

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES**  
**SISTEMAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE**  
**TECIDO OVARIANO DE RATAS WISTAR**

**ISABEL CIRNE LIMA DE OLIVEIRA**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES  
SISTEMAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE  
TECIDO OVARIANO DE RATAS WISTAR**

Autora: Isabel Cirne Lima de Oliveira  
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal  
Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima

**PORTO ALEGRE  
2011**

## CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Isabel Cirne Lima

Análise comparativa entre diferentes sistemas de criopreservação de tecido ovariano de rata Wistar / Isabel Cirne Lima de Oliveira. -- 2011.

32 f.

Orientadora: Elizabeth Obino Cirne Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Criopreservação. 2. Tecido ovariano. 3. Congelamento. I. Cirne Lima, Elizabeth Obino , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima pela oportunidade de realizar esse projeto, pelos ensinamentos, apoio e orientação deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação da UFRGS e seu corpo docente.

A toda a minha família, irmãs, irmão, sobrinhos, sobrinhas, cunhados, cunhada, e em especial ao meu marido Gustavo e aos meus pais e meus sogros por me incentivarem a realizar este trabalho e nunca desistir.

Às minhas colegas e amigas, Ana Helena Paz e Paula Barros Terraciano, pela paciência, apoio e total colaboração para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular pela amizade e apoio.

À Profª. Dra Luíse Meurer do Laboratório de Patologia do HCPA e a Flavinha.

# ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DIFERENTES SISTEMAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE RATAS WISTAR

Autora: Isabel Cirne Lima de Oliveira  
Orientadora: Elizabeth Obino Cirne Lima

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o protocolo mais eficiente de criopreservação de tecido ovariano utilizando o sistema automático de congelamento, que requer rampas de resfriamento gradativo, modelo Freeze Control®, para comparar a integridade do tecido ovariano congelado através de duas diferentes curvas de congelamento combinadas com dois diferentes crioprotetores: dimetilsulfóxido (DMSO) e etileno glicol (EG). Para a realização do trabalho foram utilizadas 20 ratas Wistar que foram submetidas à oofarectomia bilateral. Os ovários foram divididos em duas partes, uma parte foi criopreservada em DMSO 1,5M e a outra em EG 1,5M. Ainda, foram analisadas duas curvas de congelamento (curva lenta com duração de 1h e 50min, e uma curva rápida com duração de 35 min). As amostras de tecido, após congelamento, foram descongeladas, fixadas e processadas para a coloração com hematoxilina e eosina para a análise da integridade dos oócitos. Finalmente fez-se a análise e quantificação dos folículos íntegros versus os não íntegros, como também o dano tecidual. Para a análise folicular foi utilizado o microscópio óptico em aumento de 400x e realizou-se a classificação dos folículos pré-antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais e primários. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as comparações entre as médias feitas pelo teste de Tukey com ( $P < 0,05$ ). Nos resultados foi observado que no tecido criopreservado os folículos que persistiram íntegros em cada ovário foram os primordiais em 79% e primários em 29%. Já no tecido não congelado (controle) foram encontrados todos os tipos foliculares, primordiais, primários, secundários, pré-antrais e antrais. Entre as alterações reversíveis identificaram-se vacuolização citoplasmática e contorno irregular. Quanto às alterações irreversíveis foi encontrado picnose. Concluindo, no tecido ovariano criopreservado, foram encontrados apenas folículos primordiais e primários apresentando alterações histológicas reversíveis e irreversíveis. Além disso, o crioprotetor EG promoveu uma melhor preservação destes folículos, comparado com o DMSO. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, na preservação dos folículos, quando se comparou as duas curvas de congelamento.

**Palavras Chaves:** congelamento, DMSO, EG, primordial e primário.

## COMPARATIVE ANALYSIS AMONG DIFFERENT CRYOPRESERVATION SYSTEMS OF OVARIAN TISSUES IN FEMALE WISTAR RATS

Author: Isabel Cirne Lima de Oliveira

Advisor: Elizabeth Obino Cirne Lima

### ABSTRACT

*The aim of this study was to determine the most efficient protocol of cryopreservation of ovarian tissue using automatic freezing system. This system requires Freeze Control® ramps of gradative cooling to compare the integrity of frozen ovarian tissue through two different freezing curves together with two different cryoprotectants: dimethylsulphoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG). In this work 20 Wistar female rats were submitted to bilateral oophorectomy. The ovaries were divided in two parts, one part was cryopreserved in DMSO 1,5M and the other in EG 1,5M. Two frozen curves (a slow curve lasting 1h and 50min and a rapid curve lasting 35min) were analyzed. The tissue samples were frozen and after defrosted, fixed, and processed to hematoxylin and eosin staining to analyse oocyte. The analysis and quantification of integrated follicles, non-integrated, and tissue damage was performed. In the follicular analysis it was used 400x optical microscope and performed the classification of pre-antral follicles in primordial and primary according to their stage of development. The results were submitted to ANOVA and the comparasions between the averages were done using the Tukey test ( $P < 0,05$ ). It was observed that in the cryopreserved tissue the follicles remaining integrated in each ovary were 79% primordial and 29% primary. In the non-frozen tissue (control) were found all kinds follicular primordial, primary, secondary, preantral and antral follicles. Cytoplasmic vacuolization and irregular cell outline were identified among reversible alterations. Picnosis was found as an irreversible alteration. To conclude only primordial and primary follicles were enconutered in the ovarian tissue cryopreserved and there are revisable and irreversible histological alterations. Furthermore, the crioprotectant EG was more efficient then DMSO in other to preserve a higher number of primordial and primary viable folicules. No statistical significant difference was detected when we compare the two curves of cryopreservation system.*

**Key words:** *freezing, DMSO, EG, primordial, primary.*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado, observam-se em A-folículo primário normal e um primordial normal e em B-folículo primário em picnose. .... 21

**Figura 2.** Valores de média e desvio padrão da viabilidade folicular, comparando-se a utilização de dois crioprotetores (DMSO e EG) combinados com duas curvas de congelamento (rápida e lenta). Os gráficos mostram que o crioprotetor EG produziu um número superior de folículos primordiais e primários viáveis. Onde \* indica diferença estatisticamente significativa entre os crioprotetores ( $P < 0,05$ ). Porém quanto às curvas de congelamento não foi possível observar-se diferença estatisticamente significativa (considerando  $P < 0,05$ ) ..... 22

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	microlitro
DMSO	dimetil sulfóxido
EG	etileno glicol
GLY	glicerol
h	hora(s)
HTF	meio de manipulação e cultivo de embrião
M	molar
min	minuto
PBS	solução salina
PM	peso molecular
PROH	propanodiol



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	10
<b>2.1</b>	Crioprotetores .....	11
<b>2.2</b>	Ovário .....	13
<b>2.3</b>	Criopreservação .....	13
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	16
<b>3.1</b>	Resumo .....	16
<b>3.2</b>	Abstract .....	16
<b>3.3</b>	Introdução .....	17
<b>3.4</b>	Materiais e Métodos .....	18
<b>3.4.1</b>	Animais .....	18
<b>3.4.2</b>	Coleta dos Ovários .....	18
<b>3.4.3</b>	Congelamento .....	19
<b>3.4.4</b>	Descongelamento .....	19
<b>3.4.5</b>	Análise Folicular .....	19
<b>3.4.6</b>	Análise Estatística .....	20
<b>3.5</b>	Resultados .....	20
<b>3.6</b>	Discussão .....	22
<b>3.7</b>	Conclusão .....	25
<b>3.8</b>	Considerações Finais .....	26
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica promissora para a preservação da fertilidade de mulheres jovens que irão submeter-se a algum procedimento cirúrgico ou terapêutico, que podem interferir negativamente na fertilidade destas, como por exemplo, quimioterapia ou radioterapia (COURBIERE *et al.*, 2005; ERNST, 2010). Esses tratamentos afetam em diferentes graus as células germinativas, que são suscetíveis à toxicidade, e causam, como principal complicação, a falência ovariana precoce (ALMODIN *et al.*, 2004 ; MARTINEZ-MADRID *et al.*, 2004; AUBARD *et al.*, 1996).

Enquanto o congelamento de gametas masculinos é fácil, relativamente barato e apresenta bons resultados, os métodos de preservação de oócitos permanecem aquém do desejado. Vários autores observaram taxa de gravidez muito baixa quando tentaram o congelamento de óvulos (PORCU *et al.*, 1997; MANZUR *et al.*, 1972; TROUNSON *et al.*, 1989; VICENT *et al.*, 1990).

Assim as pesquisas se voltam para bancos de criopreservação de células germinativas imaturas. O intuito é tentar a restauração da fertilidade natural ou fazer o uso de tecnologia de cultura de células para produzir gametas maduros para posterior aplicação das técnicas de concepção assistida (DONNEZ *et al.*, 2004; EPPIG *et al.*, 1989; GOSDEN *et al.*, 2000).

Portanto o congelamento de tecido ovariano surge como uma possibilidade de preservar não só a função reprodutiva da paciente, mas também a capacidade de produção endógena de esteróides sexuais, evitando a necessidade de terapia de reposição hormonal posterior, assim, melhorando a qualidade de vida destas pacientes a longo prazo (ROSA E SILVA, 2006). Tem sido demonstrada em inúmeros estudos a

viabilidade folicular após criopreservação e descongelação (MALTARIS *et al.*, 2006; ERNST, 2010).

Estudos com animais têm demonstrado altas taxas de sucesso após diferentes metodologias de transplante de tecido ovariano criopreservado (ALMODIN *et al.*, 2004; AUBARD *et al.*, 1999). Apesar dos resultados desta técnica se apresentarem promissores, poucas gestações foram descritas na literatura.

Donnez *et al.*, em 2004, descreveram o primeiro nascimento de um bebê após criopreservação e transplante ortotópico de tecido ovariano. Já Meirrow *et al.*, em 2005 apresentaram a primeira gestação humana após criopreservação de tecido ovariano e posterior fertilização *in vitro*, de oócitos aspirados.

Muitos protocolos, como os de resfriamento lento, rápido e ultra-rápido, têm sido utilizados, porém, ainda não existe um procedimento que possa produzir resultados consistentes (FAGUNDES *et al.*, 2004).

Considerando estes dados, o objetivo deste trabalho foi comparar a viabilidade do tecido ovariano congelado, através de duas diferentes curvas de congelação e dois diferentes crioprotetores (DMSO e EG). Bem como determinar o protocolo mais eficiente de criopreservação de tecido ovariano, utilizando o sistema automático de congelação que utiliza rampas de resfriamento gradativo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Muitos tratamentos administrados para o câncer são gonadotóxicos, principalmente por causa da utilização de agentes alquilantes, que afetam tanto as células cancerígenas como as saudáveis, podendo quebrar a cadeia de DNA ou formar pontes entre as cadeias do ácido nucléico, impedindo a duplicação do DNA e causando morte celular (citotoxicidade). Dentre estes, podemos destacar a quimioterapia, que pode levar à falência ovariana prematura e à infertilidade nos pacientes (SONMEZER *et al.*, 2005).

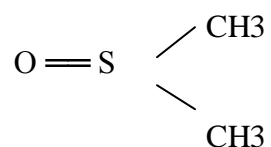
A criopreservação de tecido ovariano e posterior transplante deste surgem como uma opção promissora para preservar o potencial reprodutivo de pacientes que deverão ser submetidos a tratamentos citotóxicos. Embora existam algumas evidências de dano celular e molecular com o processo de congelamento e descongelamento em estudos com animais e humanos, tem sido mostrado que estes procedimentos podem ser efetivos na restauração da fertilidade e da função endócrina ovariana (AKAR *et al.*, 2005; ROSA E SILVA, 2006).

Os experimentos de congelamento de tecido ovariano foram realizados inicialmente em modelos animais, em 1950, a partir da descoberta dos agentes crioprotetores (SONMEZER *et al.*, 2005). De acordo com MAZUR, 1970, as células de mamíferos, com raras exceções, não sobrevivem à congelamento em temperaturas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  em fluidos teciduais ou em soluções salinas, sem a presença de aditivos crioprotetores. Segundo MCGANN, 1978, o mecanismo pelo qual estes agentes químicos protegem as células que formam a base para questões fundamentais na criobiologia.

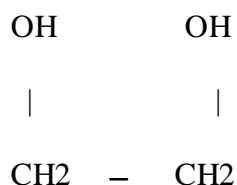
## 2.1 Crioprotetores

Desde 1970, crioprotetores efetivos como propanodiol, etileno glicol (EG) e dimetilsulfóxido (DMSO) têm sido utilizados (AKAR, 2005). A ação desses crioprotetores é proteger a célula durante a criopreservação, baixando o ponto de solidificação da solução de congelamento e, evitando ou reduzindo, com isso, a quantidade de cristais formados dentro da célula. Os crioprotetores são substâncias lipossolúveis e consequentemente possuem a capacidade de atravessar as membranas plasmáticas. Com isto, ao penetrarem na célula, promovem a desidratação das mesmas, necessária para prevenir a excessiva formação de cristais de gelo (MCGANN, 1978; MERYMAN, 1971). A taxa de penetração nos vários componentes das células varia em função do crioprotetor e de acordo com o tipo e origem das células. A habilidade do agente em penetrar na membrana plasmática deve ser uniforme, não devendo causar choque osmótico, nem devendo ser tóxico à célula, mesmo em elevada concentração. Dentre esses agentes, classificados como penetrantes, o etileno glicol e o DMSO (MCGANN, 1978; MERYMAN, 1971).

*Dimetil sulfóxido* (DMSO)



O DMSO é um dos crioprotetores intracelulares com alto peso molecular (PM=78,13). Ele preserva a integridade de proteínas isoladas e das membranas lipídicas, durante o processo de resfriamento e aquecimento (ANCHORDOGUY *et al.*, 1991). A desvantagem do DMSO é a sua toxicidade (WERLICH *et al.*, 2006) que ocorre a 37°C.

*Etileno Glicol (EG)*

O EG é um dos crioprotetores intracelulares com menor peso molecular (PM= 62,02) e maior permeabilidade à membrana celular, o que lhe proporciona uma vantagem quando comparado a outros crioprotetores intracelulares de maior peso molecular como o DMSO e glicerol. Além disso, é um dos crioprotetores que apresenta menor toxicidade às células embrionárias, utilizado com efetividade no congelamento (MIYAMOTO E ISHIBASHI, 1978).

Mazur (MAZUR, 1966) defende que uma das principais causas de mortalidade celular durante a congelação e descongelação é a formação de cristais de gelo intracelular, causada pela insuficiente desidratação. Destaca ainda, que células resfriadas a velocidades rápidas seriam lesadas pela formação de gelo intracelular durante o resfriamento e pelo seu crescimento durante o aquecimento. Já as células resfriadas em baixas velocidades sofreriam por decorrência das alterações osmóticas das soluções intra e extracelulares à medida que a formação de gelo acontece na suspensão celular (MAZUR, 1996).

## 2.2 Ovário

O ovário contém reserva de células germinativas, que excede o número de folículos suficiente para todos os ciclos menstruais. Este estoque é definido antes do nascimento e não pode ser repostado. Atualmente, não há metodologia comprovada para impedir o declínio da reserva folicular, embora o processo de criopreservação permita opção para manutenção, a longo prazo, dos oócitos. A tecnologia de criopreservação pode potencialmente ser utilizada para preservar a fertilidade em pacientes a serem submetidos a tratamentos que podem levar à esterilização ou que apresente risco de induzir menopausa precoce (CHARLOTTE THOMAZ *et al.*, 2005).

O ovário é composto pelo hilo, medula e córtex. No córtex ovariano estão os folículos primordiais, que são mais resistentes à crio-injúria do que os oócitos maduros (SONMEZER *et al.*, 2005). Ernst *et al.*, 2010 demonstraram que a fertilidade de humanos, poderia ser restaurada pelo enxerto de fragmentos de córtex ovariano previamente congelado (SONMEZER *et al.*, 2010).

## 2.3 Criopreservação

Várias tentativas de restauração da fertilidade têm sido feitas com técnicas de criopreservação de tecido ovariano por congelamento lento e, mais recentemente, por vitrificação, que consiste no congelamento rápido, partindo de uma temperatura positiva, próxima a zero graus celsius e submergindo a amostra diretamente em nitrogênio líquido a uma temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  (COURBIERE *et al.*, 2005; ROSA E SILVA, 2006; ISACHENKO *et al.*, 2009).

A vitrificação foi utilizada como método de criopreservação inicialmente em 1938, mas apenas na década de 80 ela passou a ser utilizada com sucesso na criopreservação de embriões de mamíferos (FAHY *et al.*, 1984).

Embora a vitrificação de tecidos ovarianos demonstre resultados promissores, o método mais comumente utilizado ainda é a congelação lenta. A congelação lenta é caracterizada por uma curva com redução de aproximadamente 0,3°C/min. Além disso, na congelação lenta procede-se o equilíbrio das concentrações adequadas de crioprotetores com a solução aquosa, evitando a formação de cristais de gelo no meio intracelular (MALTARIS *et al.*, 2006; ROSA E SILVA, 2006).

O restabelecimento da função ovariana pós-reimplante de tecido ovariano congelado-descongelado já foi descrito por alguns autores (RADFORD *et al.*, 2001; DONNEZ *et al.*, 2006), inclusive com nascimento de criança sadia, após falência ovariana pós-quimioterapia comprovada, seja por gestação espontânea (Donnez, *et al.*, 2004; DEMEESTER *et al.*, 2006), ou por técnicas de reprodução assistida (MEIROW *et al.*, 2005). A maior dificuldade está no período pós-reimplante imediato, quando o risco de isquemia é maior e conseqüentemente há perda folicular irreversível (NEWTON *et al.*, 1996).

Kim *et al.*, 2001 apresentaram resultados animadores ao verificarem que, após o xenotransplante de tecido ovariano congelado-descongelado de portadoras de linfoma Hodgkin e não-Hodgkin em ratos imunossuprimidos, não foi detectada a presença de tumor em nenhum dos camundongos implantados.

Portanto, todos os esforços devem ser concentrados no diagnóstico precoce, no sentido de curar a doença. O fato de que muitos cânceres, especialmente em jovens, são curáveis, faz com que o médico habilidoso lide não somente com o correto e precoce diagnóstico e tratamento, mas também com as necessidades do paciente após o



tratamento, quando ele estiver curado. A atuação do oncologista, em conjunto com especialistas em infertilidade, irá oferecer a melhor solução para estes pacientes. No sentido de preservar a fertilidade, todo esforço deve ser feito para encaminhar pacientes para que façam a criopreservação de amostras antes do início da quimioterapia e/ou radioterapia (SCHUFFNER *et al.*, 2004).

### 3 ARTIGO

**Título: Análise comparativa entre diferentes sistemas de criopreservação de tecido ovariano de ratas Wistar**

**Title: Comparative analysis among different cryopreservation systems of ovarian tissues in female Wistar rats**

#### 3.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi determinar o protocolo mais eficiente de criopreservação de tecido ovariano utilizando o sistema automático de congelação, modelo Freeze Control®, testando duas curvas de congelação combinadas com dois crioprotetores: dimetilsulfóxido (DMSO) e etileno glicol (EG). Foram utilizadas 20 ratas Wistar que foram submetidas à oofarectomia bilateral. Os ovários foram divididos em duas partes, uma parte foi criopreservada em DMSO 1,5M e a outra em EG 1,5M. Ainda, foram analisadas duas curvas de congelamento: curva lenta (1h e 50min) e curva rápida (35 min). Após a congelação, as amostras foram descongeladas, fixadas e processadas para a coloração com hematoxilina e eosina para a análise da integridade do tecido. Fez-se a análise e quantificação dos folículos íntegros versus os não íntegros, como também o dano tecidual. Para a análise folicular foi utilizado o microscópio óptico em aumento de 400x e realizou-se a classificação dos folículos pré-antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais e primários. Os resultados foram submetidos à ANOVA e as comparações entre as médias feitas pelo teste de Tukey com ( $P < 0,05$ ). Nos resultados foi observado que no tecido criopreservado, os folículos que persistiram íntegros em cada ovário foram os primordiais em 79% e primários em 29%. Já no tecido não congelado (controle) foram encontrados todos os tipos foliculares, primordiais, primários, secundários, pré-antrais e antrais. Entre as alterações reversíveis identificaram-se vacuolização citoplasmática e contorno irregular. Quanto às alterações irreversíveis foi encontrado picnose. Concluindo, no tecido ovariano criopreservado, foram encontrados apenas folículos primordiais e primários apresentando alterações histológicas reversíveis e irreversíveis. Além disso, o crioprotetor EG promoveu uma melhor preservação destes folículos, comparado com o DMSO. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, na preservação dos folículos, quando se comparou as duas curvas de congelação.

**Palavras Chaves:** congelamento, DMSO, EG, primordial e primário.

#### 3.2 Abstract

*The aim of this study was to determine the most efficient protocol of cryopreservation of ovarian tissue using automatic Freeze Control® system to test two different freezing curves together with two different cryoprotectants: dimethylsulphoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG). In this work 20 Wistar female rats were submitted to bilateral oophorectomy. The ovaries were divided in two parts, one part was cryopreserved in DMSO 1,5M and the other in EG 1,5M. Two frozen curves (a slow curve lasting 1h and 50min and a rapid curve lasting 35min) were analyzed. The tissue samples were frozen and after defrosted, fixed, and processed to hematoxylin and eosin staining to analyse oocyte. The analysis and quantification of integrated follicles, non-integrated, and tissue damage was performed. In the follicular analysis it was used 400x optical microscope and performed the classification of pre-antral follicles in primordial and primary according to their stage of development. The results were submitted to ANOVA and the comparisons between the averages were done using the Tukey test ( $P < 0,05$ ). It was observed that in the cryopreserved tissue the follicles remaining integrated in each ovary*

were 79% primordial and 29% primary. In the non-frozen tissue (control) were found all kinds follicular primordial, primary, secondary, preantral and antral follicles. Cytoplasmic vacuolization and irregular cell outline were identified among reversible alterations. Picnosis was found as an irreversible alteration. Furthermore, the crioprotectant EG was more efficient than DMSO in order to preserve a higher number of primordial and primary viable follicles. Yet, no statistical significant difference was detected when we compare the two curves of cryopreservation system.

**Key words:** freezing, DMSO, EG, primordial, primary.

### 3.3 Introdução

O número de pacientes que sobrevivem após o tratamento de câncer vem aumentando nos últimos anos (SCHUFFNER *et al.*, 2004). No entanto, os procedimentos cirúrgicos ou terapêuticos, como quimioterapia ou radioterapia, podem interferir negativamente na fertilidade destes pacientes. Na tentativa de minimizar estas consequências, a criopreservação de tecido ovariano surgiu como uma técnica promissora para a preservação da fertilidade de mulheres jovens (COURBIERE *et al.*, 2005; ERNST, 2010). Esses tratamentos afetam em diferentes graus as células germinativas, que são suscetíveis à toxicidade, e causam, como principal complicação, a falência ovariana precoce (ALMODIN *et al.*, 2004 ; MARTINEZ-MADRID *et al.*, 2004; AUBARD *et al.*, 1996).

Os métodos utilizados para a preservação de oócitos ainda permanecem aquém do desejado e são observadas taxas de gravidez muito baixas com a utilização de óvulos congelados (PORCU *et al.*, 1997; MANZUR *et al.*, 1972; TROUNSON *et al.*, 1989; VICENT *et al.*, 1990). Assim as pesquisas voltam-se para bancos de criopreservação de células germinativas imaturas (DONNEZ *et al.*, 2004; EPPIG *et al.*, 1989; GOSDEN *et al.*, 2000).

Portanto, o congelamento de tecido ovariano surge como uma possibilidade de preservar não só a função reprodutiva da paciente, mas também a capacidade de produção endógena de esteróides sexuais, evitando a necessidade de terapia de reposição hormonal posterior, assim, melhorando a qualidade de vida destas pacientes a longo prazo (ROSA E SILVA, 2006).

### **3.4 Materiais e Métodos**

#### **3.4.1 Animais**

Foram utilizadas 20 ratas Wistar com aproximadamente 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em ciclos alternados de 12h de claro e escuro, temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , alimentados com ração padrão e água *ad libitum*, de acordo com a Resolução Normativa nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Após indução de morte em câmara de CO<sub>2</sub>, estas foram imediatamente submetidas à oofarectomia bilateral. Todos os experimentos seguiram as normas do “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH publicação nº 80-23 revisada em 1996) previamente aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/HCPA).

#### **3.4.2 Coleta dos Ovários**

Depois de retirados por ooforectomia bilateral, os ovários foram divididos em duas partes iguais, lavados com PBS, para retirar o excesso de sangue e colocados em meio HTF (meio de manipulação e cultura de embriões) por 2 min, sendo uma parte do material colocada em 400 µL de DMSO e a outra em 400 µL de EG onde permaneceram por 15 min em temperatura ambiente. Já o grupo controle os ovários foram lavados com

PBS para retirar o excesso de sangue e foram colocados direto em formol tamponado 10%.

### **3.4.3 Congelamento**

Os fragmentos de tecido incubados em criotubos com DMSO ou EG submetidos à criopreservação foram colocados em no aparelho de congelamento automatizado programável, modelo Freeze Control®, em curvas alternadas, sendo curva 1 (lenta com duração de 1h e 50min) e curva 2 (rápida com duração de 35min) a temperatura das curvas ia de 20°C à - 45°C. Após, as amostras congeladas foram levadas diretamente para o nitrogênio líquido a (-196 °C).

### **3.4.4 Descongelamento**

Após 60 dias, as amostras foram descongeladas. Depois de retiradas do nitrogênio líquido, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 2min, a seguir foram colocadas em banho maria a 37 °C por mais 2min, para a fusão do gelo, em seguida, lavadas com HTF, para retirada do crioprotetor. E logo após, as amostras eram fixadas em formol tamponado 10% em temperatura ambiente por 6hs, para então serem emblocadas em parafina para a confecção das lâminas.

### **3.4.5 Análise Folicular**

A análise folicular foi realizada em microscópio óptico em aumento de 400x, e realizou-se a classificação dos folículos de acordo com os critérios modificados de Oktay, *et al*,1995. Segundo esta classificação, os folículos pré-antrais, de acordo com o estágio de desenvolvimento são classificados como: *primordiais*, quando apresentam: uma camada de células retangulares pré-granulosa ao redor do oócitos (células

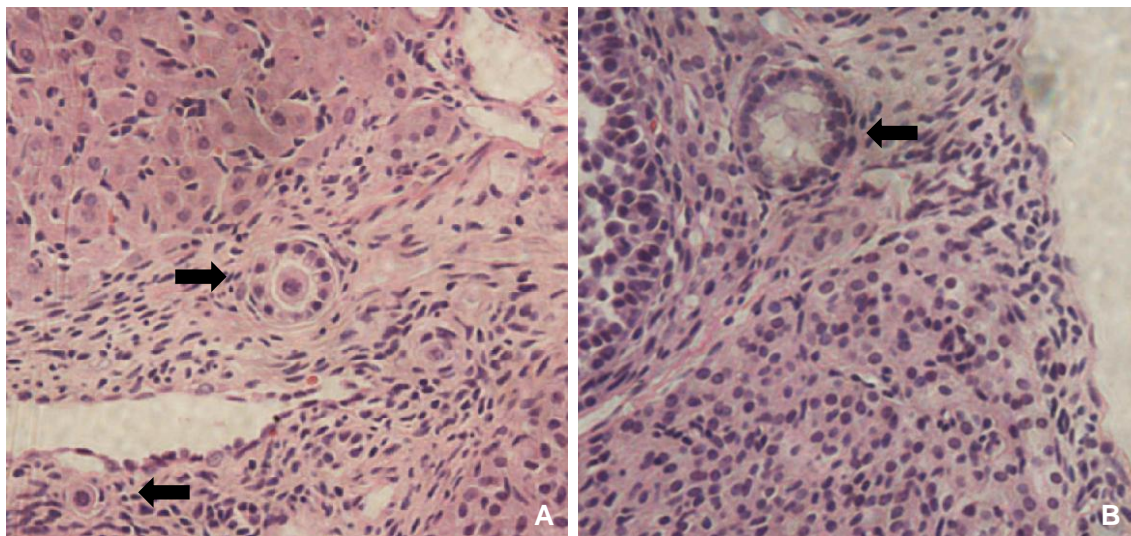
esparsas); e os *primários* possuem ao menos uma das camadas de células pré-granulosa cubóide ou colunar, até que formem uma única camada de células de granulosa cubóides ao redor do oócito. Os folículos foram avaliados e classificados como integros ou não integros. Ainda os folículos que foram identificados como normais mesmo quando apresentavam vacuolização citoplasmática e/ou contorno irregular, pois essas características são consideradas reversíveis. Por outro lado os folículos que apresentavam picnose eram considerados não integros.

### **3.4.6 Análise Estatística**

Os efeitos da criopreservação na preservação folicular foram avaliados por ANOVA com nível de significância de  $P < 0,05$ . Para comparação entre médias foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

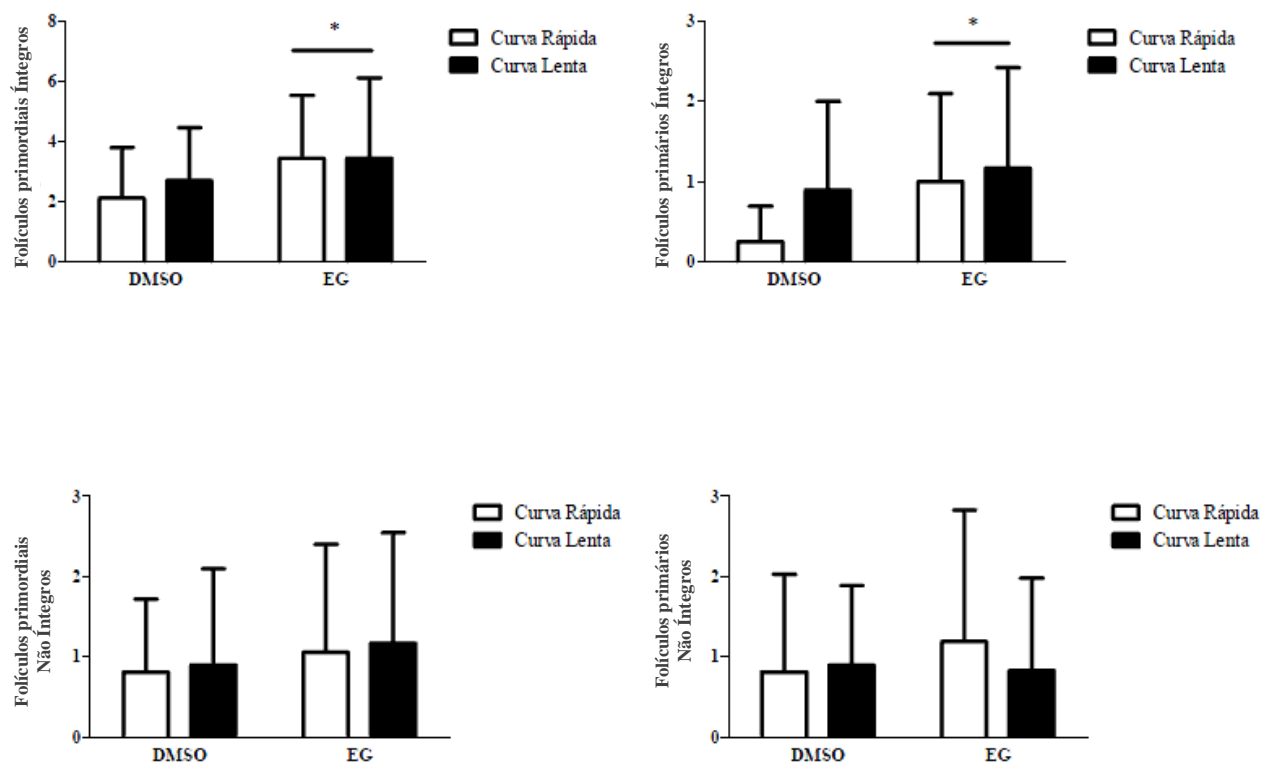
### **3.5 Resultados**

Nos cortes histológicos submetidos à coloração por hematoxilina e eosina observou-se no tecido não congelado (controle) a presença de todos os tipos foliculares (primordial, primário, secundário, pré-antral e antral) ao passo que nos cortes criopreservados encontraram-se folículos primordiais e primários. Entre as alterações celulares mais frequentes encontradas no tecido criopreservado estavam a vacuolização citoplasmática e contorno irregular.



**Figura 1-** Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado, observam-se em A-folículo primário normal e um primordial normal e em B -folículo primário em picnose.

A análise microscópica dos tecidos ovarianos, após o congelamento e descongelamento destes, mostrou que o EG produz um número maior de folículos primordiais e primários viáveis, quando comparado ao DMSO. Ainda, os tecidos ovarianos foram submetidos a dois sistemas de congelamento, ambos automatizados; porém, um utilizando curva lenta e outro curva rápida. Neste caso, eram avaliados os números de folículos primordiais viáveis e primários viáveis, mas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (considerando-se  $P < 0,05$ ) entre os tipos de curva de congelamento. Dados numéricos encontram-se expressos na Figura 2.



**Figura 2** - Valores de média e desvio padrão da viabilidade folicular, comparando-se a utilização de dois crioprotetores (DMSO e EG) combinados com duas curvas de congelamento (rápida e lenta). Os gráficos mostram que o crioprotetor EG produziu um número superior de folículos primordiais e primários íntegros. Onde \* indica diferença estatisticamente significativa entre os crioprotetores ( $P < 0,05$ ). Porém quanto às curvas de congelamento não foi possível observar-se diferença estatisticamente significativa (considerando  $P < 0,05$ ).

### 3.6 Discussão

Vários estudos têm sido realizados no intuito de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação de tecido reprodutivo, a fim de manter a integridade do tecido ovariano. No presente estudo buscou-se analisar o efeito da utilização de dois tipos de



crioprotetores (EG e DMSO) combinados com dois sistemas automatizados de congelamento, sendo um com curva de redução de temperatura rápida e outra lenta.

A maior eficiência na criopreservação do tecido ovariano era observada a partir da quantificação do número de folículos ovarianos primordiais e primários íntegros, visto que estes são potencialmente capazes de vir a gerar embriões, uma vez fertilizados *in vitro*, em condições adequadas. Assim, foi demonstrado que quando as amostras de tecido ovariano foram criopreservadas com o crioprotetor EG, nas amostras congeladas com ambas as curvas, foi possível recuperar-se um número superior de folículos primordiais e primários íntegros. Isto se deve provavelmente a sua menor toxicidade às células embrionárias e maior permeabilidade à membrana celular (MIYAMOTO E ISHIBASHI, 1978). Lucci *et al.*, em 2004, utilizando tecido ovariano de zebu (*Bos indicus*), comparando quatro crioprotetores (PROH, GLY, DMSO, EG) em diferentes concentrações e utilizando congelador programável, obteve resultados mais efetivos com os crioprotetores DMSO e PROH os quais preservaram a integridade estrutural das células somáticas e reprodutivas do tecido. A discordância dos resultados comparados aos encontrados neste trabalho pode ser devido às diferenças interespecíficas do tecido ovariano, talvez os folículos bovinos sejam mais sensíveis aos efeitos tóxicos do EG do que os folículos de outras espécies. Em estudos prévios, o EG não apresentou toxicidade para embriões humanos (CHI *et al.*, 2002) e embriões bovinos (SOMMERFELD *et al.*, 1999; VISINTIN *et al.*, 2002). Além disso, bons resultados foram observados quando EG foi usado para a criopreservação de tecido ovariano de camundongo, com 88% dos folículos restantes morfológicamente normais após congelamento/descongelamento. Porém alertaram que para exposição por períodos prolongados, o EG pode ocasionar redução de viabilidade dos folículos (CANDY *et al.*, 1997). Em humanos, a porcentagem de folículos que sobreviveram no tecido ovariano depois de congelados

em EG e transplantados para camundongos imunodeficientes foi de 84% (NEWTON *et al.*, 1996). Estes trabalhos estão de acordo com os resultados obtidos no presente experimento, pois o EG mostrou-se menos tóxico preservando melhor a integridade estrutural do tecido ovariano. Entretanto Candy *et al.*, 1997 observou que ovários de ratas expostos ao EG por longo período de tempo antes do congelamento pode se tornar tóxico aos folículos, pois este crioprotetor apresenta uma alta permeabilidade à membrana celular. E Lucci *et al.*, 2004, relataram que as fases de desenvolvimento folicular (primordial, primário e pequenos secundários) não influenciaram, de maneira geral, a resistência dos folículos aos crioprotetores.

Em relação às curvas de congelamento usadas no presente trabalho denominadas de curvas de congelamento convencional, não houve diferença estatisticamente significativa entre elas, mostrando que no congelamento convencional tanto a curva com duração de 35min ou de 1h e 50min apresentaram resultados similares, sugerindo assim que é possível, minimizar o tempo do congelamento convencional, sem causar danos ao tecido criopreservado.

A técnica de congelamento lento foi apresentada por diversos autores. Pois o tecido ovariano apresenta boa tolerância ao processo de criopreservação (GOSDEN, 2000; NEWTON *et al.*, 1996; HOVATTA *et al.*, 1996). A maioria dos trabalhos feitos testa o congelamento convencional versus a vitrificação. Isachenko *et al.*, 2009 em seu estudo testaram o congelamento convencional versus vitrificação em tecido ovariano humano e concluíram que, para a criopreservação de tecido ovariano humano o congelamento convencional é mais promissor do que a vitrificação por que ele possui um mais alto potencial de desenvolvimento. Os autores acreditam que isso se deve a possível contaminação do nitrogênio líquido, que é usado para o congelamento e armazenamento do tecido e pode sofrer contaminação por micro-organismos (TEDDER *et al.*, 1995;

BIELANSKI *et al.*, 2000). A filtração ou o tratamento com U.V. no nitrogênio líquido não podem garantir a ausência de contaminação do material biológico por vírus, no congelamento por vitrificação. Por exemplo, a contaminação de amostras de sangue pelo vírus da hepatite durante o armazenamento em nitrogênio líquido tem sido relatada (TEDDER *et al.*, 1995). Diferentes tipos de vírus podem aumentar sua virulência depois do contato direto e armazenamento em nitrogênio líquido, como por exemplo, vírus da hepatite (HAWKINS *et al.*, 1996), papova vírus (CHARLES & SIRE, 1971), vírus da estomatite vesicular (SCHAFFER, *et al.*, 1976) e herpes vírus (JONES & DARVILLE, 1989).

Já Ceschin *et al.*, 2006, concluíram que utilizando a análise imunohistoquímica com Ki-67( marcador de proliferação), embora ambos os métodos de criopreservação ovariana sejam viáveis, a vitrificação manteve maior número de folículos primordiais potencialmente funcionantes, sendo, portanto considerada melhor técnica de criopreservação de tecido ovariano do que o congelamento lento, em ratas.

De maneira geral, o bom protocolo de congelamento celular é aquele que propicia a estabilidade das reações cruzadas entre as moléculas no ambiente intracelular e também permite a sobrevivência celular após o descongelamento. O tecido deverá não somente permitir a sobrevivência celular, como também exibir a mesma arquitetura inicial, com as mesmas junções intercelulares, interações e ligações moleculares (HOVATTA *et al.*, 1996). Estudos de criobiologia demonstram que tipos diferentes de células, ainda que congeladas na mesma solução, exibem condições de descongelamento diferentes. Devido à alta complexidade da arquitetura ovariana, a sobrevivência do tecido criopreservado depende, não somente das rampas de congelamento e descongelamento, mas também dos métodos de remoção dos crioprotetores (HOVATTA *et al.*, 1996).

### **3.7 Conclusão**

O presente estudo permitiu concluir que utilizando análise dos folículos corados por hematoxilina e eosina o crioprotetor EG em ambas as curvas foi considerado como melhor técnica de criopreservação de tecido ovariano em ratas Wistar, pois manteve maior número de folículos primordiais e primários potencialmente íntegros. E por não ter sido encontrada diferença significativa entre as curvas, pode-se concluir que o congelamento convencional com curva rápida pode ser empregado para garantir boa recuperação celular e baixo tempo de processamento.

### **3.8 Considerações finais**

A preocupação com o futuro reprodutivo de pacientes que serão submetidas a tratamentos oncológicos, como radio e quimioterapia, merece cada vez mais espaço, quando pensamos na abordagem do paciente com câncer. O efeito gonadotóxico da quimioterapia é dose-dependente e relacionado com a idade do paciente. Os efeitos da radioterapia, além de estarem relacionados com a dose e com a idade, levam em conta o campo irradiado. Atualmente, poucas são as técnicas que podem ser oferecidas de maneira concreta para estas pacientes, porém mesmo as técnicas em fase de experimentação devem estar disponíveis. Pois futuramente ocorrerão avanços na qualidade dos procedimentos de biotécnica em reprodução, promovendo um aumento das taxas de sucesso.

#### 4 REFERÊNCIAS

AKAR, M; OKTAY, K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. **Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n°8, 2005.

ALMODIN ,C.G; MINGUETTI-CAMARA, V.C; MEISTER, H; CESCHIN, A.P; KRIGER, E; FERREIRA, J.O.H.R. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved tissue in ewes subjected to radiotherapy. **Fertil Steril** ,v. 81:160-4, 2004.

ANCHORDOGUY, T.J; CECCHINI, C.A; CROWE, J.H; CROWE, L.M. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. **Cryobiology**, v.28:467-473, 1991.

AUBARD, Y; LAVIGNAC, C;GRANDJEAN, M.H; PIVER, P AND TEISSIER, M.P. Autograftes orthotopiques de fragments ovariens chez le rat avec grossesse. **Contracept Fertil Sex**, v. 24:852-5,1996.

AUBARD, Y; PIVER, P; COGNIE, Y; FERMEAUX, V; POULIN, N;DRIANCOURT, M.A. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen thawed ovarian cortex shepp. **Hum Reprod** v.14:2149-54,1999.

BIELANSKI, A; NADIN-DAVIS, S; SAPP, T & LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.40:110-16, 2000.

CANDY, C.J; WOOD, M.J; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **J Reprod Fertil** ,v.110:11-9, 1997.

CESCHIN, A.P; MALAFAIA, O; THOMAZ, B.A.C; OLIVEIRA, L.M; ALMODIN, C.G; IOSHII, S.O; DORL, A; CAVALCANTI, T.C.S. Ki-67 marker used as a predictive index of the viability of cryopreserved ovaries through slow freezing and vitrification in rats. **Revista Médica do Paraná**, v.64(1):34-8, 2006.

CHARLES, G.N & SIRE D.J. Transmission of papova vírus by cryotherapia applicator. **Journal of the American Medical Association**, v.218:1435, 1971.

CHARLOTTE THOMAZ, B.A; BIONDO-SIMÕES, M.L; ALMODIN, C.G; MINGUETTI-CAMARA, V.C; CESCHIN, A.P; IOSHII, S.O. Histological aspects of

rabbit ovarian tissue after cryopreservation. **Rev. Bras. Ginecol.Obstet.**, v.27 (11):642-9, 2005.

CHI, H.J; KOO, J.J; JOO, J.Y; CHANGS, S.S; CHUNG, K.S. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. **Hum Reprod**, v.17:2146-51, 2002.

COURBIERE, B; MASSARDIER, J; SALLE, B; et al. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. **Fertility and Sterility**, v. 84(2):1065-71, 2005.

DEMEESTER, I; SIMON, P; BUXANT, F; ROBIN, V; FERNANDEZ-AGUILAR, S; CENTNER, J; et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. **Hum Reprod**, v.21(8):2010-4, 2006.

DONNEZ, J; DOLMANS, M.M; DEMILLE, D; JADOUL, P; PIRARD, C; SQUIFFLERT, J; et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v.19:1287-93, 2004.

DONNEZ, J; DOLMANS, M.M; DEMYLLE, D; JADOUL, P; PIRARD, C; SQUIFFLET, J; et al. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. **Hum Reprod**, v.21(1):183-8, 2006.

EPPIG, J.J; SCHROEDER, A.C. Developmental capacity of mouse oocytes that undergo maturation in vitro: effect of the hormonal state of the oocyte donor. **Gamete Res**, v.24:81-92, 1989.

ERNST, E; BERGHOLDT, S; JORGENSEN, J.S; ANDERSEN, C.Y. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.25(5):1280-81, 2010.

FAGUNDES, L.M; COSTAL, E.P; TORRES, A.A; et al. Vitrificação de Ovócitos Desnudados ou Não e Previamente Maturados In Vitro. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33(5):1128-34, 2004.

FAHY, G.M; MACFARLANE, D.R; ANGELL, C.A; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21:407-426, 1984.

GOSDEN, R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Mol Cell Endocrinol**, v.163:125-9, 2000.

HOVATTA, O; SILVER, R; KRAUSZ, T; ABIR, R; MARGARA, R; TREW, G; et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. **Hum Reprod**, v.11:1268-72, 1996.

ISACHENKO, V; ISACHENKO, E; JUERGEN, M; WEISS; TODOROV, P; KREIENBERG,R. Cryobanking of Human Ovarian Tissue For Anti-Cancer Treatment: Comparison of Vitrification and Conventional Freezing. **CryoLetters**, v. 30(6):449-454, 2009.

JONES, S.K & DARVILLE, J.M. Transmission of virus-particles by cryo-therapi and multi-use caustic pencils: a problem to dermatologist? **British Journal of Dermatology**, v.121:110-14, 1989.

KIM, S.S; RADFORD, J; HARRIS, M; VARLEY, J; RUTHERFORD, A.J; LIEBERMAN, B; et al. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. **Hum Reprod**,v.16(10):2056-60, 2001.

LUCCI, C.M; KACINSKIS, M.A; LOPES, L.H.R; RUMPF, R; BÁO, S.N. Effect of different cryoprotectants on structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61:1101-1114, 2004.

MALTARIS, T; DIMMLER, A; MÜLLER, A; et al. Comparison of two freezing protocols in an open freezing system for cryopreservation of rat ovarian tissue. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v.32(3):273-279, 2006.

MANZUR, P; LEIBO, S.P; CHU, E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp Cell Res**, v. 71:345-55,1972.

MARTINEZ-MADRID, B; DOLMANS, M.M; VAN LANGENDONCKT, A; DEFREERE, S; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertil Steril**,v. 82:1390-4, 2004.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, Washington, DC, v.168:939-949, 1970.

MAZUR, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. **Cryobiology**; San Diego, California, v.2(4):181-192, 1996.

MCGANN, L.E. Differing action of penetrating and non penetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v.15:333-336, 1978.

MEIROW, D; LEVRON, J; ELDAR-GEVA, T; HARDAN, I; FRIDMAN, E; ZALEL, Y; et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in patient with ovarian failure after chemotherapy. **N Engl J Med**, v. 353: 318-21, 2005.

MERYMAN, H.T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v.8(2):173-183, 1971.

MIYAMOTO, H; ISHIBASHI, T. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54:427-432, 1978.

MURAT SONMEZER, M.D; KUTLUK OKTAY, M.D. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Best Practice e Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.24:113-126, 2010.

NEWTON, H; AUBARD, Y; RUTHERFORD, A; SHARMA, V; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum Reprod**, v.11(7):1487-91, 1996.

NEWTON, H; AUBARD, Y; RUTHERFORD, A; SHARMA, V; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum Reprod**, v.11:1487-91, 1996.

OKTAY, K; SCHENKEN, R.S; NELSON, J.F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biol Reprod**, v.53(2):295-301, 1995.

PORCU, E; FABBRI, R; SARACCCHIOLI, R; CIOTTI, P.M; MAGRINI, O; et al. Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. **Fertil Steril**, v. 68:724-6,1997.

RADFORD, J.A; LIEBERMAN, B.A; BRISON, D.R; SMITH, A.R; CRITCHLOW, J.D; RUSSELL, S.A; et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical



strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. **Lancet**, v.357(9263):1172-5, 2001.

ROSA E SILVA, A.C. Fertility Preservation. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28(6):365-72, 2006.

SCHAFFER, T.W; EVERETT, J; SILVER, G.H & CAME, E. Biohazard: virus-contaminated liquid nitrogen. **Science**, v.192:25-26, 1976.

SCHUFFNERA, A; RAMOSC, L; STOCKLERA, S; HERNANDESA, R; COSTA, S; CENTA, L. Cryopreservation of gametes – a hope for câncer patients. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50(2):117-1206, 2004.

SOMMERFELD, V; NOEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38:95-105, 1999.

SONMEZER, M; SHAMONKI, MI; OKTAY, K. Ovarian tissue cryopreservation: Benefits and risks. **Cell Tissue Res**, v. 322: 125-132, 2005.

TEDDER, R.S; ZUCKERMAN, M.A; GOLDSTONE, A.H; HAWKINS A.E; FIELDING, A; BRIGGS, E.M; IRWIN, D; BLAIR, S; GORMAN, A.M; PETTERSON, K.G; et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. **Lancet**, v.346:137-40, 1995.

TROUNSON, A; KIRBY, C. Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethylsulphoxide. **Fertil Steril**, v.7:95-103, 1989.

VICENT, C; PICKERING, S.J; JONHSON, M.H. The hardening effects of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with reduction in the number of cortical granules present. **J Reprod Fertil**, v. 9:253-9, 1990.

VISINTIN, J.A; MARTINS, J.F.P; BEVILACQUA, E.M; MELLO, M.R.B; NICÁCIO, A.C; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different? **Theriogenology**, v.57:345-59, 2002.

WERLICH, D.E; et al. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre RS, v.34(1):77-82, 2006.