



## Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos

*Cryopreservation of ovarian preantral follicles from domestic animals*

Regiane Rodrigues Santos<sup>1,3</sup>, Juliana Jales de Hollanda Celestino<sup>2</sup>, Cláudio Afonso Pinho Lopes<sup>2</sup>, Mônica A P Melo<sup>2</sup>, Ana Paula Ribeiro Rodrigues<sup>2</sup>, José Ricardo de Figueiredo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Farm Animal Health, Utrecht University, The Netherlands

<sup>2</sup>Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Preantral Follicles-LAMOFOPA, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência: regianers@hotmail.com; tel: +55(31)3025-31190

### Resumo

A criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais, isolados ou inclusos no tecido ovariano, consiste em uma das alternativas para a formação de bancos genéticos de animais domésticos ou selvagens, para a preservação de raças e espécies em via de extinção. Além disso, é um método promissor para a preservação de ovários de mulheres submetidas a tratamentos quimio e radioterápicos e que desejam recuperar sua fertilidade após cura do câncer.

**Palavras-chave:** criopreservação, tecido ovariano, folículos pré-antrais.

### Abstract

*Cryopreservation of ovarian preantral follicles, isolated or enclosed in the ovarian tissue, consists in an alternative to implement gene banks for domestic animals and to preserve wild endangered breeds and species. Furthermore, it is a promising method to preserve ovarian tissue from women after cancer treatment, i.e. chemo- and radiotherapy, who wish to recover their fertility.*

**Keywords:** cryopreservation, ovarian tissue, preantral follicles.

### Introdução

A criopreservação de células e tecidos tem se tornado um importante tópico em estudos reprodutivos por ser uma forma de preservar gametas de espécies ou raças de animais em via de extinção, bem como para a restauração da fertilidade em mulheres submetidas a radio ou quimioterapia.

Avanços biotecnológicos têm sido cruciais para o diagnóstico precoce de doenças cancerígenas, permitindo um prognóstico favorável (Rozenberg *et al.*, 2007). Contudo, o tratamento consiste principalmente em radio e quimioterapia, podendo levar à esterilidade. Em homens, para a preservação da fertilidade, o sêmen é coletado, congelado e preservado para futuros procedimentos de inseminação artificial (IA) ou fecundação *in vitro* (FIV). Em mulheres, pelo contrário, existem vários desafios a serem superados, tais como a extrema sensibilidade de oócitos maduros à criopreservação e a falta de um sistema de cultivo *in vitro* para o completo desenvolvimento de folículos primordiais.

Infelizmente, o desenvolvimento tecnológico também tem resultado em problemas ambientais tais como destruição de *habitat* e subsequente extinção de espécies animais. No que se refere aos animais de produção, razões econômicas combinadas à supressão de barreiras geográficas, permitiram a introdução indiscriminada de material genético de animais exóticos nas fazendas e conseqüente diluição das raças nativas, as quais possuem características importantes como o vigor híbrido. Oócitos maduros de animais domésticos e silvestres são difíceis de serem preservados por terem também grande sensibilidade às crioinjúrias. Um complicador adicional no aprimoramento da eficácia dessa técnica nessas espécies é a coleta de tecido ovariano que ocorre geralmente longe dos laboratórios especializados em biotécnicas da reprodução. Além disso, poucos folículos podem ser puncionados para maturação e posterior FIV, somado à possibilidade de os ovários serem obtidos de fêmeas encontradas já mortas. Portanto, diante de todos esses inconvenientes, verifica-se a importância da preservação do tecido ovariano, bem como de folículos contendo oócitos imaturos para posterior aplicação em programas de reprodução. Esses oócitos imaturos podem ser encontrados envoltos por células foliculares constituindo os folículos pré-antrais (FOPA), os quais representam a maioria da população folicular no ovário.

A presente revisão visa informar os leitores sobre os métodos, riscos e sucesso da criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais, bem como seu estado atual e perspectivas para a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais oriundos de animais domésticos.

## Folículo ovariano

O folículo ovariano, estrutura altamente organizada, é basicamente constituído pelo oócito circundado por células foliculares e demarcado por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano. Além disso, é considerado a unidade morfo-funcional do ovário, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento, maturação oocitária e produção de hormônios (Gordon, 1994; Cortvrindt e Smitz, 2001). Figueiredo (1995) destaca que, dependendo da ausência ou presença de antro (cavidade repleta de líquido folicular circundando o oócito, e presente nos estádios finais de desenvolvimento do folículo ovariano), os folículos ovarianos são classificados em *pré-antrais* ou *antrais*, respectivamente.

Os folículos pré-antrais representam mais de 90% da população folicular do ovário (Saumande, 1981) e podem ser classificados em unilaminares (primordiais e primários) e multilaminares (secundários), de acordo com o número de camadas de células da granulosa circundando o oócito. Os folículos primordiais se encontram em estágio de quiescência (Cortvrindt e Smitz, 2001) e são compostos de um oócito imaturo circundado por uma única camada de células da granulosa de forma pavimentosa (Van den Hurk *et al.*, 1997). Cortvrindt e Smitz (2001) descrevem os folículos primários como sendo constituídos de um oócito em crescimento circundado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide, não possuindo células tecais diferenciadas e podendo apresentar uma zona pelúcida em formação. Os folículos secundários são caracterizados por um oócito inteiramente circundado por uma zona pelúcida e a presença de pelo menos duas camadas de células da granulosa de forma cubóide. Ao contrário dos folículos primordiais, os folículos primários e secundários são considerados folículos em estágio inicial de crescimento.

Os folículos antrais compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré-ovulatórios. Estes folículos são constituídos por um oócito circundado pela corona radiata e células do cumulus que conectam o oócito às células da granulosa, além das células tecais e uma cavidade contendo líquido folicular. Os folículos pré-ovulatórios apresentam todos os componentes presentes nos folículos terciários, contudo o oócito apresentar-se-á maduro e no estágio final do desenvolvimento folicular (Figueiredo, 1995).

De toda a população folicular presente no ovário, apenas cerca de 0,1% destes atingirá a ovulação (Nuttinck *et al.*, 1993), enquanto os demais folículos serão “perdidos” via atresia durante o desenvolvimento folicular (Carroll *et al.*, 1990; Ojala *et al.*, 2002). Aliada ao envelhecimento e morte fisiológica, a perda do material genético feminino pode ser ainda causada pela extinção de raças e espécies animais, bem como durante tratamentos radio e quimioterápicos. A recuperação de folículos ovarianos antes da atresia seguida de seu desenvolvimento *in vitro* ainda não é aplicável, em função da inexistência de um meio de cultivo que garanta a viabilidade e a maturação completa de folículos pré-antrais *in vitro*. Desta forma, o desenvolvimento de protocolos eficientes de criopreservação de tecido ovariano contendo os folículos *in situ* ou na forma isolada, permitirá a preservação dos gametas femininos até que eficientes sistemas de cultivo *in vitro* sejam completamente estabelecidos.

## Criopreservação

### *Princípios básicos*

A criopreservação consiste na preservação de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$ . Os únicos estados físicos existentes abaixo de aproximadamente  $-130^{\circ}\text{C}$  são o cristalino e o vítreo e, em ambos, a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo do tempo de armazenamento), a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrem muito lentamente ou são paralisadas completamente (Kartha, 1985). Portanto, à temperatura do nitrogênio líquido, a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por longos períodos de tempo, com manutenção da estabilidade do material genético (Stushnoff and Seufferheld, 1995). A capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende de sua tolerância aos agentes crioprotetores, desidratação, resfriamento e reaquecimento.

### *Agentes crioprotetores*

Agentes crioprotetores protegem as células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. Em geral, esses agentes podem agir (i) penetrando nas células (crioprotetores intracelulares) e substituindo as moléculas de água da célula, (ii) reduzindo o ponto de congelamento, (iii) protegendo membranas celulares (crioprotetores extracelulares) por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos, (iv) aumentando a viscosidade do meio, ou (v) diminuindo a concentração de eletrólitos durante criopreservação, diminuindo, assim, o risco de danos osmóticos. Contudo, agentes crioprotetores podem ser tóxicos, bem como podem facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células (Santos, 2007).

Dentre os agentes crioprotetores intracelulares, o glicerol, por exemplo, tem propriedades anti-

congelantes e é capaz de proteger a célula contra a desidratação. Entretanto, seu produto metabólico, isto é, o formaldeído, pode induzir acidose metabólica. Efeitos similares podem ser observados com outros agentes crioprotetores intracelulares como etilenoglicol e propilenoglicol após a conversão em oxalato e lactato, respectivamente. Apesar do seu efeito antioxidante, o dimetilsulfóxido aumenta a permeabilidade da membrana celular, o que pode permitir a entrada de agentes tóxicos dentro do compartimento celular (Santos, 2007).

Crioprotetores extracelulares, também conhecidos como agentes de alto peso molecular, aumentam a viscosidade da solução (por exemplo, o polivinil álcool) ou se ligam às cabeças dos grupos fosfolipídicos (açúcares, tais como sacarose e trealose), protegendo as membranas celulares contra as injúrias do frio. Uma outra substância comumente adicionada para “melhorar” a eficiência do meio de criopreservação consiste no soro fetal bovino. Contudo, a importância do soro na criopreservação não é cientificamente comprovada, além do risco de conter agentes infecciosos que não são destruídos durante os procedimentos de criopreservação (Santos, 2007).

#### *Criopreservação: métodos e danos*

O processo de criopreservação envolve basicamente as seguintes etapas: (1) adição de agente crioprotetor (período de equilíbrio/exposição); (2) resfriamento e indução da formação de gelo e congelação ou vitrificação; (3) estocagem em nitrogênio líquido; (4) descongelação ou aquecimento e (5) remoção ou diluição do agente crioprotetor. A criopreservação pode ser realizada por dois métodos básicos: congelação convencional ou lenta e vitrificação.

A congelação lenta é caracterizada pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de agente crioprotetor (~1,5 mol/l) (Paynter *et al.* 2000), por um período que pode variar de 20 (Rodrigues *et al.*, 2004a; b) a 60 minutos (Candy *et al.*, 1997). Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de 2°C/min até -4 a -9°C, mantendo-se nesta temperatura por um curto período (10 a 15 min) para a estabilização térmica e realização do *seeding*, o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular (Jondet *et al.*, 1984). Em seguida, a amostra continua sendo resfriada lentamente a uma velocidade de 0,3°C/min. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80°C), o material é estocado em nitrogênio líquido (-196°C).

A vitrificação (formação de estado vítreo) foi idealizada por Luyet em 1937. Depois de quase 50 anos, Rall e Fahy descreveram a vitrificação como uma alternativa ao processo de congelação lenta (Rall and Fahy, 1985). Ao contrário da congelação lenta, a vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de agente crioprotetor (geralmente entre 4 e 6 mol/L) por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), geralmente à temperatura ambiente, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo. De acordo com Stachecki e Cohen (2004), a vitrificação possui dois aspectos básicos a serem levados em consideração. O primeiro consiste no fato de que as altas concentrações de agentes crioprotetores utilizadas na exposição aumentam os efeitos tóxicos e, em segundo lugar, apesar desse efeito durante o período de equilíbrio, a vitrificação, por ser uma congelação altamente rápida, aumenta as taxas de sobrevivência.

Apesar da importância do processo de criopreservação, existem dois fatores que podem levar à morte celular durante a congelação/descongelação: a formação de gelo intracelular e o choque osmótico. Esses efeitos negativos podem ser reduzidos ou evitados com a utilização de agentes crioprotetores, que permitem preservar células vivas a temperaturas extremamente baixas (De La Vega and Wilde, 1991), bem como modificando o processo de criopreservação. De acordo com Stachecki e Cohen (2004), os efeitos do gelo intracelular e do choque osmótico são fatores letais se as células não são tratadas apropriadamente.

A formação de gelo intracelular é considerada um dos fatores mais importantes quando se deseja realizar um eficiente protocolo de criopreservação. Na congelação clássica (lenta), essa formação pode ser evitada com um resfriamento celular lento, permitindo a desidratação celular, sendo a água intracelular remanescente mantida em um potencial de equilíbrio com a solução extracelular e o gelo formado (Mazur *et al.*, 2005). Existem duas hipóteses para a formação de gelo intracelular. A primeira, postulada por Muldrey e McGann (1990), sugere que o gelo intracelular seja formado como conseqüência de danos ou defeitos na membrana plasmática, que permitiriam a passagem do gelo extracelular através da membrana (teoria do fluxo osmótico). Com o super-resfriamento celular durante a congelação, a força de efluxo da água para o meio extracelular atingiria um valor crítico e, conseqüentemente, causaria danos à membrana, permitindo a entrada do gelo extracelular para o meio intracelular. Uma outra hipótese é a de que o gelo extracelular em contato (direto ou indireto) com a membrana plasmática, causaria a formação de gelo intracelular, levando injúria ao conteúdo celular. Há duas versões para essa segunda hipótese. Na primeira, Toner *et al.* (1990) sugerem que o gelo extracelular provocaria uma mudança conformacional na membrana, que se transformaria em um nucleador heterogêneo dos conteúdos celulares (contato direto). Na segunda, postulada por Mazur (2004), o gelo extracelular cresceria através de poros preexistentes na membrana; tal contato direto levaria à formação de gelo intracelular.

Uma outra causa de morte celular consiste no efeito solução, que envolve uma alteração no citoplasma

como resultado da desidratação, aumento na concentração de soluto, alterações de pH, e precipitação de solutos (Mazur *et al.*, 1984). Por muito tempo, acreditou-se que a morte celular poderia ser causada pelo aumento da concentração de soluto fora da célula devido ao resfriamento e a congelamento da água extracelular (Lovelock, 1953). Contudo, recentes estudos têm reportado uma alta tolerância celular ao estresse osmótico. Agca *et al.* (2000) expuseram oócitos bovinos a crescentes concentrações de cloreto de sódio para elevar a osmolaridade a concentrações supravitais (até 4800 mOsm) e observaram que até 2400 mOsm, posteriormente os oócitos foram capazes de ser fecundados e foram obtidos blastocistos. Outros pesquisadores expuseram oócitos humanos e murinos a concentrações variáveis de agente crioprotetor ou açúcares sem resfriamento e observaram considerável tolerância celular às condições osmóticas impostas (Oda *et al.*, 1992; Hotamisligil *et al.*, 1996). Quando Toner *et al.* (1993) resfriaram zigotos murinos a  $-40^{\circ}\text{C}$  em moderadas a altas concentrações de NaCl (300-2400 mOsm) na ausência de agente crioprotetor, todos os embriões degeneraram. Um resultado contrário foi obtido quando foi utilizado um outro sal (cloreto de colina), e a maioria das células apresentavam-se intactas, mesmo na ausência de agente crioprotetor. Com esses estudos, pode-se concluir que os danos celulares provocados pelo choque osmótico são devidos ao tipo de agente utilizado e não à capacidade de a célula gerenciar o choque osmótico.

Vale ressaltar que os danos supracitados não são observados exclusivamente durante o resfriamento, mas também durante o processo de descongelamento/re-aquecimento, uma vez que as células recuperam seu metabolismo na presença de substâncias tóxicas como os agentes crioprotetores. Assim, El-Naggar *et al.* (2006) sugerem que as células ou tecidos criopreservados devem ser descongelados em uma velocidade alta. Agentes crioprotetores podem ser removidos em uma (Leibo, 1984), três (Rodrigues *et al.*, 2004a,b) ou mesmo em seis lavagens (Shelton, 1992). Apesar de uma lavagem ser suficiente para embriões descongelados, folículos isolados e tecido ovariano devem ser lavados em três passos para retirada de resquícios de agentes crioprotetores, (Lima *et al.*, 2006; Sadeu *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006a,b,c).

### Métodos de análise de folículos pré-antrais criopreservados

Para aplicar um protocolo de criopreservação, é necessário determinar o(s) agente(s) crioprotetore(s) mais indicado(s), sua concentração, tempo de exposição e método de remoção. Um método rápido para avaliar a qualidade folicular consiste na histologia clássica. Contudo, análise morfológica via histologia não é suficiente para avaliar o processo de criopreservação (Schotanus *et al.*, 1997; Van den Hurk *et al.*, 1998; Martinez-Madrid *et al.*, 2004). Esse tipo de análise irá permitir a identificação dos sinais primários da atresia (picnose nuclear, danos citoplasmáticos, desconexão entre as células da granulosa e o oócito, bem como irregularidades na membrana basal) (Jorio *et al.*, 1991; Hulshof *et al.*, 1995; Demirci *et al.*, 2002). Tal morfologia celular não está sempre correlacionada com a integridade das organelas celulares, as quais podem ser avaliadas via microscopia eletrônica de transmissão, por meio da detecção da integridade das mitocôndrias e retículo endoplasmático, bem como vacuolização celular (Santos *et al.*, 2006a). Além da análise das organelas, é também importante avaliar a integridade da membrana basal, seja utilizando o corante vital azul de trypan (Santos *et al.*, 2007a,b) ou o marcador fluorescente etídio homodímero (Schotanus *et al.*, 1997; Van den Hurk *et al.*, 1998), bem como a atividade enzimática no citoplasma utilizando a calceína como um marcador fluorescente (Schotanus *et al.*, 1997; Van den Hurk *et al.*, 1998). Provas de fluorescência são justificadas uma vez que a calceína é clivada por enzimas esterase em células vivas, deixando um produto fluorescente de clivagem na célula (De Clerck *et al.*, 1994), enquanto o etídio homodímero é utilizado para acessar a integridade da membrana plasmática ligando-se ao DNA de células não viáveis, ou seja, permeáveis ao componente de alto peso molecular (Poole *et al.*, 1993). Danos foliculares causados pela criopreservação nem sempre são observados imediatamente, sendo necessárias algumas horas de cultivo *in vitro* antes da análise de viabilidade. A restauração do metabolismo celular, o qual pode ser detectado via atividade enzimática, poderá informar sobre o normal funcionamento da célula. Além disso, o cultivo *in vitro* por curto período (24h), permite uma melhor análise da qualidade folicular pós criopreservação (Rodrigues *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006b, 2007a). O completo desenvolvimento de folículos primordiais criopreservados consiste na melhor evidência do sucesso de um protocolo de criopreservação (Santos, 2007). Em animais domésticos, é possível avaliar a capacidade de completo desenvolvimento folicular pós-criopreservação por meio do transplante de tecido ovariano (Santos, 2007a,b). O desenvolvimento folicular *in vitro*, no entanto, tem sido obtido apenas em animais de laboratório (Eppig e O'Brien, 1996).

### Criopreservação de folículos pré-antrais de animais domésticos: avanços obtidos no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais

Apesar do sucesso obtido com o completo desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais murinos criopreservados (Eppig e O'Brien, 1996) – incluindo o desenvolvimento de folículos congelados-descongelados seguido pela fecundação *in vitro*, desenvolvimento embrionário (Smits and Cortvrindt, 1998) e nascimento (Liu *et al.*, 2001; De la Peña *et al.*, 2002) – resultados similares são de difícil obtenção e sucesso em animais domésticos. No entanto, muitos estudos vêm aperfeiçoando o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de animais

domésticos, resultando em sua ativação e crescimento (Silva *et al.*, 2004, 2006; Gigli *et al.*, 2006).

O cultivo *in vitro* de grandes folículos secundários bovinos levou à formação de antro (Gutierrez *et al.*, 2000), maturação oocitária, cujos oócitos foram fecundados *in vitro* e subsequente o desenvolvimento embrionário, também *in vitro*, foi obtido (Wu e Tian, 2007). Contudo, completo desenvolvimento folicular *in vitro* a partir de folículos primordiais ainda não é possível, sendo necessário o estudo dos fatores envolvidos em cada etapa do desenvolvimento folicular, incluindo a ativação, proliferação e diferenciação das células da granulosa, crescimento e maturação oocitária, bem como ovulação (Van den Hurk *et al.*, 2000; Van den Hurk e Zhao, 2005). Desta forma, além dos estudos relacionados ao desenvolvimento de sistemas de cultivo para folículos primordiais de animais domésticos no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais, trabalhos envolvendo o desenvolvimento de métodos de criopreservação de tecido ovariano e folículos isolados vêm sendo realizados. Tais estudos têm como objetivo preservar ovários de animais de companhia e de produção. Em 2006, Lima e colaboradores obtiveram os primeiros sinais de sucesso na criopreservação de tecido ovariano felino. Em contraste com os resultados obtidos nos estudos iniciais da criopreservação de folículos pré-antrais felinos (Jewgenow e Goritz, 1995), em que a taxa de sobrevivência chegava a no máximo 12%, hoje é possível obter uma taxa maior de folículos que sobrevivem à criopreservação, i.e., 58% (Lima *et al.*, 2006). Resultados similares foram atingidos em caninos por Lopes *et al.* (2006; dados não publicados). Em animais domésticos, especificamente ruminantes, os avanços vêm sendo mais animadores com a obtenção de sobrevivência e crescimento folicular pós-cultivo de folículos pré-antrais congelados-descongelados oriundos de ovários ovinos (Amorim *et al.*, 2003a, b; Santos *et al.*, 2006a, b, 2007b), caprinos (Rodrigues *et al.*, 2004a, b, 2006; Santos *et al.*, 2006c; 2007a) e bovinos (Celestino *et al.*, 2005, 2006; 2007).

### Perspectivas

A criopreservação de folículos pré-antrais isolados ou inclusos no tecido ovariano consiste em uma alternativa para a preservação do material genético feminino por um período indefinido por meio da formação de bancos de germoplasma. Os folículos pré-antrais isolados poderiam no futuro ser destinados a protocolos de crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos para posterior transferência embrionária. No entanto, apesar do sucesso que vem sendo obtido com os protocolos de criopreservação, protocolos eficientes de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, *in situ* ou isolados, por longos períodos precisam ser desenvolvidos. Como alternativa, tecido ovariano pode ser criopreservado e posteriormente transplantado para recuperação de suas funções gametogênica e endócrina.

### Referências

- Agca Y, Liu J, Rutledge JJ.** Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.212-219, 2000.
- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Costa SHF, Gonçalves PBD, Figueiredo JR.** Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. *Theriogenology*, v.60, p.735-742, 2003a.
- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Gonçalves PBD, Figueiredo JR.** Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. *Fertil Steril*, v.81, p.735-740, 2003b.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG.** Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil*, v.110, p.11-19, 1997.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG.** Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil*, v.90, p.321-327, 1990.
- Celestino JJH.** *Vitrificação de folículos pré-antrais bovinos inclusos no tecido ovariano*. 2005. 38f. Monografia - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2005.
- Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Matos MHT, Martins FS, Costa SHF, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo, JR.** Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, 2007. (no prelo).
- Celestino JJH, Santos RR, Matos MHT, Martins FS, Costa SHF, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo, JR.** Cryopreservation of bovine preantral follicles. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 19, 2006, Angra dos Reis, RJ. *Anais ... Angra dos Reis: SBTE*, 2006, p.341.
- Cortvriendt R, Smitz JEJ.** *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Dom Anim*, v.36, p.3-9, 2001.
- De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ.** Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Immunol Meth*, v.172, p.115-24, 1994.
- De la Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC, Nagano M.** Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction*, v.123, p.593-600, 2002.

- De la Vega AC, Wilde OR.** Fundamentos biológicos de la criopreservación. *Rev Arg Prod Anim*, v.11, p.151-165, 1991.
- Demirci B, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF, Lornage J.** Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep. *Fertil Steril*, v.77, p.595-600, 2002.
- El-Naggar MM, Al-Mashat FM, Elayat AA, Sibiany AR, Ardawi MS, Badawoud MH.** Effect of thawing rate and post-thaw culture on the cryopreserved fetal rat islets: functional and morphological correlation. *Life Sci*, v.78, p.1925-1932, 2006.
- Eppig JJ, O'Brien MJ.** Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, v.54, p.197-207, 1996.
- Figueiredo JR.** *Isolement, caractérisation et culture de follicules préantraux chez les bovins.* 1995. 113f. Thesis (Doctorat) - Université de Liège, Liège, Belgique, 1995.
- Gigli DA, Byrd DD, Fortune JE.** Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles in vitro. *Theriogenology*, v.66, p.344-353, 2006.
- Gordon I.** Recovering the primary oocyte. In: Gordon, I. *Laboratory production of cattle embryos.* Cambridge: CAB International, Raven Press, 1994. p.71-82.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod* v. 62, p.1322-1328. 2000.
- Hotamisligil S, Toner M, Powers RD.** Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod*, v.55, p.161-168, 1996.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Van Den Donk HA, Van den Hurk R.** Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 $\beta$ -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.44, p.217-226, 1995.
- Jewgenow K, Goritz F.** The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. *Anim Reprod Sci*, v.39, p.285-297, 1995.
- Jorio A, Mariana JC, Lahlou-Kassi A.** Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. *Anim Reprod Sci*, v.26, p.239-250, 1991.
- Kartha KK.** Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha KK (Ed.). *Cryopreservation of plant cells and organs.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. p.115-134.
- Leibo SP.** One-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v.21, p.767-790, 1984.
- Lima AKF, Silva AR, Santos RR, Salles DM, Evangelista AF, Figueiredo JR, Silva LDM.** Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*, v.66, p.1664-1666, 2006.
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Chont M.** Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol Reprod*, v.64, p.171-178, 2001.
- Lovelock J.** The haemolysis of human blood cells by freezing and thawing. *Bioch Biophys Acta*, v.10, p.414-426, 1953.
- Luyet B.** The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynam*, v.1, p.1-14, 1937.
- Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J.** Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril*, v.82, p.1390-1394, 2004.
- Mazur P.** Principles of cryobiology. In: Lane N, Fuller BJ, Benson EE (Ed.). *Life in the frozen state.* Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. p.3-65.
- Mazur P, Rall WF, Leibo SP.** Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys*, v.6, p.197-213, 1984.
- Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K.** Extra-and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology*, v.51, p.29-53, 2005.
- Muldrey K, McGann LE.** Mechanisms of intracellular ice formation, *Biophys J*, v.57, p.525-532, 1990.
- Nuttinck F, Mermillod PM, Dessy F.** Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, v.39, p.811-821, 1993.
- Oda K, Gibbons WE, Leibo SP.** Osmotic shock of fertilized mouse ova. *J Reprod Fertil*, v.95, p.737-747, 1992.
- Otala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjöberg J, Soumalainen L, Suikkari AM, Pentikäinen V, Dunkel L.** Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Hum Reprod*, v.8, p.228-236, 2002.
- Paynter SJ.** Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Updated*, v.6, p.449-456, 2000.
- Poole CA, Brookes NH, Clover GM.** Keratocyte networks visualized in the living cornea using vital dyes. *J Cell Sci*, v.106, p.685-692, 1993.
- Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*,

v.24, p.387-402, 1985.

**Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004a.

**Rodrigues APR, Amorim, CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.211-227, 2004b.

**Rodrigues APR, Costa SHF, Santos RR, Amorim CA, Lucci CM, Bao SN, Nunes JF, Rondina D, Figueiredo JR.** *In vitro* culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. *Cell Pres Tech*, v.4, p.290-298, 2006.

**Rozenberg S, Antoine C, Carly B, Pastijn A, Liebens F.** Improving quality of life after breast cancer: prevention of other diseases. *Menopause Int*, v.13, p.71-74, 2007.

**Sadeu JC, Cortvrintd R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J.** Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.85, p.1130-1141, 2006.

**Santos RR.** *Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation.* 2007. 144f. Thesis (Doctorat) - Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2007.

**Santos RR, Rodrigues APR, Costa SHF, Matos MHT, Bao SN, Lucci CM, Van Den Hurk R, Figueiredo JR.** Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.249-263, 2006a.

**Santos RR, Rodrigues APR, Costa SHF, Matos MHT, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Figueiredo JR.** Teste de toxicidade e criopreservação de foliculos pré-antrais ovinos utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 2006b. (no prelo).

**Santos RR, Tharasanit T, Figueiredo JR, Van Haefen T, Van Den Hurk R.** Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res*, v.325, p.423-531, 2006c. difíceis

**Santos RR, Tharasanit T, Van Haefen T, Figueiredo JR, Silva JRV, 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, 2007a.

**Santos RR, Van den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR.** Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.53-64, 2007b.

**Saumande J.** Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec Méd Vét*, v.157, p.29-38, 1981.

**Schotanus K, Hage WJ, Vanderstechele H, Van den Hurk R.** Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.48, p.471-483, 1997.

**Shelton JN.** Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology* v.37, p.713-721. 1992.

**Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MA, Van der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van den Hurk R.** The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006.

**Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HT, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol*, v.183, p.405-415, 2004.

**Smitz J, Cortvrintd R.** Follicle culture after ovarian cryostage. *Maturitas*, v.30, p.171-179, 1998.

**Stachecki JJ, Cohen J.** Symposium: cryopreservation and assisted human conception. *Reprod BioMed Online*, v.9, p.152-163, 2004.

**Stushnof C, Seufferheld M.** Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: Bajaj YPS (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm.* Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.87-101.

**Toner M, Carvalho EG, Karel M.** Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *J Appl Physiol*, v.67, p.338-354, 1990.

**Toner M, Carvalho EG, Stachecki J.** Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos: membrane integrity and developmental potential. *Biophys J*, v.64, p.1569-1577, 1993.

**Van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM.** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Updated*, v.6, p.457-474, 2000.

**Van den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF.** *In vivo* and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* v, 47, p.73-82, 1997.

**Van Den Hurk R, Spek ER, Hage WJ, Fair T, Ralph JH, Schotanus K.** Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod*, v.4, p.833-841, 1998.

**Van den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.

**Wu J, Tian Q.** Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. *Zygote*, v.15, p.233-240, 2007.