amorim CA, Jacobs S, Devireddy RV, Van Langendonck A, Vanacker J, Jaeger J, Luyckx V, Donnez J & Dolmans MM 2013 Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Human Reproduction* **28** 2146–56. (doi: 10.1093/humrep/det103).

Bandeira FT, Carvalho AA, Castro SV, Lima LF, Viana DA, Evangelista J, Pereira M, Campello CC, Figueiredo JR & Rodrigues APR 2015 Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. *Reproduction in domestic animals* **50** 177–185. (doi: 10.1111/rda.12463).

Barros FFPC, Teixeira PPM, Silva MAM, Silva ASL, Medeiros RM, Coelho CMM, Bandarra MB, Macedo MF, Bezerra MB & Vicente WRR 2014 Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **38** 121c126. <Disponível em www.cbra.org.br>

Bartoskova A, Ondrackova P, Leva L, Vitasek R, Novotny R, Janosovska M, Faldyna M 2014 The effects of *in vitro* exposure to progesterone and estradiol-17 β on the activity of canine neutrophils. *Veterinarni Medicina* **59** 202–209.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL & Taft RA 2012 Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* **7** 1–5. (doi: 10.1371/journal.pone.0035538).

Bedaiwy & Hussein 2004 Histological evaluation and *in situ* localization of apoptosis in fresh and cryopreserved ovarian tissue. *Middle East Fertility Society Journal* **9** 1110–5690. (doi: 10.1016/S0015-0282(02)03842-6)

Campos LB, Peixoto GCX, Lima GL, Castelo TS, Souza ALP, Oliveira MF & Silva AR 2015 Monitoramento do ciclo estral de cutias (*Dasyprocta leporina* Lichtenstein, 1823) através de citologia esfoliativa vaginal e ultrassonografia. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **35** 188–192. (doi: 10.1590/S0100-736X2015000200016).

Carvalho AA, Faustino LR, Silva CM, Castro SV, Lopes CAP, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR & Rodrigues APR 2013 Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: ovarian tissue cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science* **138** 220–7. (doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.015).

Castelo TS, Silva AM, Bezerra LGP, Costa CYM, Lago AEA, Bezerra JAB, , Campos LB, Praxedes ECG & Silva AR 2015 Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology* **71** 442–447. (doi:10.1016/j.cryobiol.2015.09.005).

Castro SV, Carvalho AA, Silva CMG, Santos FW, Campello CC, Figueiredo JR & Rodrigues APR 2014 Frozen and fresh ovarian tissue require different culture media to promote *in vitro* development of bovine preantral follicles. *Biopreservation and biobanking* **12** 317–324. (doi: 10.1089/bio.2014.0020).

Cox SL, Shaw J & Jenkin G 1996 Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* **107** 315–322. (doi: 10.1530/jrf.0.1070315).

Damásio LC, Soares-Júnior JM, Iavelberg J, Maciel GAR, Simões MJ, Simões RS, Motta EV, Baracat MCP & Edmund C 2016 Heterotopic ovarian transplantation results in less apoptosis than orthotopic transplantation in a minipig model. *Journal of Ovarian Research* **9** 14. (doi:10.1186/s13048-016-0223-1).

Damous LL, Nakamuta JS, Carvalho AETS, Soares Junior JM, Simões MJ, Krieger JE & Baracat EC 2015 Adipose tissue-derived stem cell therapy in rat cryopreserved ovarian grafts. *Stem Cell Research & Therapy* **6** 57. (doi:10.1186/s13287-015-0068-3).

Dittrich R, Lotz L, Fehm T, Kreussel J, Von Wolff M, Toth B, Van Der Ven H, Scheuring AN, Weurfel W, Hoffmann I & Matthias 2015 Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue: a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertility and Sterility* **103** 0015–0282. (doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.03.001).

Donnez J & Dolmans MM 2015 Ovarian Tissue Freezing and Transplantation: Current Status. *Fertility, ivf and reproductive genetics* **27** 95–104. (doi: 10.1097/GCO.0000000000000171).

Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, Pasquinelli G, Paradisi R, Battaglia C, Martino NA & Venturoli S 2014 Good Preservation of Stromal Cells and No Apoptosis in Human Ovarian Tissue after Vitrification. *BioMed Research International*. (doi.org/10.1155/2014/673537).

- Faustino LR, Silva CMG, Rossetto R, Rodrigues GQ, Figueiredo JR & Rodrigues APR 2011 Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **35** 3–15. <Disponível em www.cbra.org.br>
- Fontana CS, Bencke GA & Reis RE 2003 Livro vermelho de fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul, pp. 632, Porto Alegre: EDIPUCRS.
- González C, Boada M, Devesa M & Veiga A 2012 Concise review: fertility preservation: an update. *Stem Cells Translational Med* **1** 668–72. (doi: 10.5966/sctm.2012-0076).
- Guanasena KT, Lakey JR, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, McGann LE & Critser JK 1998 Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Animal Reproduction Science* **53** 265–275. (doi: 10.1016/S0378-4320(98)00132-8).
- Hamilton D 1984 Kidney transplantation: a history. In *Kidney transplantation: principles and practice*, Morris PJ, editor, pp.1–13. London: Grune & Stratton.
- Hemadi M, Abolhassani F, Akbari M, Sobhani A, Pasbakhsh P, Ährlund-Richter L, Modaresi MH & M Salehnia 2009 Melatonin promotes the cumulus–oocyte complexes quality of vitrified–thawed murine ovaries; with increased mean number of follicles survival and ovary size following heterotopic transplantation. *European Journal of Pharmacology* **618** 84–90. (doi: 10.1016/j.ejphar.2009.07.018).
- Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M & Pellicer VMA 2014 Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertility and Sterility* **101** 775–784. (doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.016).
- Hoff J 200 Methods of blood collection in the mouse. *Laboratory Animals* **29** 47–53.
- Huang KY, Groot SA, Woelders H, Van Der Horst GTJ, Themmen APN, Colenbrandera B & Van Vliissingenb JMF 2010 Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. *Cryobiology* **60** 129–137. (doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.10.003).
- Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafirri A & Neeman M 2003 Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes

and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. *Biology of Reproduction* **68** 2055–64. (doi: 10.1095/biolreprod.102.011734).

IUCN Species Survival Commission, 2017. IUCN Red List Categories and Criteria, Version 3.1. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. . <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 January 2017.

Kaneko H, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J & Kikuchi K 2013 Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: a model for utilization of primordial oocytes. *Theriogenology* **80** 887–92. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.014).

Laschke MW, Menger MD & Vollmar B 2003 Cryopreservation does not affect neovascularization of freely transplanted ovarian follicles. *Fertility and Sterility* **79** 1458–60. (doi: 10.1590/S1807-59322011001200015).

Lee J, Kim SK, Youm HW, Kim HJ, Lee JR, Suh CS & Kim SH 2015 Effects of Three Different Types of Antifreeze Proteins on Mouse Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation. *Plos One* **1** 16. (doi:10.1371/journal.pone.0126252).

Lopes CAP, Santos RR, Celestino JJH, Melo MA, Chaves RN, Campello CC, Silva JRV, B ao SN, Jewgenow K & Figueiredo JR 2009 Short- term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science* **115** 201–214. (doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.016).

Motohashi HH & Ishibashi H 2016 Cryopreservation of ovaries from neonatal marmoset monkeys. *Experimental Animals* **65** 189–196. (doi: 10.1538/expanim.15-0097).

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C & Finch CE 1982 A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biology and Reproduction* **27** 327–39. (doi: 10.1095/biolreprod27.2.327).

Nogueira SSC & Nogueira-Filho SLG 2011 Wildlife farming: an alternative to unsustainable hunting and deforestation in Neotropical forests? *Biodiversity and Conservation* **1** 1–13. (doi:10.1007/s10531-011-0047-7).

- Nugent D, Meirow D, Brook PF, Aubard Y & Gosden RG 1997 Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Human Reproduction* **3** 267–80. (doi: 10.1093/humupd/3.3.267).
- Pimentel MML, Santos FA, Oliveira GB, Macedo MF & MB Bezerra 2015 Ovarian tissue xenografting in animals: Limitations, techniques and innovations. A Review *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* **9** 580–591. (doi:10.5935/1981-2965.20150052).
- Pukazhenth B, Comizzoli P, Travis AJ & Wildt DE 2006 Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reproduction, Fertility and Development* **18** 77–190. (doi: 10.1071/RD05117).
- Santos FA, Pimentel MML, Teixeira ACG, Cosmo ÍC, Lima MA, Brito PD, Macedo MF & Bezerra MB 2016 Follicular right shift: Xenografting queens' ovarian tissue into severe combined immunodeficiency mice and its responses to exogenous gonadotropin. *Theriogenology* **86** 1811–1817. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.034).
- Segino M, Ikeda M, Hirahara F & Sato K 2005 *In vitro* development of cryopreserved mouse ovarian tissue. *Reproduction* **130** 187–192. (doi: 10.1530/rep.1.00515).
- Scalercio SRRA, Brito AB, Domingues SFS, Santos RR & Amorim CA 2015 Immunolocalization of Growth, Inhibitory, and Proliferative Factors Involved in Initial Ovarian Folliculogenesis From Adult Common Squirrel Monkey (*Saimiri collinsi*). *Reproductive Sciences* **22** 68–74. (doi: 10.1177/1933719114532842).
- Schnorr J, Oehninger S, Toner J, Hsiu J, Lanzendorf S, Williams R & Hodgen G 2002 Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. *Human Reproduction* **17** 612–619. (doi: 10.1093/humrep/17.3.612).
- Snow M, Cox SL, Jenkin G & Shaw JM 2002 Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science* **297** 2227. (doi: 10.1126/science.1073693).
- Stoops MA, O'Brien JK & Roth TL 2011 Gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Theriogenology* **76** 1258–1265. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.032).
- Tahaei LS, Eimani H, Hajmusa G, Fathi R, Rezazadeh VM, Shahverdi A & Eftekhari-Yazdi P 2015 Follicle development of xenotransplanted sheep ovarian tissue into male

and female immunodeficient rats. *International Journal of Fertility & Sterility* **9** 354–360. (PMC4671375).

Von Schönfeldt V, Chandolia R, Kiesel L, Nieschlag E, Schlatt S & Sonntag B 2011 Advanced follicle development in xenografted prepubertal ovarian tissue: the common marmoset as a nonhuman primate model for ovarian tissue transplantation. *Fertility and Sterility* **95** 1428–1434. (doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.003).

Wolvekamp MC, Cleary ML, Cox SL, Shaw JM, Jenkin G & Trounson AO 2001 Follicular development in cryopreserved common Wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. *Animal Reproduction Science* **65** 135–147. (doi: 10.1016/S0378-4320(00)00228-1).

Wiedemann C, Hribal R, Ringleb J, Bertelsen MF, Rasmussen K, Andersen CY, Kristensen SG & Jewgenow K 2012 Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reproduction in Domestic Animals* **47** 300–304. (doi: 10.1111/rda.12081).

Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh, CS & Kim SH 2014 Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and *in vitro* culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Human Reproduction* **29** 720–730. (doi: 10.1093/humrep/det449).

Zhang JM, Li LX, Liu XL, Yang YX & Wan XP 2009 Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **26** 137–142. (doi:10.1007/s10815-009-9295-9).

Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia YX & Zheng SS 2010 Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* **60** 101–105. (doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.02.006).

9. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Com base no exposto, o uso de 6M do dimetilsufóxido, 3M do etilenoglicol e associação de ambos os ACPs (DMSO e EG), associado ao método de vitrificação em superfície sólida foi eficaz na preservação da integridade morfológica e viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais *in situ* de cutias (*Dasyprocta leporina*).

As camundongas C57Bl/6 SCID representaram bons modelos experimentais para o xenotransplante de tecido ovariano de cutias, uma vez que o retorno da atividade ovariana provou que os fragmentos transplantados ao formar o tecido vascularizado foram capazes de produzir hormônios suficientes para demonstrar alterações nas características da genitália externa e diferenças na citologia vaginal. Isto pode ser utilizado para preservação dos recursos desta espécie, mas também poderá servir de modelo para o uso da técnica em outros animais vulneráveis ou ameaçados de extinção.

Salienta-se que esse é o primeiro trabalho a descrever o processo de criopreservação de gametas femininos de cutias seguido do cultivo *in vivo*, o que demonstrou ser uma técnica simples e eficaz para tais gametas, abrindo vertentes para a formação de bancos de germoplasma para a espécie.

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos protocolos, ou até mesmo o aperfeiçoamento dos já existentes com utilização de concentrações de ACPs ideal para cada tipo de célula são requeridos para o sucesso da criopreservação e posterior transplante, no intuito de se obter maiores aplicações da técnica de xenotransplante em roedores silvestres ou domésticos. Assim como, desenvolver novos estudos moleculares e do perfil proteômico podem auxiliar na identificação da interação de todos os constituintes celulares.

ANEXOS