

Exposição de diferentes crioprotetores e concentrações sobre o diâmetro e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos

Exposure of different cryoprotectants and concentrations on diameter and number of the granulosa cells of bovine preantral follicles

COSTA, Rafaela Nelson da¹; LUNA, Hélder Silva e²; LIJERON, Luciana Alves³;
ZÚCCARI, Carmem Estefânia Serra Neto¹; LAURA, Iraceles Aparecida³

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Ciências Naturais, Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Morfofisiologia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

*Endereço para correspondência: hluna@ceua.ufms.br

RESUMO

O objetivo, no presente estudo, foi avaliar o efeito do glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol (PROH) sobre o diâmetro do folículo, do ovócito e do número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos. Fragmentos ovarianos foram imediatamente fixados em Carnoy (controle) ou expostos aos crioprotetores nas concentrações de 20 e 40%, por 10min. Após o período de exposição, o tecido ovariano também foi fixado em Carnoy e processado para inclusão em parafina. Cinco secções de tecido ovariano foram coradas em hematoxilina e eosina e analisadas ao microscópio de luz com ocular em escala micrométrica. Os dados foram analisados por ANOVA e teste Tukey. Em relação ao diâmetro do folículo primordial, nenhuma diferença foi encontrada entre o controle e os grupos expostos aos crioprotetores. Entretanto, em relação ao diâmetro do ovócito, na concentração de 40%, para todos os crioprotetores testados, os ovócitos primordiais apresentaram redução significativa do diâmetro, o que incluiu o PROH a 20%. Nas estruturas primárias, ocorreu redução dos ovócitos e folículos somente com o glicerol a 40%. Com relação ao número de células da granulosa das estruturas primordiais, o DMSO a 40% e o PROH a 20 e 40% levaram a redução significativa do diâmetro dos ovócitos e folículos em comparação ao grupo controle. Os

folículos primários, para todos os crioprotetores testados, não apresentaram alterações quanto ao número de células da granulosa. Em conclusão, os folículos primários mostraram-se resistentes aos efeitos dos crioprotetores. Em relação aos folículos primordiais, o glicerol, dimetilsulfóxido e propilenoglicol levaram à redução do diâmetro do ovócito e do número de células da granulosa, mas não do diâmetro folicular.

Palavras-chave: biotecnologia, criopreservação, ovário

SUMMARY

This study evaluated the effect of glycerol (GLY), dimethyl sulfoxide (DMSO) and propylene glycol (PROH) in diameter of follicle, of oocyte and of granulosa cells number of preantral follicles cattle. Ovarian fragments were exposed to cryoprotectants at concentrations of 20 and 40% for 10 min. Then, the tissue was fixed in Carnoy and processed by traditional technique of histology. Slides were stained by hematoxylin and eosin and evaluated under optical microscope equipped with eyes wide with morphometric. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test. Regarding diameter of the follicle, no difference was found among the control and the groups exposed to the cryoprotectants. However, in relation to the

diameter of the oocyte, 40% concentration in all tested cryoprotectants the primary follicles showed reduction in diameter, including 20% of propylene glycol. For primary follicles, only 40% of glycerol presented difference from control group. For the granulosa cells 40% of DMSO and 20 and 40% of PROH showed significant reduction compared to control group, in primary follicles. In conclusion primary follicles were resistant to cryoprotectants effects. For the primary structures, glycerol, dimethyl sulfoxide and propylene glycol led to reduction of diameter of oocyte and number of granulosa cells but not of follicular diameter.

Keywords: biotechnology, cryopreservation, ovary

INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido ovariano é uma importante biotecnologia para formação de bancos de germoplasma animal. Existem relatos de criopreservação de tecido ovariano em diferentes espécies de animais, a exemplo de camundongos (CANDY et al., 1997), marmotas (CANDY et al., 1995), gatos (LIMA et al., 2006), ovinos (SANTOS et al., 2006), caprinos (SANTOS et al., 2007), suínos e bovinos (GANDOLFI et al., 2006). Entre os folículos ovarianos, os pré-antrais, que são a maioria no ovário, apresentam características que os tornam menos sensíveis ao processo de criopreservação, como tamanho reduzido, baixa taxa metabólica, ausência de zona pelúcida e grânulos corticais periféricos (LUCCI et al., 2004).

Vários crioprotetores são utilizados para a congelação de tecido ovariano bovino, em que se destacam o dimetilsulfóxido (DMSO), o etilenoglicol (EG), propilenoglicol (PROH) e glicerol (GLI). Entretanto, existem diferenças inerentes a cada crioprotetor, quanto à eficiência na preservação tecidual

(LUCCI et al., 2004), além de possíveis variabilidades nas respostas entre as diferentes espécies e protocolos de congelação (GANDOLFI et al., 2006). Estudos sobre o efeito do processo de criopreservação na morfologia de folículos pré-antrais de bovinos têm sido realizados (PAYNTER et al., 1999; LUCCI et al., 2004), entretanto, trabalhos relacionados ao diâmetro do folículo e ao número de células da granulosa são escassos (LUNA & MUNHOZ, 2008). Esses parâmetros podem indicar efeitos deletérios dos crioprotetores e contribuir na busca de protocolos mais eficientes na criopreservação tecidual. Alterações desses parâmetros têm sido relatadas em folículos isolados de tecido ovariano criopreservados de camundongos (NEWTON & ILLINGWORTH, 2001; SEGINO et al., 2003), mas não em bovinos. O objetivo, no presente estudo, foi avaliar o efeito do GLI, DMSO e propilenoglicol (PROH) sobre o diâmetro do folículo e do ovócito, assim como do número de células da granulosa de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois ovários bovinos (*Bos indicus*) oriundos de diferentes animais foram obtidos em abatedouro e transportados ao laboratório em bolsa plástica com solução salina (NaCl a 0,9%), dentro de um período de 50-60 min à temperatura ambiente (28-30 °C). Os ovários foram lavados em álcool 70% e, logo em seguida, com solução salina. Fragmentos de 5 x 3 mm (n=35) foram retirados da parte cortical do ovário e distribuídos, aleatoriamente, entre grupos controle (sem crioprotetor e fixado imediatamente em Carnoy) e

tratamentos, e foram expostos por 10 min em glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO) ou propilenoglicol (PROH) nas concentrações de 20 e 40% em solução salina na temperatura de 30 °C. A exposição foi realizada de forma gradual, da menor concentração (10%) para as maiores concentrações (20 e 40%), por período de 1 minuto em cada concentração. Posteriormente, para a retirada do crioprotetor, procedeu-se inversamente, com as mesmas concentrações e o mesmo período de tempo. Após a exposição, os fragmentos foram fixados em Carnoy por 12h. As amostras foram submetidas à rotina histológica para inclusão em parafina e seccionadas a 5 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscópio de luz em aumento de 400X.

Os folículos foram classificados, de acordo com o estágio de desenvolvimento, em primordiais (uma camada de células da granulosa pavimentosa ou pavimentosa-cúbica ao redor do ovócito) e primários (uma camada de células da granulosa cúbica ao redor do ovócito). Após a classificação folicular, os diâmetros do

folículo e do ovócito foram mensurados com uso de ocular com escala micrométrica (KACINSKIS et al., 2005). Em todas as classes foliculares, foi contado o número de células da granulosa. Os dados foram analisados por ANOVA e pelo teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo *software* BIOESTAT 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o estudo de poucos ovários é possível a avaliação de centenas de folículos pré-antrais para análises morfológicas, em diferentes espécies animais (LUCCI et al., 2004; LUCCI et al., 2007). No presente estudo, foram observados 633 folículos pré-antrais, dos quais 550 eram primordiais e 83 primários, distribuídos nos diferentes grupos. Em relação ao diâmetro dos folículos, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos controle e aqueles expostos aos crioprotetores ($P > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão do diâmetro de folículos primordiais e primários dos grupos controle, glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol (PROH)

Grupos	Primordiais	Primários
Controle*	35,5±5,8 (25-50) ¹	52,0±8,3 (37,5-62,5)
20% GLI	36,0±6,6 (25-52)	45,9±6,6 (30-75)
40% GLI	33,3±5,6 (25-52,5)	43,9 ±6,5 (35-60)
20% DMSO	37,6±5,6 (27,5-55)	49,2±9,7 (35-70)
40% DMSO	35,8±5,6 (27,5-52,5)	51,6±9,3 (37,5-62,5)
20% PROH	33,3±4,8 (25-47,5)	49,3±9,1 (35-67,5)
40% PROH	35,0±3,9 (25-42,5)	50,6±8,3 (40-65)

*Não houve diferença significativa entre os grupos controle e testados ($P > 0,05$).

¹Dados entre parênteses correspondem aos valores mínimos e máximos em micrômetros (µm).

Em relação ao diâmetro dos ovócitos primordiais, todos crioprotetores na concentração de 40% levaram à redução do diâmetro, quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$). Na concentração de 20% apenas o propilenoglicol induziu a redução do diâmetro dos ovócitos. Em relação aos ovócitos primários, somente o glicerol a 40% diferiu do grupo controle ($P < 0,05$; Tabela 2).

Em relação ao número de células da granulosa, o dimetilsulfóxido a 40% e o propilenoglicol a 20% e a 40% apresentaram redução significativa ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle, o qual não diferiu do glicerol ($P > 0,05$), nos folículos primordiais. Os folículos primários não sofreram alterações quanto ao número de células da granulosa ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 2. Média e desvio padrão do diâmetro ovocitário de folículos primordiais e primários dos grupos controle e expostos ao glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol (PROH)

Grupos	Primordiais	Primários
Controle	26,8±4,8 (15-35) ^{a1}	31,7±4 (27,5-37,5) ^a
20% GLI	25,2±4,7 (15-35) ^a	28,8±6,9 (20-37,5) ^a
40% GLI	23,9±3,2 (17,5-32) ^b	24±5 (17,5-35) ^b
20% DMSO	27,5±4,7 (15-40) ^a	30±3,6 (25-37,5) ^a
40% DMSO	24,1±4,2 (15-42) ^b	35,5±3,2 (30-37,5) ^a
20% PROH	24,2±3,9 (17,5-35) ^b	30,9±7,1 (27,5-37,5) ^a
40% PROH	24,6± 3,7 (15-32,5) ^b	31,8±5,3 (25-42,5) ^a

^{a, b}Diferentes sobrescritos na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

¹Dados entre parênteses correspondem aos valores mínimos e máximos em micrômetros (μm).

Tabela 3. Média e desvio padrão do número de células da granulosa de folículos primordiais e primários dos grupos controle e expostos ao glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol (PROH)

Grupos	Primordiais	Primários
Controle	8,0±2,6 (3-13) ^{a1}	19,7 (14-31)
20% GLI	8,0±2,9 (2-13) ^a	17,3 (14-26)
40% GLI	7,0±2,7 (3-13) ^a	16,5 (14-23)
20% DMSO	8,2±2,7 (2-13) ^a	19,0 (14-29)
40% DMSO	6,5±2,4 (2-12) ^b	18,1 (14-27)
20% PROH	6,6±2,9 (2-13) ^b	18,2 (14-28)
40% PROH	6,5±2,8 (1-13) ^b	16,9 (14-24)

^{a, b}Diferentes sobrescritos na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

¹Dados entre parênteses correspondem aos valores mínimos e máximos em micrômetros (μm).

Altas concentrações de crioprotetores são usadas para a técnica de vitrificação que, por sua vez, apresenta como vantagens rapidez na execução, praticidade e baixo custo quando comparada à execução da técnica de congelamento lento para a preservação de tecido ovariano bovino. Porém, a vitrificação ainda apresenta resultados limitados (GANDOLFI et al., 2006). Comumente, elevadas concentrações de crioprotetores podem levar a efeitos tóxicos ou choque osmótico nos sistemas celulares (YAVIN & ARAV, 2007). Nesse sentido, o presente estudo comparou diferentes crioprotetores em concentrações de 20 e 40% sobre a morfologia de folículos pré-antrais. Para isso, foi analisado o diâmetro do folículo e do ovócito, assim como o número de células da granulosa (primordiais e primários) antes (controle) e após exposição aos crioprotetores. Esses parâmetros têm sido relatados em *Bos taurus* e *Bos indicus* para caracterização de classes foliculares, resultados que mostram similaridades entre as subespécies bovinas (VAN WEZEL & RODGERS, 1996; HYTTEL et al., 1997; KACINSKIS et al., 2005).

Os folículos pré-antrais podem ser estudados no tecido ovariano em função de sua fase de desenvolvimento. Relatos mostram que as classes foliculares podem influenciar na resistência aos processos de criopreservação, e esse aspecto é discutido na literatura. Santos et al. (2007) mostraram que folículos primordiais de cabras são mais resistentes que os folículos primários. Porém, Gandolfi et al. (2006) indicam que folículos primordiais de bovinos são mais susceptíveis ao processo de criopreservação, e Lucci et al. (2004) não encontraram diferença entre as classes foliculares criopreservadas de bovinos. Thomaz et al. (2005), em

estudo com coelhos, consideraram os primordiais mais resistentes. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, os folículos primários mostraram-se mais resistentes aos efeitos dos crioprotetores ao considerar o diâmetro folicular e o número de células da granulosa, com exceção do glicerol na concentração de 40%, que levou à redução do tamanho do ovócito. Em relação a esse efeito, estudos em diferentes espécies mostram que altas concentrações de glicerol podem promover elevado grau de desidratação e choque osmótico nos folículos pré-antrais, caracterizada por severa alteração morfológica folicular e separação do estroma ovariano (CANDY et al., 1997; LUCCI et al., 2004).

Na análise morfométrica do folículo, não foram observadas diferenças significativas, tanto nos primordiais como nos primários, para os três crioprotetores testados, em comparação ao grupo controle ($P > 0,05$). Entretanto, observaram-se diferenças no diâmetro do ovócito, quando utilizada a concentração de 40% em todos crioprotetores e no caso do PROH mesmo a 20%. Esses resultados mostram que os ovócitos são sensíveis aos efeitos osmóticos dos crioprotetores. O tempo de exposição usado no presente estudo foi de 10 min, período suficiente para causar redução no diâmetro dos ovócitos, fenômeno que indica necessidade de redução no tempo de exposição aos crioprotetores. Porém, o período tempo para reidratação pode ter sido pouco, o que sugere redução de volume nas estruturas analisadas.

Quanto ao número de células da granulosa, somente os folículos primordiais expostos ao DMSO a 40% e ao PROH a 20 e 40% mostraram redução na comparação com o grupo

controle. Esse fato pode ser explicado pela baixa permeabilidade celular do glicerol, o que o torna pouco tóxico, porém pouco eficaz na preservação de tecido ovariano (NEWTON et al., 1998). Esse crioprotetor tem sido considerado o menos eficiente na preservação celular após criopreservação embrionária, conforme alterações ultraestruturais (COCERO et al., 2002).

A redução do número de células da granulosa pelos crioprotetores estudados confirma os achados de Lucci et al. (2004), que, pela análise de microscopia eletrônica do complexo células da granulosa-ovócito, em tecido ovariano bovino, constatou perdas de citoplasma das células da granulosa após uso de altas concentrações de DMSO e PROH. Esses autores sugerem que os danos em poucas células não são graves, uma vez que essas células podem se proliferar durante o desenvolvimento folicular e recuperar a perda de uma ou duas células. Entretanto, caso a população de células da granulosa não se recomponha, o desenvolvimento folicular pode ser prejudicado, especialmente em folículos obtidos de tecido ovariano criopreservado (CHOI et al., 2008).

Fair et al. (1997) afirma ainda que o desenvolvimento e a reestruturação das células da granulosa são as primeiras características morfológicas observadas na ativação do folículo primordial.

O PROH foi o crioprotetor mais tóxico, pois afetou o diâmetro ovocitário e o número de células da granulosa nas duas concentrações usadas (20% e 40%). Nesse sentido, Lim et al. (1999) relatam que o propilenoglicol apresenta ação citotóxica elevada quando usada em concentrações acima de 1,5 M. Em relação ao DMSO, as estruturas primordiais expostas à concentração de 40% reduziram o diâmetro do ovócito e o número de células da granulosa.

Paynter et al. (1999), ao utilizarem concentrações menores de DMSO (cerca de 10%) relativas ao presente trabalho, para criopreservação de fragmentos de tecido ovariano bovino, observaram significativa redução da normalidade morfológica dos folículos pré-antrais. Entretanto, após cultivo dos fragmentos, notou-se, tanto no grupo apenas exposto ao crioprotetor como no criopreservado, redução do índice de anormalidades, o que demonstra capacidade folicular de reabilitação das lesões adquiridas durante o processo de criopreservação. A escolha de crioprotetores adequados aos protocolos de criopreservação é fundamental para o sucesso do desenvolvimento folicular *in vitro* e consequente obtenção de ovócitos aptos à fecundação.

Em conclusão, as estruturas primárias mostraram-se resistentes aos efeitos dos crioprotetores. O glicerol, o dimetilsulfóxido e o propilenoglicol levaram a reduções dos diâmetros dos ovócitos e do número de células da granulosa das estruturas primordiais, mas não do diâmetro folicular.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundect e à UFMS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v.10, n.9, p.2334-2338, 1995. [[Links](#)].

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, n.1, p.11-19, 1997. [[Links](#)].

COCERO, M.J.; MORENO, D.; DE LA ESPINA, S.; AGUILAR, B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v.66, n.5, p.1244-1258, 2002. [[Links](#)].

CHOI, J.; LEE, B.; LEE, E.; YOON, B.; BAE, D.; CHOI, D. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. **Cryobiology**, v.56, n.1, p.36-42, 2008. [[Links](#)].

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v.195, n.4, p.327-336, 1997. [[Links](#)].

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. [[Links](#)].

HYTTEL P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.23-32, 1997. [[Links](#)].

KACINSKIS, M.A.; LUCCI, C.M.; LUQUE, M.C.A.; BAO, S. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.87, n.1-2, p.45-57, 2005. [[Links](#)].

LIM, J.; KO, J.; HWANG, W.; CHUNG, H.; NIWA, K. Development of in vitro matured bovine oocyte after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.51, n.7, p.1303-1310, 1999. [[Links](#)].

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, n. 6-7, p.1664-1666, 2006. [[Links](#)].

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.; 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. **Therogenology**, v.61, n.6, p.1101-1114, 2004. [[Links](#)].

LUCCI, C.M.; SCHREIER, L.L.; MACHADO, G.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; DOBRINSKY, J.R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20 °C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. **Reproduction Domestic Animal**, v.42, n.1, p.76-82, 2007. [[Links](#)].

LUNA, H.S.; MUNHOZ, A.L.R.
Morfometria e número de células da granulosa de folículos ovarianos pré-antrais de bovinos (*Bos indicus*) preservados a 4 °C em solução salina por diferentes períodos de tempo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p.172-177, 2008. [[Links](#)].

NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J.R.; PEGG, D.E.; FADDY, M.J.; GOSDEN, R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cyopreservation. **Human Reproduction**, v.13, n.2, p.376–378, 1998. [[Links](#)].

NEWTON, H.; ILLINGWORTH, P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.16, n.3, p.423–429, 2001. [[Links](#)].

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. [[Links](#)].

SANTOS, R.R; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; SILVA, J.R.V.; MATOS, M.H.T.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural analysis of criopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, n.3-4, p.249-263, 2006. [[Links](#)].

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN T.; FIGUEIREDO J.R; SILVA, J.R; 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. [[Links](#)].

SEGINO, M.; IKEDA, M.; AOKI, S.; TOKIEDA, Y.; HIRAHARA, F.; SATO, K. In vitro culture of mouse GV oocytes and preantral follicles isolated from ovarian tissues cryopreserved by vitrification. **Human Cells**, v.16, n.3, p.109–116, 2003. [[Links](#)].

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 de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.11, p.642-649, 2005. [[Links](#)].

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p.1003–1011, 1996. [[Links](#)].

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification Solutions. **Theriogenology**, v. 67, n.1, p.81-89, 2007. [[Links](#)].

Data de recebimento: 22/04/2009

Data de aprovação: 29/01/2010