

Hélder S. Luna<sup>1</sup>Daniel M. Darbello<sup>2</sup>Jaqueline O. Mesnerovicz<sup>2</sup>

# Morfometria, células da granulosa e cromatina nuclear de folículos pré-antrais em associação ou não com a vitrificação de tecido ovariano bovino

## RESUMO

Busca-se no presente estudo, avaliar o efeito da vitrificação de fragmentos ovarianos na morfometria, número de células da granulosa e cromatina nuclear de folículos pré-antrais bovinos. Ovários foram obtidos em abatedouro e fragmentos do córtex retirados, enquanto uma parte foi fixada imediatamente e processada para histologia ( $T_0$  - controle). Outros fragmentos foram distribuídos em dois tratamentos:  $T_I$  - toxicidade e  $T_{II}$  - vitrificação; no  $T_I$ , os fragmentos foram expostos apenas aos crioprotetores e fixados em Carnoy, e no  $T_{II}$ , usou-se a associação dos crioprotetores DMSO e etilenglicol acrescido de sacarose. Os resultados indicaram que folículos primordiais, quando vitrificados ou expostos aos crioprotetores, não apresentam variações morfométricas e na quantidade de células da granulosa ( $p > 0,05$ ), exceção feita aos folículos primários ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o  $T_0$ . A análise da morfologia da cromatina nuclear de folículos vitrificados ou apenas expostos aos crioprotetores, mostrou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o  $T_0$ ; conclui-se, então, que a vitrificação causou alterações morfológicas de folículos bovinos inclusos em tecido ovariano.

**Palavras-chave:** biotecnologia, criopreservação, fragmentos ovarianos

## Morphometry, granulosa cells and nuclear chromatin of preantral follicles associated or not to vitrification of bovine ovarian tissue

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of ovarian fragments vitrification in the morphometry, number of granulosa cells and nuclear chromatin of preantral ovarian follicles of bovines. Ovarian was obtained at a local slaughterhouse and cortex fragments were removed. One third were immediately fixed and processed for histology ( $T_0$  - control). The remaining fragments were divided in two treatments,  $T_I$  - toxicity test and  $T_{II}$  - vitrification. In  $T_I$  the fragments were exposed to only cryoprotectants and fixed in Carnoy and in  $T_{II}$  were utilized DMSO and ethylene glycol supplemented with sucrose. The results indicated that the primordial follicles when vitrified or exposed to cryoprotectants did not show variation in morphometry and amount of cells of the granulosa ( $p > 0.05$ ), exception to primary follicles ( $p < 0.05$ ) when compared to  $T_0$ . The analysis of the nuclear chromatin of follicles vitrified or cryoprotectants exposed showed significant difference ( $p < 0.05$ ) when compared to  $T_0$  with the control treatment, particularly in  $T_{II}$ . In conclusion the vitrification technique affected negatively the morphology of bovine follicles enclosed in ovarian tissue.

**Key words:** biotechnology, cryopreservation, ovarian fragments

<sup>1</sup> Professor, Departamento de Biociências, CPAQ, UFMS, Campo Grande, MS. e-mail: hluna@ceua.ufms.br

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação científica, Departamento de Biociências, CPAQ, UFMS. e-mail: ddarbello@yahoo.com.br, jaquemesnerovicz@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A criopreservação de fragmentos de tecido ovariano apresenta importante aplicação, principalmente em humanos submetidos a tratamentos de quimioterapia ou radioterapia, uma vez que transplantes após terapia possibilitam retorno das funções ovarianas (Donnez & Bassil, 1998; Oktay & Karlikaya, 2000; Aubard et al., 2001; Oktay, 2001; Kim et al., 2001; Posada et al., 2001); além desta significativa aplicação, representam alternativa promissora para a preservação de recursos genéticos animais (Holt, 1997).

Sucessos de nascimentos oriundos de ovários criopreservados e transplantados foram relatados em mamíferos, a exemplo de camundongos, ratos, ovinos e primatas (Gosden et al., 1994; Migishima et al., 2003; Donnez et al., 2004); entretanto, a criopreservação de tecido ovariano é mais complexa uma vez que a entrada e difusão adequada dos crioprotetores são mais difíceis, em virtude de envolver um conjunto de células e tecidos diferentes, que variam em volume e permeabilidade. Muitas variáveis podem afetar a criopreservação tecidual, dentre os quais se destacam o tamanho do fragmento ovariano, o crioprotetor e a velocidade de resfriamento (Gandolfi et al., 2006).

A técnica de congelamento clássica com redução da temperatura de forma controlada e uso de baixas concentrações de crioprotetores tem sido a mais usada para criopreservação de tecido ovariano bovino, uma vez que preserva a integridade e as características morfológicas foliculares (Lucci et al., 2004); entretanto, esta técnica exige o uso de equipamentos de alto custo e maior tempo de execução do processo, além de riscos de formação de cristais de gelo intracelular. Como alternativa, a técnica de vitrificação, que apresenta baixo custo e rapidez, vem sendo usada para a preservação de tecido ovariano bovino, ainda que com limitado sucesso quando comparada com a técnica de congelamento clássica (Gandolfi et al., 2006), porém a vitrificação de tecido ovariano foi realizada com preservação folicular adequada, em camundongos (Salehnia et al., 2002), humanos (Isachenko et al., 2003), ovinos (Al-Aghbari & Menino, 2002) e caprinos (Santos et al., 2007).

O sucesso da técnica de vitrificação se baseia no volume da amostra a ser vitrificada, na viscosidade da solução protetora nas velocidades de resfriamento e desvitrificação. Invariavelmente, altas concentrações de crioprotetores são usadas, as quais podem levar efeitos tóxicos ou choques osmóticos aos sistemas celulares (Yavin & Arav, 2007). Estudos quanto à morfologia folicular ovariana foram realizados, como análises morfométricas, contagem de células da granulosa e aspectos nucleares, fundamentais como indicativos do sucesso das biotécnicas utilizadas para a preservação de folículos ovarianos pré-antrais (Lundy et al., 1999; Demirci et al., 2002; Kacinskis et al., 2005). Poucos estudos com criopreservação de tecido ovariano bovino, em particular vitrificação, têm sido realizados, sendo importante o desenvolvimento de pesquisas nesta área. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da vitrificação na morfometria, número de células da granulosa e

cromatina de folículos pré-antrais bovinos incluídos em tecido ovariano.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Obtiveram-se doze ovários de vacas em abatedouro, os quais foram transportados em bolsas plásticas contendo solução salina de NaCl a 0,9%, em temperatura ambiente, até o laboratório. O tempo de transporte entre o local de coleta e o início do processamento do material foi de 50 a 60 minutos. No laboratório, os ovários foram lavados em álcool a 70,0%, durante 10 segundos e em seguida lavados em solução salina por mais 10 segundos. Dos doze ovários se retiraram 36 fragmentos com aproximadamente 3 mm x 1 mm cada um, que foram distribuídos aleatoriamente para três tratamentos: T<sub>0</sub> – controle, fixados imediatamente; T<sub>I</sub> – expostos aos crioprotetores e T<sub>II</sub> – expostos aos crioprotetores e vitrificados.

No T<sub>II</sub> 12 fragmentos foram expostos quatro minutos em solução de vitrificação 1, composta de 10% de etileno-glicol e 10% de DMSO; em seguida, os fragmentos foram transferidos para a solução de vitrificação 2, formada de 20% de etileno-glicol e 20% de DMSO acrescida de 0,5 M de sacarose, na qual permaneceu durante um minuto. Com o auxílio de uma seringa os fragmentos foram envasados em palhetas plásticas de 0,5 mL e submersas verticalmente em nitrogênio líquido, mantendo-se vitrificados por 48 h; após este período realizou-se a desvitrificação mergulhando-se as palhetas em solução de sacarose a 0,25 M, onde permaneceram por cinco minutos a temperatura de 30 °C e logo depois transferidos para a solução de sacarose a 0,15 M por mais cinco minutos; enfim, foram colocados em solução de NaCl a 0,9% para estabilização.

Os fragmentos no T<sub>I</sub> destinados apenas ao teste de toxicidade foram expostos nas mesmas soluções crioprotetoras e tempos de exposições como no T<sub>II</sub>; após a exposição, os fragmentos foram fixados em Carnoy durante 12 h e submetidos a rotina histológica clássica.

Para a análise folicular usou-se o microscópio óptico em aumento de 400 x; inicialmente, realizou-se a classificação dos folículos pré-antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento como: primordiais: uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa ou pavimentosa-cubóide ao redor do ovócito; primários: uma única camada de células da granulosa de forma cuboidal, e pequenos secundários: duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Em todas as classes foliculares se realizaram a contagem do número de células da granulosa, a análise da cromatina nuclear e a morfométrica, através de microscópio óptico equipado com ocular com escala micrométrica, conforme Kacinskis et al. (2005). A cromatina nuclear foi considerada fisiológica quando apresentava distribuição característica da prófase I da meiose. Folículos com cromatina condensada, picnótica ou fragmentada foram considerados núcleos patológicos; independente de tratamento, os resultados foram submetidos a ANOVA e as comparações entre as médias feitas pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta o efeito da associação dos crioprotetores etileno-glicol, DMSO e sacarose e da vitrificação, na estrutura folicular, correspondente a morfometria, número de células da granulosa e configuração da cromatina nuclear. Analisaram-se 133 folículos inclusos em tecido ovariano, entre folículos primordiais (84) e primários (49). Os folículos secundários não foram computados em função do reduzido número de estruturas encontradas. Os valores obtidos quanto à análise morfométrica referente a folículo e ovócito e ao número de células da granulosa de folículos primordiais e primários, dos três tratamentos, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Diâmetro do folículo (mm) e do ovócito (mm) e número de células da granulosa (média  $\pm$  desvio padrão) de folículos primordiais no  $T_0$  (controle),  $T_I$  (teste de toxicidade) e  $T_{II}$  (vitrificação)\*

**Table 1.** Follicle and oocyte diameter (mm) and number of granulosa cells (mean  $\pm$  standard deviation) of primordial follicles in the  $T_0$  (control),  $T_I$  (toxicity test) and  $T_{II}$  (vitrification)\*

Tratamento	n	Diâmetro do Folículo	Diâmetro do Ovócito	N de Células da Granulosa
$T_0$	25	30,84 $\pm$ 4,37 (22-45)	22,4 $\pm$ 4,81 (10-35)	6,52 $\pm$ 2,04 (2-12)
$T_I$	31	27,61 $\pm$ 4,45 (20-37)	21,41 $\pm$ 2,68 (15-27)	5,93 $\pm$ 2,04 (1-9)
$T_{II}$	28	29,07 $\pm$ 5,21 (20-40)	21,25 $\pm$ 4,55 (12-30)	5,89 $\pm$ 2,06 (2-11)

\*Números entre parênteses correspondem às variações

**Tabela 2.** Diâmetro do folículo (mm) e ovócito (mm) e número de células da granulosa (média  $\pm$  desvio padrão) de folículos primários no  $T_0$  (controle),  $T_I$  (teste de toxicidade) e  $T_{II}$  (vitrificação)\*

**Table 2.** Follicle and oocyte diameter (mm) and number of granulosa cells (mean  $\pm$  standard deviation) of primary follicles in the  $T_0$  (control),  $T_I$  (toxicity test) and  $T_{II}$  (vitrification)\*

Tratamento	n	Diâmetro do Folículo	Diâmetro do Ovócito	N de Células da Granulosa
$T_0$	19	48,05 $\pm$ 14,77 (30-90) <sup>a</sup>	27,31 $\pm$ 7,17 (15-37) <sup>a</sup>	14,84 $\pm$ 4,07 (8-23) <sup>a</sup>
$T_I$	15	36,4 $\pm$ 8,56 (25-60) <sup>b</sup>	23,46 $\pm$ 4,25 (17-30) <sup>a</sup>	10,73 $\pm$ 2,65 (7-16) <sup>b</sup>
$T_{II}$	15	34,33 $\pm$ 9,15 (25-55) <sup>b</sup>	26,86 $\pm$ 8,28 (17-45) <sup>a</sup>	10,20 $\pm$ 3,7 (8-18) <sup>b</sup>

\*Números entre parênteses correspondem às variações; <sup>a,b</sup> Sobrescritos diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Comparando-se as médias morfométricas dos números de células da granulosa dos folículos primordiais, nota-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ; Tabela 1), indicando que os crioprotetores usados e a vitrificação não afetaram os parâmetros analisados, mas, com relação aos folículos primários, observaram-se alterações morfométricas e no número de células da granulosa ( $p < 0,05$ ; Tabela 2). As deformações encontradas nos folículos primários podem ser atribuídas às diferenças de pressões osmóticas entre o ambiente intra e o extracelular, exercidas pelos crioprotetores que levam a mudanças de volume dos ovócitos que, por sua vez, podem causar danos na membrana plasmática e organelas (Hotamisligil, 1996).

Em referência à questão da resistência das classes foliculares, a criopreservação ainda é bastante discutida e necessita de elucidacões. De acordo com Santos et al. (2006), os folículos primordiais apresentam maiores chances de resistirem aos processos de criopreservação. Por outro lado, Gan-

dolfi et al. (2006) indicam que folículos primordiais são mais susceptíveis ao processo de criopreservação, resultados que diferem de Lucci et al. (2004) que não encontraram diferenças nas classes de folículos ovarianos bovinos, isto é, primordiais, primários e secundários, quando criopreservados. Thomaz et al. (2005) descrevem que em tecido ovariano de coelhas apenas os folículos primordiais suportaram a criopreservação e, por conseqüência, foram considerados mais resistentes.

Os resultados relativos às análises das cromatinas nucleares se encontram na Tabela 3; para esta análise, os folículos primordiais e primários foram analisados de forma conjunta.

Quanto à cromatina nuclear, os folículos pré-antrais se acham bloqueados na prófase I da meiose, sendo de fundamental importância a manutenção da configuração morfológica da cromatina para o sucesso do desenvolvimento folicular. Demirci et al. (2002) descrevem, após a congelação lenta de tecido ovariano de ovelhas, porcentagens de anormalidades nucleares que variaram de 12,0 a 22,0. No presente estudo se observaram alterações da morfologia da cromatina nuclear, em que no  $T_I$  se registraram apenas 24,1% e nenhum normal no  $T_{II}$ ; neste sentido e se analisando os resultados, vê-se que os parâmetros relativos à morfometria e às células da granulosa, são mais resistentes às crioinjúrias que os parâmetros nucleares, uma vez que os folículos primordiais, que são maioria no córtex ovariano, em proporções superiores a 90,0% (Gandolfi et al., 2006) não sofreram alterações quando comparados com o  $T_0$ , embora alterações nucleares tenham sido encontradas em todos os folículos analisados, indicando que o processo de vitrificação usado não foi apropriado para a criopreservação de tecido ovariano bovino, porém na congelação lenta Thomaz et al. (2005) encontraram 70,0% de irregularidade na distribuição da cromatina e 30,0% de picnose em folículos de coelho, mostrando que aspectos nucleares são bastante susceptíveis à congelação.

**Tabela 3.** Cromatina nuclear dos folículos pré-antrais no  $T_0$  (controle),  $T_I$  (teste de toxicidade) e  $T_{II}$  (vitrificação)\*

**Table 3.** Nuclear chromatin of bovine preantral follicles in the  $T_0$  (control),  $T_I$  (toxicity test) and  $T_{II}$  (vitrification)\*

Tratamento	n	Cromatina nuclear normal (%)
$T_0$	29	21 (72,4) <sup>a</sup>
$T_I$	29	7 (24,1) <sup>b</sup>
$T_{II}$	38	0 <sup>c</sup>

\* Sobrescritos diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Gandolfi et al. (2006) compararam duas técnicas de vitrificação com a técnica de congelação lenta usando fragmentos ovarianos de humanos, suínos e bovinos, e concluíram que a vitrificação, independentemente de espécie, classe folicular e técnica, não foi adequada para a preservação de folículos pré-antrais quando comparada com a técnica de congelação lenta. Têm-se obtido excelentes resultados com a congelação lenta de tecido ovariano bovino, em determinados estudos, mais de 70% de preservação da normalidade folicular (Paynter et al., 1999; Lucci et al., 2004; Lamaita et al., 2005; Celestino et al., 2007), levando a assumir que a técnica de congela-

ção lenta é a mais apropriada para criopreservação de tecido ovariano bovino. Quanto aos resultados alcançados com a vitrificação no presente estudo, são similares aos obtidos por Gandolfi et al. (2006) ao usarem a mesma técnica, o que leva a concluir pela necessidade de mais estudos em bovinos.

A vitrificação de tecido ovariano vem sendo empregada com sucesso em algumas espécies. Santos et al. (2007) obtiveram, em caprinos, preservação tecidual adequada com o uso de duas técnicas de vitrificação, isto é, a convencional e a solid-surface vitrification (SSV); entretanto, melhores resultados foram obtidos com SSV, sinal de que, além da espécie, a técnica também pode influenciar nos resultados. Ishijima et al. (2006) usando, em solução única, DMSO a 2 M, acetamida a 1 M e propileno-glicol a 3 M, obtiveram excelentes resultados na vitrificação de fragmentos ovarianos de cães, mostrando que a associação de crioprotetores é uma alternativa que deve ser considerada.

A associação dos crioprotetores etileno-glicol e DMSO acrescida de sacarose tem sido usada com sucesso em ovócitos antrais (Vajta et al., 1998); entretanto, a literatura científica registra efeitos deletérios em relação ao crioprotetor etileno-glicol na criopreservação de folículos pré-antrais bovinos inclusos em tecido ovariano. Lucci et al. (2004) encontraram mais alterações nucleares, do tipo picnose, com o uso do etileno-glicol quando comparado com o glicerol, propileno-glicol e DMSO, em fragmentos de tecido ovariano bovino. Luna et al. (2007) também descrevem alterações na cromatina nuclear de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano após exposição ao etileno-glicol em concentrações de 20 a 40%; assim, os resultados de toxicidade ( $T_1$ ) mostraram diferenças quanto à morfometria de folículos primários e baixa ocorrência de folículos com cromatinas normais (24,1%) quando comparados com o  $T_0$  (72,4%); referidos resultados indicam que parte do insucesso com a técnica de vitrificação pode ser atribuída ao efeito tóxico e ao choque osmótico causado pelos crioprotetores.

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

## CONCLUSÃO

A vitrificação de fragmentos de tecido ovariano pode ser usada em bovinos, entretanto, é necessário o aperfeiçoamento do protocolo para reduções de modificações morfológicas nos folículos pré-antrais, em especial de alterações nucleares.

## LITERATURA CITADA

- Al-aghbari, A.M.; Menino, A.R. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*, v.71, n.1-2, p.101-110, 2002.
- Aubard, Y.; Poirot, C.; Piver, P.; Galinat, S.; Teissier, M.P. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? *Fertility and Sterility*, v.76, n.2, p.414-415, 2001.
- Celestino, J.J.; Santos, R.R.; Lopes, C.A.P.; Martins, F.S.; Matos, M.H.T.; Melo, M.A.P.; Bão, 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*, 2007.
- 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, n.4, p.595-600, 2002.
- Donnez, J.; Bassil, S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Human Reproduction*, v.4, n.3, p.248-259, 1998.
- Donnez, J.; Dolmans, M.M.; Demylle, D.; Jadoul, P.; Pirard, C.; Squifflet, T.; Martinez-Madrid, B.; Van Langendonck, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v.364, n.9450, p.1405-1410, 2004.
- Gandolfi, F.; Paffoni, A.; Brambilla, E.P.; Bonetti, S.; Brevini, T.A.L.; 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, n.1, p.1150-1156, 2006.
- Gosden, R.G.; Baird, D.T.; Wade, J.C.; Webb, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Human Reproduction*, v.9, n.4, p.597-603, 1994.
- Holt, W.V. The roles of cryobiology and reproductive technology in the conservation of biodiversity. *Cryo-Letters*, v.40, p.47-55, 1997.
- Hotamisligil, S.; Toner, M.; Powers, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biology of Reproduction*, v.55, n.1, p.161-168, 1996.
- Isachenko, E.; Isachenko, V.; Ramih, G.; Nawroth, F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European Journal Obstetrics Gynecology Reproductive Biology*, v.108, n.2, p.186-193, 2003.
- 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. *Journal of Reproduction and Development*, v.52, n.2, p.293-299, 2006.

- Kacinskis, M.A.; Lucci, C.M.; Luque, M.; Bão, S.N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 87, n.1-2, p.45-57, 2005.
- Kim, S.S.; Battaglia, D.E.; Soules, M.R. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertility and Sterility*, v.75, n.6, p.1049-1056, 2001.
- Lamaita, R.N.; Bambilra, E.A.; Camargos, M.G.; Silva-Filho, A.L.; Reis, F.M.; Camargos, A.F. Histological evaluation of the effects of cryopreservation in bovine ovarian tissue. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.22, n.2, p.105-106, 2005.
- Lucci, C.M.; Kacinskis, M.; Lopes, L. H. R.; Rumpf, R.; Bão, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Therogenology*, v.61, n.6, p.1101-1114, 2004.
- Luna, H.S.; Lijeron, L.A.; Costa, R.N. Diferentes concentrações de etileno-glicol na organização da cromatina nuclear de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino (*Bos indicus*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, n.2, p.105-111, 2007.
- Lundy, T.; Smith, P.; O'Connell, A.; Hudson, N.L.; McNatty, K.P. Population of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal Reproduction Fertility*, v.115, n.2, p.251-262, 1999.
- Migishima, F.; Suzuki-Migishima, R.; Song, S.Y.; Kuramochi, T.; Azuma, S.; Nishijima, M. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biology of Reproduction*, v.68, n.3, p.881-887, 2003.
- Oktay, K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and applications for cancer patients. *Human Reproduction*, v.7, n.6, p.526-534, 2001.
- Oktay, K.; Karlikaya, G. Ovarian function after autologous transplantation of frozen banked autologous ovarian tissue. *New England Journal of Medicine*, v.342, n.25, p.1919, 2000.
- Paynter, S.J.; Cooper, A.; Fuller, B.J.; Shaw, R.W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology*, v.38, n.4, p.301-309, 1999.
- Posada, M.N.; Kolp, L.; Garcya, J.E. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. *Fertility and Sterility*, v.75, n.4, p.647-656, 2001.
- Salehnia, M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Experimental Animal*, v.51, n.5, p.509-512, 2002.
- Santos, R.R.; Rodrigues, A.P.R.; Costa, S.H.F.; Matos, M.H.T.; Silva, J.R.V.; Celestino, J.J.H.; Martins, F.S.; Saraiva, M.V.A.; Melo, M.A.; Figueiredo, J.R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.43, n.2, p.250-255, 2006.
- Santos, R.R.; 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 Research*, v.327, n.1, p.167-176, 2007.
- Thomaz, B.A.C.; Simões, M.L.P.B.; Almodin, C.G.; Câmara, V.C.M.; Ceschin, A.P.; Ioshii, S.O. Aspectos histológicos de ovários de coelhas após criopreservação. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*, v.27, n.11, p.642-649, 2005.
- Vajta, G.; Holm, 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 Development*, v.51, n.1, p.53-58, 1998.
- Yavin, S.; Arav, A. Measurement of essential physical properties of vitrification Solutions. *Therogenology*, v.67, p.81-89, 2007.