

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Eduardo de Oliveira Sanguinet

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE TECIDO OVARIANO VITRIFICADO: AJUSTE  
DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA DISTINÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
PROVOCADAS PELA CRIOPRESERVAÇÃO DAQUELAS ADVINDAS DO  
PREPARO TECIDUAL**

Porto Alegre

2017

Eduardo de Oliveira Sanguinet

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE TECIDO OVARIANO VITRIFICADO: AJUSTE  
DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA DISTINÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
PROVOCADAS PELA CRIOPRESERVAÇÃO DAQUELAS ADVINDAS DO  
PREPARO TECIDUAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Embriologia

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Adriana Bos-Mikich

Porto Alegre

2017

#### CIP - Catalogação na Publicação

Sanguinet, Eduardo

Análises histológicas de tecido ovariano vitrificado: ajuste do processamento histológico para distinção das alterações provocadas pela criopreservação daquelas advindas do preparo tecidual / Eduardo Sanguinet. -- 2017.

38 f.

Orientador: Adriana Bos-Mikich.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Técnicas histológicas. 2. Tecido ovariano criopreservado. 3. Vitrificação. 4. Criopreservação. 5. xilol. I. Bos-Mikich, Adriana, orient. II. Título.

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

Eduardo de Oliveira Sanguinet

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE TECIDO OVARIANO VITRIFICADO: AJUSTE  
DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA DISTINÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
PROVOCADAS PELA CRIOPRESERVAÇÃO DAQUELAS ADVINDAS DO  
PREPARO TECIDUAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

Esteliana Mantovan (UFRGS)

Nome do professor - instituição

Luellenauer (UFRH)

Nome do professor - instituição

Adriana B. J. S.

Nome do professor - instituição (orientador)

## RESUMO

**Introdução:** Os efeitos advindos do preparo histológico podem ser interpretados como efeitos causados pela criopreservação sobre os tecidos ovarianos.

**Objetivo:** O presente trabalho averiguou se os tecidos ovarianos sofreriam alguma alteração morfológica quando expostos a diferentes tratamentos de xilol após a criopreservação.

**Materiais e Métodos:** Fragmentos grandes e pequenos de tecido ovariano foram vitrificados em uma cápsula metálica. Após o reaquecimento o tecido vitrificado foi cultivado por 48 horas. Durante o processamento histológico, os fragmentos frescos e vitrificados foram submetidos a três tratamentos diferentes de xilol.

**Resultados:** Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na qualidade do estroma de tecidos frescos e vitrificados expostos aos tratamentos de xilol. Entretanto, os fragmentos grandes vitrificados apresentaram perdas significativas na sua qualidade de estroma em comparação aos fragmentos frescos ( $P= 0,0218$ ). A qualidade folicular dos tecidos frescos diminuiu com a redução do tempo de exposição ao xilol, enquanto que a qualidade folicular dos tecidos vitrificados aumentou com a diminuição do tempo de exposição ao solvente. Não houve diferenças significativas no aumento das taxas de qualidade folicular em ambos os grupos, fresco e vitrificado, após a reanálise dos dados utilizando os parâmetros da literatura para integridade folicular ( $P= 0,1025$ ).

**Conclusão:** O tecido ovariano após a criopreservação apresenta algumas alterações significativas quando exposto ao xilol, mostrando que adequações nos protocolos de técnicas histológicas devem ser realizadas.

**Palavras-chave:** Técnicas Histológicas. Xilol. Tecido ovariano criopreservado.

## ABSTRACT

**Introduction:** The effects of histological preparation can be interpreted as effects caused by cryopreservation on the ovarian tissues.

**Objective:** The present study investigated whether ovarian tissues would undergo a morphological change when exposed to different xylol treatments after cryopreservation.

**Methods:** Large and small fragments of ovarian tissue were vitrified in a metal capsule. After rewarming tissue samples were cultured for 48 hours. During histological processing, the fresh and vitrified fragments were submitted to three different treatments of xylol.

**Results:** The results showed that there was no significant difference in the stromal quality of fresh and vitrified tissues exposed to xylol treatments. However, large vitrified fragments showed significant losses in their stromal quality compared to fresh fragments ( $p = 0.0218$ ). The follicular quality of the fresh tissues decreased with the reduction of the time of exposure to xylol, whereas the follicular quality of the vitrified tissues increased with the decrease of the time of exposure to the solvent. There were no significant differences in the increase in follicular quality rates in both fresh and vitrified groups after the reanalysis of the data using the literature parameters for follicular integrity ( $p = 0.1025$ ).

**Conclusion:** The ovarian tissue after cryopreservation presents some significant changes when exposed to xylol, showing that adequacies in the protocols of histological techniques should be performed.

**Keywords:** Histology Techniques. Xylol. Cryopreserved ovarian tissue.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma esquemático do experimento.....	18
Figura 2 – Fotomicrografias ilustrativas de cortes histológicos de ovário.....	18
Figura 3 – Porcentagem de fragmentos por proporção de danos por área entre os cortes dos fragmentos pequenos e grandes do grupo de tecido fresco (a) e vitrificado (b).....	19
Figura 4 – Porcentagem de fragmentos por proporção de danos por área entre os cortes dos fragmentos pequenos do tecido fresco (esquerda) e vitrificado (direita).....	20
Figura 5 – Porcentagem de fragmentos por proporção de danos por área entre os cortes dos fragmentos grandes do tecido fresco (esquerda) e vitrificado (direita).....	20
Figura 6 – Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários com visualização folicular. Comparação dos resultados obtidos, no presente trabalho, com aqueles observados na literatura.....	22
Figura 7 – Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários com visualização folicular. Exemplos de efeitos da histologia comparados com aqueles estimados como sendo da criopreservação.....	23

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Tratamentos de xilol e respectivos tempos.....	17
Tabela 2 – Qualidade folicular do tecido fresco.....	24
Tabela 3– Qualidade folicular do tecido vitrificado.....	25



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO COMPREENSIVA .....</b>	<b>10</b>
1.1	JUSTIFICATIVA .....	13
1.2	OBJETIVOS .....	14
1.2.1	Objetivo geral.....	14
1.2.2	Objetivos específicos.....	14
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL CRYOLETTERS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

A criopreservação de células mamíferas teve seu primeiro sucesso quando POLGE et al. (1949) demonstrou que com o auxílio do glicerol era possível o congelamento de espermatozoides de aves, protegendo essas estruturas de lesões causadas pelo congelamento. A partir de então, muitas células de mamíferos passaram a ser criopreservadas a  $-196^{\circ}\text{C}$ . A manutenção de embriões e gametas viáveis em temperaturas a baixo de zero é uma importante adjunto as técnicas de fertilização *in vitro* e transferência de embriões em diversas espécies de mamíferos. Em 1972 nasceram os primeiros camundongos resultantes da transferência de embriões criopreservados (WHITTINGHAM et al., 1972). O mesmo grupo de pesquisadores (WHITTINGHAM, 1997) logrou, por meio da metodologia de congelamento e descongelamento lento, a preservação de oócitos maduros com altas taxas de viabilidade utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotetor (WHITTINGHAM et al., 1972 e 1997; WILMUT, 1972; WHITTINGHAM, 1997). Desde então, a criopreservação de embriões e gametas foi utilizada para diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos com muito sucesso por procedimentos de congelamento similares.

Atualmente, a criopreservação de gameta masculino é um procedimento muito bem estabelecido, a qual vem sendo muito utilizada rotineiramente em clínicas do mundo inteiro. No entanto, a criopreservação do gameta feminino não é tão corriqueira, pois ainda não está estabelecida uma única técnica aceita como padrão para uso clínico. Mesmo assim, esta técnica deixou de ser considerada uma metodologia de caráter experimental em 2013 pela ASMR (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2013). A criopreservação de oócitos ou embriões passou a ser indicada para mulheres com câncer que correm o risco de infertilidade. Entretanto, estas técnicas são inapropriadas para crianças, adolescentes ou mulheres cujo curso clínico não fornece tempo adequado para a estimulação à base de hormônios para obtenção dos oócitos. Portanto, a criopreservação de tecido ovariano tornou-se uma potencial alternativa para preservar a fertilidade de mulheres ou jovens meninas, em condições oncológicas (DONNEZ; BASSIL, 1998). Assim, a fertilidade e a função hormonal destas pacientes podem potencialmente ser restauradas após estarem livres da condição oncológica com o retransplante do tecido ovariano (BROECKE et al., 2001). Estudos indicam que a criopreservação não altera significativamente a integridade morfológica do tecido ovariano e os níveis hormonais em cultura (LI et al., 2007). Dados

recentes descrevem o nascimento de mais de 80 bebês, após a criopreservação de tecido ovariano, por diferentes métodos de criopreservação (ESHRE, 2017).

Os métodos de criopreservação de tecido ovariano mais frequentemente utilizados são as técnicas de congelamento lento e de vitrificação. O congelamento lento (Slow-Freezing), metodologia convencional, é caracterizado pela utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores e pela redução gradual da temperatura, controlada por um equipamento programável (WHITTINGHAM; LEIBO; MAZUR, 1972). Apesar de ser amplamente difundido, a sua aplicação em programas de reprodução assistida apresenta um custo relativamente alto devido à necessidade de equipamentos sofisticados. Além disso, durante o procedimento pode haver a formação de cristais de gelo intracelulares, pela redução lenta da temperatura que ocorre durante a realização do processo de congelamento do tecido.

A vitrificação surgiu como um método alternativo ao congelamento lento com o objetivo de evitar a formação de gelo intracelular, assim como também, diminuir o tempo do procedimento e a necessidade de um equipamento de congelamento (RALL; FAHY, 1985). Esta técnica se baseia no uso de altas concentrações de crioprotetores e no resfriamento rápido do tecido, de forma que alcance diretamente o estado vítreo sem a exposição do tecido ao estado cristalino, evitando, assim, a formação de gelo intracelular (RALL; FAHY, 1985). Os crioprotetores comumente usados na vitrificação incluem o DMSO, propanodiol, polietileno glicol.

HOVATTA et al. (1996) foi pioneira nos estudos de criopreservação de tecido ovariano humano utilizando propanodiol (PROH)–sacrose e dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetores para a preservação do córtex ovariano humano, baseando-se nos bons resultados obtidos com camundongos desde a década de 50 (DEANESLY et al., 1954; GREEN et al., 1956; PARKES, 1958; HOVATTA et al., 1996; NEWTON et al., 1996). Desde então, vários pesquisadores têm formulado diversos protocolos com o objetivo de aumentar a eficácia da vitrificação.

Os resultados das diferentes técnicas de criopreservação de tecido ovariano, seja por congelamento lento ou vitrificação foram, entre outros parâmetros, reportados em sua grande parte em termos de achados histológicos de tecido pós-descongelado ou reaquecimento (WANG et al., 2008; KAGAWA et al., 2009; FABBRI et al., 2010; KHOSRAVI et al., 2013; GAVISH et al., 2014; XIAO et al., 2017). Estudos comparativos entre o método padrão (Slow-Freezing) e a vitrificação mostram resultados semelhantes em termos de integridade do tecido criopreservado (KEROS et al., 2009; HERRAIZ et al., 2013). Entretanto, os resultados de ambas as metodologias, quando são comparados aos tecidos frescos, apresentam discretas

alterações no estroma e nos folículos. Estas alterações são consideradas como associadas a efeitos da criopreservação sobre o tecido. Porém, nenhum trabalho na literatura relaciona tais danos como podendo ser causados durante o preparo do tecido para análises microscópicas. O processamento dos tecidos para histologia envolve diversas etapas incluindo a fixação, a desidratação e a diafanização, entre outras. Estes processos estão descritos de forma uniformizada e são utilizados por laboratórios de técnicas histológicas no mundo inteiro para o preparo de diferentes tecidos frescos, fixados logo após a sua coleta. O tecido submetido à criopreservação pode, potencialmente, apresentar propriedades estruturais ou de resistência aos processos histológicos diferentes daquelas de tecidos frescos. Estas alterações não necessariamente comprometeriam a viabilidade do tecido, mas seriam evidenciadas como “danos” nas amostras biológicas criopreservadas causados pela inadequação da metodologia histológica e não pela criopreservação em si. Assim, lesões teciduais observadas podem vir a ser interpretadas erroneamente como sendo da criopreservação e levar a conclusões falsas dos achados durante as análises em microscópio.

Durante o processamento histológico algumas etapas envolvem difusões de reagentes que possibilitam a saída de líquido dos tecidos, como a desidratação do material biológico com álcool, e a entrada de outros, como o xilol, que remove o álcool e promove a diafanização do material biológico. Além disso, o xilol é um solvente que facilita a impregnação do tecido com parafina e sua remoção após a microtomia para coloração dos cortes histológicos (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). O xilol é um solvente orgânico derivado do petróleo com um potencial tóxico significativo, classificado como um hidrocarboneto, que possui propriedades lipofílicas. Este solvente tende a se acumular em frações adiposas dos tecidos, como em membranas celulares podendo perturbar suas propriedades físico-químicas e fisiológicas (CROUTE et al., 2002; USEPA, 2010), como por exemplo, afetar a qualidade e morfologia do estroma do tecido e dos folículos.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A criopreservação de tecido ovariano que ainda se encontra em fase de estudos tem sua eficiência muitas vezes avaliada por parâmetros de qualidade do estroma e dos folículos. Diversos trabalhos têm diagnosticado os efeitos da criopreservação sobre a morfologia do tecido ovariano através da histologia ao longo dos anos. A histologia compreende diversas etapas, das quais algumas fazem o uso de solventes como agentes diluidores, o xilol, o qual possui um potencial efeito tóxico às membranas celulares, podendo promover alterações estruturais e fisiológicas nas mesmas. Efeitos que, muitas vezes, podem ser interpretados como sendo efeitos advindos da criopreservação durante análises de lâminas pelos investigadores, o que acaba sendo uma inverdade dos achados. Na literatura até hoje não encontramos nenhum trabalho que apresente resultados sobre a diferença de efeitos que são provocados pela criopreservação daqueles que possam ser provocados durante o processamento histológico. Logo, ajustes efetivos e controlados em protocolos de histologia são de grande valia, visando uma minimização de danos que possam ocorrer durante o processamento histológico para que não haja interpretações errôneas dos resultados descritos.

## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi averiguar se modificações no tempo de exposição do tecido ovariano criopreservado ao xilol promovem alterações a nível estrutural do estroma e dos folículos ovarianos e comparar estas potenciais alterações com os dados descritos na literatura como danos causados pelas técnicas de criopreservação.

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo foi verificar se a diminuição do tempo de exposição do tecido ovariano ao xilol pode provocar melhora na qualidade morfológica folicular e do estroma, pós-criopreservação.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Criopreservar o tecido ovariano pela metodologia de Vitriificação em uma cápsula metálica e após o reaquecimento cultivar o tecido ovariano por 48 horas;
- Submeter o tecido ovariano fresco e vitrificado ao processamento histológico, passando pelas etapas de fixação, diafanização, inclusão com parafina, cortes em micrótomo e desparafinação do tecido e coloração por HE;
- Submeter os fragmentos dos tecidos ovarianos frescos e vitrificados a três tratamentos diferentes de xilol com tempos decrescente para a remoção da parafina e confecção de lâminas
  - Confeccionar lâminas e avaliar por microscopia óptica, se houve alterações significativas estruturais e morfológicas no estroma e na qualidade folicular nos tecidos submetidos aos diferentes tratamentos de xilol.
  - Comparar os resultados obtidos da histologia com achados literários tendo como parâmetros o estroma e a qualidade folicular.

## **2 ARTIGO CIENTÍFICO**

O artigo científico gerado a partir deste trabalho de conclusão de curso foi redigido conforme as normas de publicação do International Journal CryoLetters (ANEXO A).

# ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE TECIDO OVARIANO VITRIFICADO: AJUSTE DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA DISTINÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROVOCADAS PELA CRIOPRESERVAÇÃO DAQUELAS ADVINDAS DO PREPARO TECIDUAL

Eduardo Sanguinet\*, Ágata Dupont, Maitê Ferreira, Nilo Frantz e Adriana Bos-Mikich.

Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Autor correspondente: [esanguinet22@gmail.com](mailto:esanguinet22@gmail.com);

## Resumo

**INTRODUÇÃO:** Os efeitos advindos do preparo histológico podem ser interpretados como efeitos causados pela criopreservação sobre os tecidos ovarianos. **OBJETIVO:** O presente trabalho averiguou se os tecidos ovarianos sofreriam alguma alteração morfológica quando expostos a diferentes tratamentos de xilol após a criopreservação. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Fragmentos grandes e pequenos de tecido ovariano vitrificados em uma cápsula metálica e cultivados por 48 horas pós-reaquecimento. Durante o processamento histológico, os tecidos frescos e vitrificados foram submetidos a três tratamentos diferentes de xilol. **RESULTADOS:** Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na qualidade do estroma de tecidos frescos e vitrificados entre aos tratamentos de xilol. Entretanto, houve danos significativos nos fragmentos grandes vitrificados ( $P=0,0218$ ). A histologia afeta de forma contrastante a qualidade folicular tecido fresco e vitrificado. **CONCLUSÃO:** O tecido após a criopreservação apresenta algumas alterações significativas quando exposto ao xilol, mostrando que adequações nos protocolos de técnicas histológicas devem ser realizadas.

**Palavras-chave:** Técnicas Histológicas, Xilol, Tecido ovariano criopreservado.

## INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos citam que alterações morfológicas pós-criopreservação presentes nos tecidos ovarianos estão associadas ao uso dos crioprotetores (26, 10, 27). Estes trabalhos de fato não citam de forma clara e detalhada como os tecidos ovarianos foram processados para as análises histológicas, permitindo, assim, supor que os tecidos frescos, sem criopreservação, e os tecidos criopreservados sofrem o mesmo tratamento universal, padrão de diafanização, inclusão, desparafinação e coloração para a confecção de lâminas histológicas.

Durante o processamento histológico algumas etapas envolvem difusão de reagentes que possibilitam a saída de líquido

dos tecidos, como a desidratação tecidual com álcool, e a entrada de xilol, que remove o álcool e promove a diafanização do material biológico, além de ser um solvente e facilitar a impregnação do tecido com parafina e removê-la após a microtomia, para coloração do tecido (4). O xilol é um solvente orgânico derivado do petróleo com um potencial tóxico significativo, classificado como um hidrocarboneto que possui propriedades lipofílicas tendendo acumular se em frações adiposas dos tecidos, como em membranas celulares, podendo assim, perturbar suas propriedades físico-químicas e fisiológicas (5, 25). As alterações promovidas pelo xilol podem afetar significativamente a qualidade do estroma e a qualidade folicular em



exposições prolongadas do tecido ao solvente. Estudos anteriores relatam que a exposição prolongada do tecido ao xilol durante o processamento histológico pode endurecer o tecido a ser impregnado prejudicando sua qualidade do material (19).

Empiricamente podemos supor que a vitrificação/reaquecimento mesmo que não cause danos à viabilidade do tecido, pode levar a uma sensibilidade diferenciada ao processamento histológico. As membranas celulares são estruturas muito exigidas para a criopreservação, visto que elas são responsáveis pelo fluxo dos crioprotetores (7). Diversos estudos, em diferentes tipos celulares demonstraram alterações de membrana plasmática causadas pelos crioprotetores, sem necessariamente afetar a viabilidade celular (16, 21, 24). Este estresse fisiológico de transporte trans-membrana não ocorre em tecidos frescos e pode levar a alterações a nível estrutural ou de permeabilidade das membranas celulares, o que levaria a uma sensibilidade diferenciada desta estrutura ao xilol, quando comparada ao tecido não-criopreservado.

O objetivo deste trabalho foi verificar se alterações no tempo de exposição do tecido ovariano criopreservado ao xilol, podem afetar a morfologia do estroma e a qualidade folicular.

## MATERIAIS E MÉTODOS

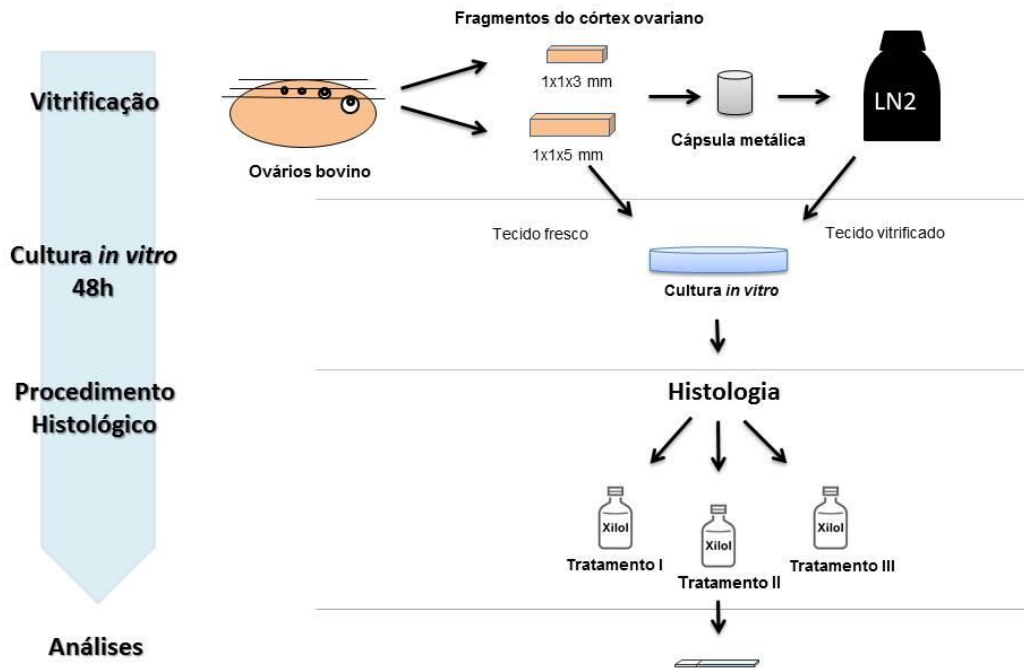
### *Processamento dos tecidos e procedimento de vitrificação*

Ovários bovinos foram coletados em um abatedouro local e transportados para o laboratório dentro de 2 h após o abate em vasilha de vidro estéril contendo solução salina em temperatura ambiente (23°C). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de nossa Instituição (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, nº 25088).

Nosso protocolo segue os procedimentos descritos por Kagawa et al (2007), com algumas pequenas modificações. O córtex ovariano foi cortado em dois tamanhos distintos: 1x1x3 mm (fragmentos pequenos, FP) e 1x1x5 mm (fragmentos grandes, FG) com bisturi. As amostras foram transferidas para solução de equilíbrio (ES) de 7,5% de etilenoglicol (EG) e DMSO seguido da solução de vitrificação (VS) de 15% EG e DMSO, em meio HTF (Irvine), por 25 e 15 minutos, respectivamente. A transferência dos fragmentos de uma solução para a outra foi feita com o auxílio de um pincel estéril para evitar danos ao tecido e contaminação de uma solução a seguinte. De 10 a 12 pedaços de tecido de diferentes ovários foram colocados no fundo de um criovial de metal (Patente nº: BR 20 2013 019739 0), o qual assim que fechado foi imerso em LN<sub>2</sub> (1). Em cada repetição experimental, quatro a cinco amostras frescas de diferentes ovários foram fixadas em paraformaldeído 8% por 15 min.

**Tabela 1:** Tratamentos de xilol e respectivos tempos.

Tratamentos	Banho e Tempo		
	1º Banho	2º Banho	3º Banho
<b>Tratamento I</b>	30 min	25 min	15 min
<b>Tratamento II</b>	25 min	20 min	10 min
<b>Tratamento III</b>	20 min	15 min	10 min

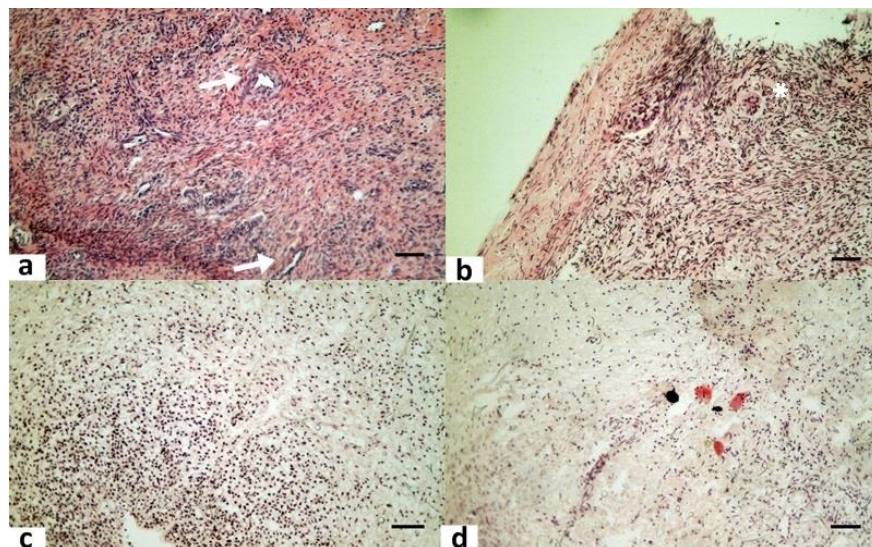


**Figura 1:** Fluxograma esquemático do experimento.

#### *Reaquecimento e cultura do tecido*

As cápsulas metálicas foram removidas do LN<sub>2</sub> e expostas à água da torneira por 30 segundos para abrir a tampa. Em seguida, as bases das cápsulas eram postas em banho de

água a 37 °C por 1 min. Os tecidos eram removidos do fundo das cápsulas e transferidos para a primeira solução de aquecimento (S1 Rewarming solution) contendo 1M de sacarose durante 1 min,



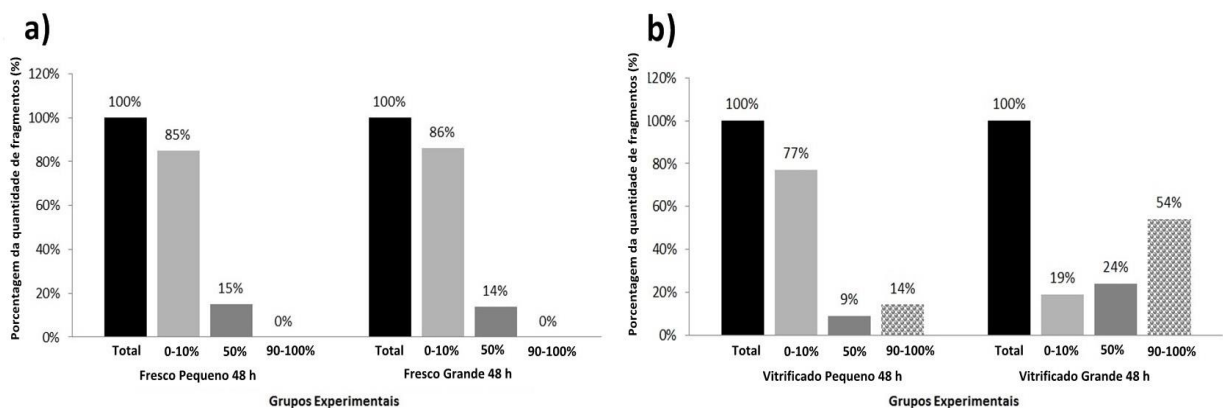
**Figura 2:** Fotomicrografias ilustrativas de cortes histológicos de ovário. Tecido fresco (a) e tecido vitrificado (b). Exemplos de danos no tecido: Tecido vitrificado com perdas de 50% (c) e Vitrificado com perdas de 90-100%(d). Setas em branco apontando vasos íntegros. Asterisco: Foliculo primários Aumento: 10x.(a,b, c e d). Bar= 10 um.

seguido de a segunda solução (S2 Dilution solution) contendo sacarose 0,5 M durante 3 min e a última solução (S3 Wash solution) de 0,25 M Sacarose por 5 min. Todas as soluções estavam à temperatura ambiente. Após o reaquecimento dos fragmentos, eles foram cultivados durante 48 horas em meio HTF suplementado com 20% de soro substituto (SSS, Irvine) a 38,5°C. As amostras de tecido fresco de diferentes ovários foram colocadas sob as mesmas condições de cultura (Cultura fragmento pequenos/Cultura fragmentos grande, controles). Os fragmentos de tecido ovariano dos diferentes grupos foram fixados em paraformaldeído 8% por 15 minutos, após foram lavados duas x em álcool absoluto e deixados sobre-noite (cerca de 12 horas) até o processamento do material.

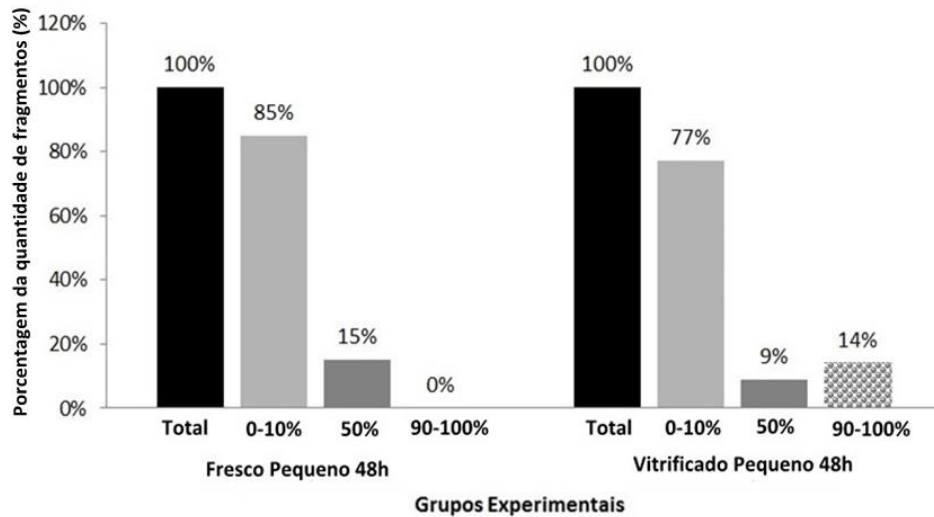
#### ***Processamento histológico das amostras***

Os diferentes grupos de tecido ovariano foram submetidos ao processamento histológico corriqueiramente empregado no Laboratório de Histologia e Embriologia

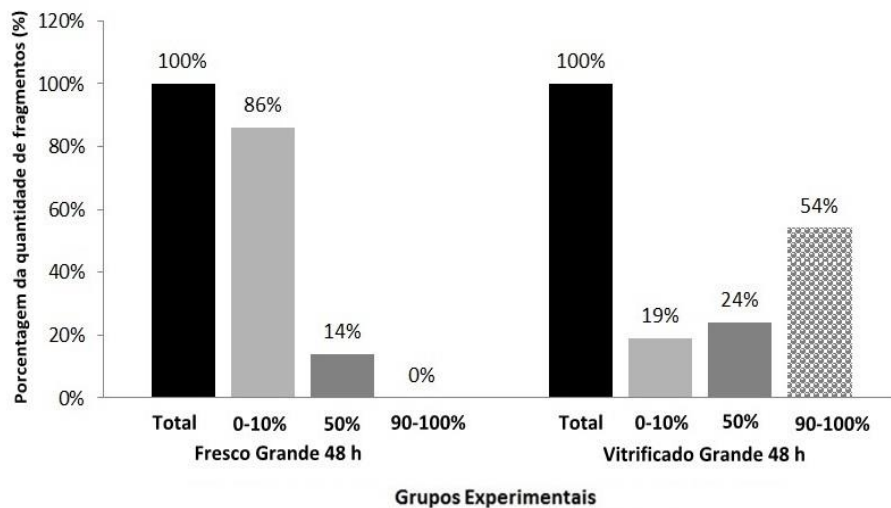
Comparada. A desidratação tecidual foi realizada através de 4 banhos de álcool absoluto, iniciando com 3 banhos de 2 minutos e 1 banho de 20 minutos. A diafanização (clareamento) com o uso de xilol (Xilol, LabSynth, SP, Brasil) foi realizada por uma sequência 2 banhos, o primeiro banho por 30 minutos e o segundo banho por 20 minutos. A impregnação/inclusão foi feita em parafina líquida (Parafina Histológica em flocos, Êxodo Científica, SP, Brasil) (60°-70°) consistindo em 2 banhos de 40 minutos, o primeiro banho com 10% de xilol e o segundo com parafina pura. A seguir, os fragmentos de tecido foram deixados em temperatura ambiente para o endurecimento do bloco de parafina. Após 24 horas, os blocos eram utilizados para confecções de cortes de 7 µm de espessura em um micrótomo rotativo manual. A cada 10 cortes, os 3 primeiros eram recolhidos com uma lâmina de vidro e deixados para secar em estufa a 38°C overnight.



**Figura 3:** Porcentagem de fragmentos por proporção de danos por área entre os cortes dos fragmentos pequenos e grandes do grupo de tecido fresco (a) e vitrificado (b). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, fragmentos pequenos e grandes do tecido fresco (a) e vitrificado (b),  $P=0,1025$  e  $P=0,4739$  respectivamente. Quantidade total de cortes (preto), tecidos bons com danos não significativos (cinza), cortes com danos médios (cinza grafite) e cortes danificados (Cinza pontilhado).



**Figura 4:** Porcentagem de fragmentos por proporção de danos por área entre os cortes dos fragmentos pequenos do tecido fresco (esquerda) e vitrificado (direita). Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, fragmentos pequenos do tecido fresco e vitrificado,  $P=0,1025$ . Quantidade total de cortes (Preto), tecidos bons com danos não significativos (cinza), cortes com danos médios e cortes danificados (cinza pontilhado).



**Figura 5:** Porcentagem de fragmentos por proporção de danos por área entre os cortes dos fragmentos grandes do tecido fresco (esquerda) e vitrificado (direita). Os fragmentos grandes do tecido vitrificado apresentam danos significativos quando comparado aos do tecido fresco,  $P=0,0218$ . Quantidade total de cortes (Preto), tecidos bons com danos não significativos (cinza), cortes com danos médios (cinza grafite) e cortes danificados (Cinza pontilhado).

A remoção de parafina é feita pelo uso de xilol, que consiste em uma bateria de três banhos consecutivos com tempos

decrecentes, o primeiro banho de 30 minutos, o segundo banho de 25 e o último banho de 15 minutos. Portanto, os cortes

parafinados foram submetidos a três tratamentos de xilol em tempos decrescentes, quais sejam: I: tratamento padrão; II: diminuição de cinco minutos em cada banho do tratamento I; III: diminuição de 10 minutos em cada banho do tratamento I (Tabela 1 e Figura 1). Após, seguiu-se os procedimentos conforme protocolo padrão,

qual sejam, os cortes foram hidratados com álcool em concentrações decrescentes, 99%, 96%, 80% e 70%, com duração de 5, 1, 1 e 1 minuto(s), respectivamente, transferidos para água destilada por 1 minuto e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes corados foram lavados 3x em álcool 80% e depois por 3 banhos de álcool para desidratação, o primeiro banho de álcool 96% por 1 minuto e os outros dois banhos de álcool 99% por 3 minutos cada. O tecido foi diafanizado, novamente, por dois banhos de 5 minutos cada e mais 3 banhos de xilol, 3 minutos. A montagem das lâminas foi realizada utilizando bálsamo do Canadá e lamínula.

Os folículos foram classificados conforme seu estágio de desenvolvimento em: Primordiais contendo uma única camada de células de granulosa pavimentosa; Primários contendo única camada completa de células de granulosa cuboide e os secundários contendo diversas camadas de células da granulosa cuboide e a presença de um antro. Critérios considerados para classificação de folículo primordial ou primário danificado incluem: presença de vacúolos no oócito, vesícula germinativa picnótica, desprendimento dos folículos da membrana basal, camada de células foliculares incompletas em torno do oócito. A qualidade do estroma foi avaliada de forma subjetiva de acordo com a proporção de dano no campo de visão: 0 a 10%, 50% e de 90 a 100% de danos. Critério para considerar tecido com danos: Vacuolização e presença de núcleos picnóticos nas células do estroma. As amostras foram analisadas as cegas.

#### **Análises estatísticas**

As diferenças das médias entre o tecido fresco e vitrificado, fragmentos grandes e

pequenos, submetidos aos diferentes tratamentos de xilol foram analisadas estatisticamente usando o teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de comparação múltiplo Dunn (versão Bioestat 5.0). Valores de  $P < 0,05$  eram considerados significativos.

## **RESULTADOS**

Setenta e duas lâminas histológicas foram analisadas, contendo um total de 264 cortes, de tecido ovariano, dividido em grupos de tecido fresco (controle) e vitrificado (tratados) em distintos tamanhos, fragmentos grandes e pequenos. Deste total de cortes, 2% foram retirados das análises por problemas advindos da montagem das lâminas. Todos os cortes histológicos foram realizados em fragmentos de tecidos já emblocados e utilizados para confecção de lâminas de um estudo anterior, já em andamento no laboratório.

#### ***Qualidade do estroma ovariano***

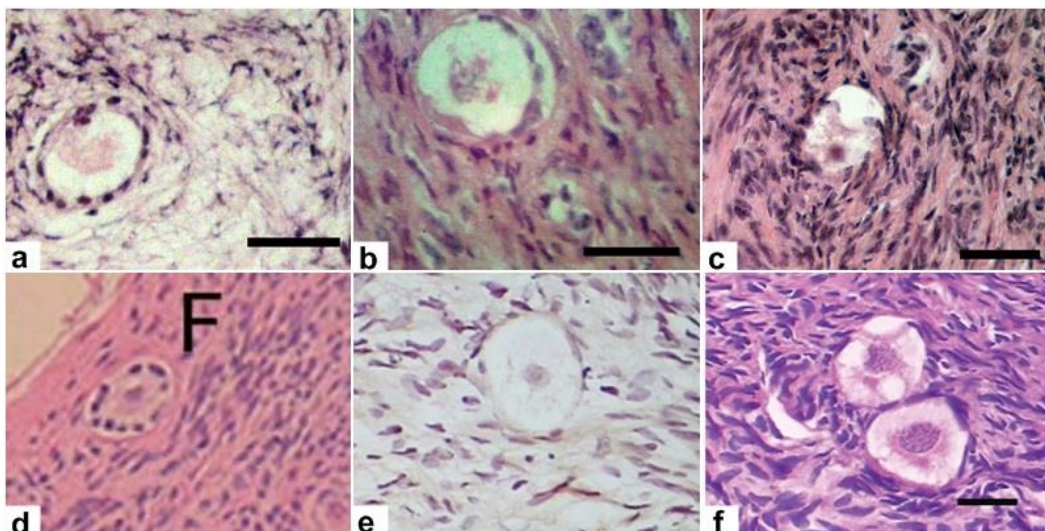
De uma maneira geral, o estroma de tecido fresco apresenta uma maior “compactação” das células e fibras colágenas do que os tecidos vitrificados. Os tecidos ovarianos frescos e vitrificados expostos aos três tratamentos com xilol não apresentaram diferenças significativas quanto à proporção de danos do estroma (Figura 2). Entre os grupos vitrificados houve perdas entre os fragmentos de diferentes tamanhos, grandes e pequenos, observando-se uma maior perda nos fragmentos grandes do que nos fragmentos pequenos, embora estatisticamente não significativa ( $P=0,4739$ ) (Figura 3b). Quanto à qualidade do estroma nos grupos pequenos e grandes, observamos que fragmentos pequenos vitrificados não apresentam diferenças significativas, quando comparados aos tecidos frescos de tamanho pequeno (Figura 4) ( $P=0,1025$ ). Entretanto, foram observadas perdas significativas na qualidade do estroma dos fragmentos grandes do tecido vitrificado em relação ao fresco ( $P= 0,0218$ ) (Figura 5).

#### ***Qualidade folicular***

Duzentos e seis folículos foram analisados e classificados em primordiais, primários e secundários conforme descrito anteriormente. A qualidade folicular foi analisada somente por grupos de tratamentos, não distinguindo a população folicular entre os grupos dos diferentes tamanhos, fragmentos pequenos e grandes. O tecido fresco apresentou uma diminuição na qualidade de folículos primordiais e primários conforme a diminuição do tempo de exposição ao xilol. No entanto, independente do tratamento, os folículos secundários mantiveram a sua qualidade folicular (Tabela 2). O tecido vitrificado mostrou um aumento não significativo estatisticamente, na qualidade dos folículos primários e secundários conforme foi reduzido o tempo de exposição ao xilol (Tabela 3). Não foi possível realizar-se uma classificação de folículos segregada em fragmentos grandes e pequenos devido ao baixo número destas estruturas nos tecidos utilizados para estas análises.

**Análise crítica de resultados presente na literatura**

Os tecidos submetidos aos três tratamentos com xilol apresentaram um grande número de folículos danificados, seguindo os parâmetros de danos descritos nos materiais e métodos do presente trabalho. Estes danos referem-se: a) algum grau de desprendimento da membrana basal e do estroma circundante do folículo, b) oócitos com vacuolizações citoplasmáticas e c) a presença de vesícula germinativa picnótica. Estas observações demonstram uma diminuição acentuada na qualidade dos folículos nos três tratamentos. Entretanto, ao revisar e avaliar parâmetros de normalidade/integridade folicular descritos na literatura, reanalisamos e reclassificamos os folículos conforme as imagens dos artigos publicados pelos autores. Estes classificaram folículos anormais com a presença de diversos danos, segundo aos nossos critérios de danos, como sendo estruturas íntegras (Figura 6). Após a reanálise, observamos um aumento da proporção de estruturas consideradas “normais” em tecidos vitrificados, embora este aumento não foi significativo ( $P=0,1025$ ) (Tabela 2 e 3).



**Figura 6:** Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários com visualização folicular. Comparação dos resultados obtidos, no presente trabalho, com aqueles observados na literatura, a nível de qualidade folicular. Tecido ovariano corados com eosina e hematoxilina em 400X e 1000X. Parâmetros classificados como danos: Desprendimento do folículo do estroma (a, b e c); Vacuolização do citoplasma do oócitos (a). Tecido vitrificado contendo folículos classificados como íntegros: apresentando desprendimento do folículo do estroma (d, Kagawa et al., 2009); vacuolização citoplasmática do oócito (e, Xiao et al., 2017) e novamente desprendimento folicular e vacúolos no oolema (f, Wang et al, 2008). Aumento de 200x (d e c), de 400x (f) e de 100X (a, b, e). Aumento de 400X Bar=20 um; aumento de 1000X Bar=30 um.

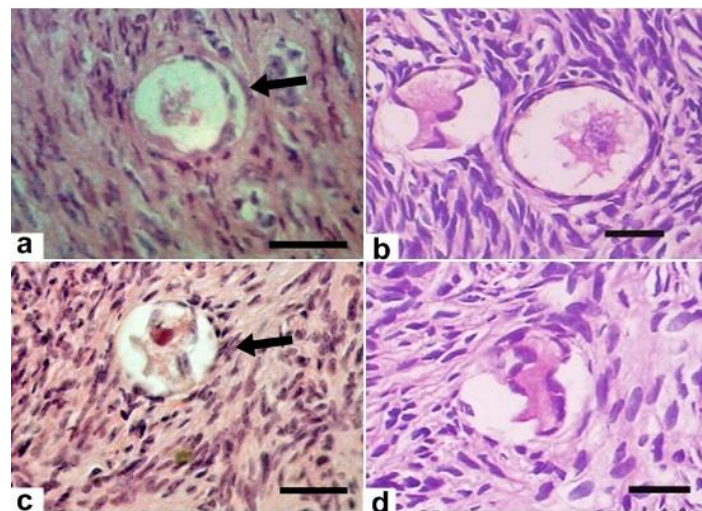
Interessante ressaltar que, alterações classificadas na literatura como efeitos da criopreservação, principalmente atribuídas aos crioprotetores, foram observadas em tecidos frescos não expostos a crioprotetores, submetidos aos três tratamentos de xilol. A figura 7 apresenta exemplos de fotomicrografias, onde são comparadas imagens com danos histológicos provenientes dos tratamentos com xilol e imagens da literatura pertinente reportando danos semelhantes como atribuídos pela criopreservação.

## DISCUSSÃO

A criopreservação de tecido ovariano é uma excelente alternativa para conservar as funções reprodutivas e endócrinas de mulheres jovens e crianças com doença oncológica, possibilitando, assim, reverter os efeitos de falência ovariana e de infertilidade que podem ser promovidas pela oncoterapia

com quimio ou radioterapia. Diversos fatores podem influenciar na restauração da função do tecido ovariano após a retransplante, e a eficiência da técnica de criopreservação é um aspecto fundamental para o sucesso do procedimento. A criopreservação de tecido ovariano têm várias vantagens em relação à criopreservação de oócitos e embriões, uma vez que, o córtex ovariano contém grande quantidade células germinativas primordiais, apresentando uma quantidade dessas células no nascimento, de cerca de 100.000, e em mulheres jovens e na faixa de alguns milhares em mulheres mais velhas (6).

Desde os primeiros procedimentos de preservação de tecido ovariano, diversos protocolos vêm sendo testados com o objetivo de aumentar a eficácia da vitrificação e a busca de uma adequada penetração de crioprotetores através do estroma e células da granulosa evitando a toxicidade dos agentes crioprotetores e minimizar a cristalização da água (11, 20). O



**Figura 7.** Fotomicrografias de cortes histológicos de ovários com visualização folicular. Exemplos de efeitos da histologia comparados com aqueles estimados como sendo da criopreservação. Tecido ovariano corado eosina e hematoxilina 400X. Tecido fresco apresentando anormalidades foliculares similares com aquelas observadas em folículos criopreservados apontada com setas em preto. O autor, Wang et al., 2008, classifica essas anormalidades como efeitos da criopreservação. Folículos do grupo fresco apresentam desprendimento folicular e vacuolização citoplasmática (a) e retrações foliculares acentuadas (c). Tecido vitrificado com folículos anormais, segundo a literatura, associados a efeito da criopreservação (b e d, Wang et al., 2008). Aumento: 400x (b, c, d); aumento de 1000X (a) bar= 30 um. 400x (c) Bar=20um.

protocolo de vitrificação utilizado neste estudo segue o procedimento descrito por Kagawa et al. (2007), com algumas modificações, referentes ao tamanho do fragmento do tecido e o uso de uma cápsula metálica, a qual foi desenvolvida pelo nosso grupo. Este sistema metálico fechado tem o objetivo de evitar o contato direto do tecido com o nitrogênio líquido e a possível contaminação do material biológico pelo Níquido (3, 1). Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que o protocolo de vitrificação com a capsula metálica é eficiente para a preservação do tecido ovariano, mantendo em bom estado de preservação os folículos primordiais, primários e também células do estroma e fibras colágenas (1, 17).

O presente estudo investigou se o tecido ovariano pós-criopreservação sofreria alterações morfológicas significativas quando exposto ao xilol por tempos distintos. Nossos resultados mostraram que a qualidade do estroma do tecido não se altera entre os três tratamentos de xilol, antes e após-criopreservação. Ao compararmos as taxas de danos por área nos diferentes tamanhos, pequeno e grande, dentro de cada grupo, fresco e vitrificado, não foram observadas diferenças significativas. Entretanto, ao comparar os fragmentos de tamanhos diferentes do grupo de tecido que

foi criopreservados com os seus respectivos controles, tecido fresco, observamos perdas no grupo vitrificado independente do tamanho, porém o grupo de tamanho grande foi o único que apresentou perdas significativas. Este aumento de perdas teciduais em fragmentos vitrificados pode ser explicado por uma sensibilização diferenciada ao xilol por dois possíveis fatores, o primeiro fator seria a criopreservação, principalmente pelo extenso preparo do tecido para o procedimento com a entrada e saída dos crioprotetores do tecido e o resfriamento pelo nitrogênio líquido podendo afetar a composição e permeabilidade da membrana plasmática destes tecidos, e o segundo fator seria o período de cultura que o mesmo foi submetido, visto que este último pode ocasionar discretos danos aos tecidos com o aumento de tempo do cultivo (28).

O método de criopreservação pode ter diferentes efeitos deletérios sobre as diferentes populações de folículos, uma vez que não ocorrer uma difusão eficiente dos crioprotetores através das células estromais e das foliculares pode levar a uma diminuição da qualidade folicular presente nos tecidos criopreservados (12, 15).

Os folículos primordiais tendem a ter uma maior tolerância à criopreservação do que folículos em desenvolvimento (20, 2, 9).

**Tabela 2:** Qualidade de folículos primordiais, primários e secundários do tecido fresco após o período de 48 horas em cultura. N= quantidade de folículos bons; Total= Total de folículos; (%) Taxa de folículos bons por tratamentos. Sem diferença significativa entre os tratamentos (p= 0,0821).

**Qualidade folicular do tecido fresco**

	<b>Primordial</b>	<b>Primário</b>	<b>Secundário</b>
	<b>N/Total (%)</b>	<b>N/Total (%)</b>	<b>N/Total (%)</b>
<b>Tratamento I</b>	138/143(96%)	76/79(96%)	18/21(85%)
<b>Tratamento II</b>	1/1(100%)	6/8(75%)	2/2(100%)
<b>Tratamento III</b>	2/4(50%)	15/28(54%)	4/5(80%)



Isto porque estes folículos são constituídos por um oócito pequeno e células da granulosa pavimentosa e pequenas, possuindo uma baixa taxa metabólica, o que diminui a sua sensibilidade ao frio, além de estarem bloqueados na prófase da meiose I e apresentarem ausência de zona pelúcida podendo ser considerados um modelo especialmente adequado para a investigação de criopreservação (23). Entretanto, nossos resultados mostram uma ausência dos folículos primordiais nos fragmentos vitrificados em ambos tamanhos, após 48 horas de cultura. Tal observação pode dever-se ao fato de que as populações de folículos primordiais encontram-se distribuídas de forma irregular no córtex ovariano conforme já relatado por Schmidt et al. (2003). Ainda, como este estudo foi motivado por observações de uma pesquisa anterior, as análises foram realizadas com fragmentos de tecidos previamente cortados. Estes fragmentos emblocados em parafina foram reutilizados para a produção de cortes do presente trabalho, esses cortes restantes podem ter sido de uma camada muito superficial ou de regiões que tiveram sua população de folículos primordiais recrutada (8) durante o reaquecimento, levando a um desenvolvimento *in vitro* desses folículos durante a cultura por 48 horas, observou um aumento da população de estruturas em desenvolvimento, primários e secundários, e

nenhum folículo primordial nas amostras vitrificadas. Resultados mostram um aumento da qualidade folicular nos fragmentos vitrificados, particularmente com a diminuição no tempo de exposição ao xilol no tratamento III. Esta observação pode ser um indicativo de que os folículos em crescimento são mais sensíveis do que o estroma, o qual não apresentou alterações significativas com a diminuição do tempo de exposição ao xilol.

Os resultados mostraram que a qualidade folicular do grupo fresco diminuiu conforme a tempo de exposição ao xilol é reduzido em relação ao período padrão descrito na literatura (banhos de 30, 25 e 20 minutos). Por outro lado, no grupo de folículos do tecido vitrificado a qualidade folicular aumentou com a redução do tempo de exposição, em relação àquele considerado ideal. Esses resultados contraditórios podem ser explicados pelas seguintes observações: ao analisarmos os cortes de fragmentos frescos observamos uma maior compactação de suas estruturas morfológicas, quando comparados aos vitrificados, podendo indicar que um tempo de exposição prolongado ao xilol seria necessário para a penetração eficiente do solvente no tecido. Em contraste, no estroma de fragmentos vitrificados, o qual apresentaria um estroma menos compactado, isto, apresentando células e feixes de colágenos aparentemente

**Tabela 3.** Qualidade de folículos primordiais, primários e secundários do tecido vitrificado após o período de 48 horas em cultura. N= quantidade de folículos bons; Total= Total de folículos; (%) Taxa de folículos bons por tratamento. Sem diferença significativa entre os tratamentos (p=0,0885).

Qualidade folicular do tecido vitrificado

	Primordial	Primário	Secundário
	N/Total (%)	N/Total (%)	N/Total (%)
<b>Tratamento I</b>	0(0%)	1/20(5%)	0/2(0%)
<b>Tratamento II</b>	0(0%)	0(0%)	1/7(14%)
<b>Tratamento III</b>	0(0%)	25/83(30%)	1/3(33%)

mais próximos e densos. Sendo assim, este tecido submetido à criopreservação teria uma sensibilidade diferenciada ao xilol, necessitando, assim, um menor tempo de exposição ao solvente. Apesar destas modificações morfológicas observadas em cortes histológicos de tecidos ovarianos vitrificados, não foram observadas diferenças significativas em nível de viabilidade tecidual medida por capacidade antioxidante dos tecidos pós-vitrificação (18). Estas observações sugerem que estas alterações do estroma não devem ter um significado fisiológico.

Durante as análises notamos uma queda na qualidade folicular nos fragmentos frescos e especialmente nos vitrificados, apresentando folículos bem alterados com alto grau de vacuolização e desprendimentos da membrana basal. Revisando a literatura, percebemos que alguns trabalhos divergiam quanto aos parâmetros de classificação de integridade folicular em relação aos nossos. Alguns autores classificavam os folículos como íntegros mesmo apresentando vacuolização no citoplasma do oócito, desprendimento da membrana basal e oócitos com núcleos picnóticos (14, 26). Estas observações nos levaram a perceber que estávamos sendo muito críticos em nossas análises. Ao reanalisarmos nossos dados seguindo os parâmetros da literatura, os resultados de qualidade folicular tiveram um discreto aumento, principalmente quanto aos folículos primários e secundários nos fragmentos de tecidos frescos e vitrificados. Seguindo essa linha de raciocínio, observamos outro fato interessante, qual seja, os danos foliculares descritos na literatura como causados pelas altas concentrações de crioprotetores durante as técnicas de criopreservação (26, 10, 27). Durante nossas análises, observamos que o grupo controle fresco apresentavam danos similares ao tecido vitrificado descrito por esses trabalhos, associando-os a efeitos da criopreservação. Este fato levanta questionamento quanto à veracidade dos resultados descritos, podendo indicar que alguns danos aferidos aos efeitos da

criopreservação possam ser problemas advindos do processamento histológico e não das técnicas de criopreservação. Interessante ressaltar que nenhum trabalho na literatura procurou distinguir efeitos que possam vir da metodologia de preparo histológico, daquelas advindas da criopreservação.

O tecido vitrificado de tamanho grande e a população de folículos sofreram perdas significativas ao serem submetidos aos três tratamentos com xilol. Estes resultados podem estar relacionados a uma maior sensibilização do tecido pós-vitrificação e cultura por 48 horas. Entretanto, resultados recentes de análises bioquímicas do nosso grupo mostram que a viabilidade do tecido não é afetada pelas metodologias de vitrificação e cultura (18). Portanto, podemos supor que as técnicas histológicas, assim como qualquer outro parâmetro de análise de viabilidade tecidual, devem ser ajustadas para o estado “pós-criopreservação” do material biológico de maneira a não atribuímos à metodologia de criopreservação, alterações provocadas pelo processamento histológico.

Concluimos que o estroma ovariano após vitrificação e cultura pode apresentar alterações significativas a nível morfológico, independente do tempo de exposição xilol. Particularmente, observamos que qualidade folicular apresenta um comportamento contrastante quanto ao tempo de exposição ao xilol. Achados na literatura estão sendo erroneamente interpretados quanto a efeitos resultantes da criopreservação, pelo uso de crioprotetores, ao negligenciar aqueles advindos da histologia. Portanto, há a necessidade de estudos que venham a distinguir esses efeitos, deixando claro, que as técnicas de histologia necessitam de adequações em seus protocolos, assim como vem sendo feito com as de criopreservação.

## REFERÊNCIAS

1. Aquino D, Danielli L, Rigon P, Lothhammer N, Frantz N & Bos-

- Mikich A (2014) JBRA Assist Reprod 18, 12-15.
2. Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM & Gosden RG (1999) Endocrinology 140, 462–471.
  3. Bielanski A, Naduin-Davis S, Sapp T & Lutze-Wallace C (2000) Cryobiology 40, 110-6.
  4. Caputo LFG, Gitirana LB & Manso PPA (2010) Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro, 89-188.
  5. Croute F, Poinso J, Gaubin Y, Beau B, Simon V, Murat JC & Soleilhavoup JP (2002) Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res 1591, 147-155.
  6. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon Sandra A, Richardson J & Nelson JF (1992) Hum Reprod 7, 1342-1346.
  7. Gao DY, Mazur P & Critser JK (1997) Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles San Diego, 263–328.
  8. Gavish Z, Peer G, Hadassa R, Yoram C & Meirou D (2014) Human Reproduction 29, 989–996.
  9. Gosden, RG, Mullam J, M. Picton H, Yin H & Tan SL (2002) Hum Reprod Update 8, 105–110.
  10. Herraiz S, Novella E, Rodríguez B. Díaz C, Serrano MS, Mirabet V & Pellicer A (2014) Fertil Steril 101, 775-784.
  11. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A & Winston RML (1996) Human Reproduction 11, 1268–1272.
  12. Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K & Winston (1999) Hum Reprod 14, 2519-2524.
  13. Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, Vajta G, Silber S, Manabe N & Kato O (2007) Reproductive BioMedicine Online 14, 693-699.
  14. Kagawa N, Silber S & Masashige K (2009) RBM Online 18, 568-577.
  15. Liu, J, Elst J V D, Broecke R V D, Dumortier F & Dhont M (2000) Biol Reprod, v62, 1218-1223.
  16. Mc Intyre JA, Gilula NB & Karnovsky MJ (1974) J Cell Biol 60, 192-202.
  17. Marques L, Bos-Mikich A, Godoy LC, Silva L, Maschio D, Zhang T & Streit Jr DP (2015) Cryobiology, 71, 367-373.
  18. Massignam ET, Ferreira M, Sanguinet E, Dupont A, Klamt F, Frantz N & Bos-Mikich A (2018) JBRA Assisted Reproduction in press.
  19. Michalany, J. (1990) Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 2, 277.
  20. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V & Gosden R (1996) Human Reproduction 11, 1487–1491.
  21. Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA & Meyers SA (2006) Biology of Reproduction 74, 359–365.
  22. Schmidt K L T, Byskov A G, Nyboe A, Andersen J, Müller C & Andersen Y (2003) Human Reproduction 18, 1158–1164.
  23. Shaw JM, Oranratnachai A & Trounson AO (2000) Theriogenology 53, 59–72.
  24. Storey KB & Storey JM (2017) Physiol Rev 97, 623-665.
  25. USEPA (2010). Available from <http://cfpub.epa.gov/ecotox>. Acesso do em Dez., 2017.
  26. Xiao Zh, Zhang Y & Fan W (2017) Journal of Assisted Reproduction and Genetics 34, 1435–1444.
  27. Wang Y, Xiao Z, Li L, Fan W & Li SW (2008) Human Reproduction 23, 2256–2265.
  28. Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh CS & Kim SH (2014) Human Reproduction 29, 720–730.

### **3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Concluimos que o tecido ovariano pode apresentar alterações significativas quando submetido ao xilol após a criopreservação independente do tempo de exposição. Particularmente observamos que qualidade folicular, ao diminuir o tempo de exposição ao xilol, em tecido fresco diminui, enquanto que a de tecidos vitrificados aumenta.

Concluimos que achados na literatura possam estar sendo erroneamente interpretados quanto a efeitos resultantes da criopreservação, pelo uso de crioprotetores, ao negligenciar aqueles advindos da histologia. Logo, há a necessidade de estudos que venham a distinguir esses efeitos, deixando claro, que as técnicas de histologia necessitam de adequações em seus protocolos, assim como vem sendo feito com as de criopreservação.

#### 4 REFERÊNCIAS

- AQUINO, D. et al. Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. *JBRA -Assisted Reproduction*, v. 18, p. 12-15, Mar. 2014.
- BROECKE, R. et al. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 97, p. 193-201, Aug. 2001.
- CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P. P. A. **Técnicas histológicas**: Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro, p. 89-188, 2010.
- CROUTE, F. et al. Volatile organic compounds cytotoxicity and expression of HSP72, HSP90 and GRP78 stress proteins in cultured human cells. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res*, v. 1591, p. 147-155, Aug. 2002.
- DEANESLY, R. et al. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *Journal of Endocrinology*, v. 11, p. 197–200, Aug. 1954.
- DONNEZ, J.; BASSIL, S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod Update*, v. 4, p. 248-259, Jun. 1998.
- FABBRI, R. et al. Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 21, p. 819– 828, Dec. 2010.
- FADDY, M.J. et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*, v. 7, p. 1342-1346, Nov. 1992.
- GAO, D.Y.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. San Diego: Academic Press: p. 263–328, 1997.
- GAVISH, Z. et al. Follicle activation and ‘burn-out’ contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Human Reproduction*, v. 29, p. 989–996, Feb. 2014.
- GREEN, S.; SMITH, A.U.; ZUCKERMAN, S. The numbers of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. *Journal of Endocrinology*, v. 13, p. 330–334, April 1956.
- GOSDEN, R.G. et al. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Hum Reprod Update*, v.8, p. 105–110, 2002.
- HERRAIZ, S. et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow-freezing versus vitrification, effect on different procedures and devices. *Fertil Steril*, v. 101, p. 775-784, March 2014.
- HOVATTA, R. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Human Reproduction*, v. 11, p. 1268–1272, Jun. 1996.
- KAGAWA, N. et al. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 14, p. 693-699, Apr. 2007.
- KAGAWA, N.; SILBER, S.; MASASHIGE, K. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *RBM Online*, v. 18, p. 568-577, Apr. 2009.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, v. 24, p. 1670-83, July 2009.

KHOSRAVI, F. et al. In vitro development of human primordial follicles to preantral stage after vitrification. *J Assist Reprod Genet*, v.30, p. 1397–1406, Oct. 2013.

Li, Y. et al. Modified rapid freezing method for cryopreservation of human ovarian tissue. *Chin Med J*, v. 120, p. 110-114, Jan. 2007.

MARQUES, L. et al. Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container. *Cryobiology*, v. 71, p. 367-373, Dec. 2015.

MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY, 33., 2017, Geneva, Switzerland: ESHRE, 2017.

MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 2. ed. São Paulo: Michalany, p. 277, 2009.

NEWTON, H. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 11, p. 1487–1491, May 1996.

PARKES, A.S. Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *Journal of Endocrinology*, v. 17, p. 37–343, 1958.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, v.164, p. 666-1949, Oct. 1949.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at – 196C. by vitrification. *Nature*, v. 313, p. 573-575, Feb. 1985.

THE ETHICS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: a committee opinion. *FertilSteril*, v. 100, p. 1224-31, 2013.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY(2010). Disponível em: <<http://cfpub.epa.gov/ecotox>> . Acessado em Dez. 2017.

WANG, Y. et al. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction*, v. 23, p. 2256–2265, Oct. 2008.

WHITTINGHAM, D.G; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196C. *Science*, v.178, p. 411-414, Oct. 1972.

WHITTINGHAM, D.G. Fertilization in vitro and development to term of fertilized mouse oocytes previously stored at -196C. *J. Reprod. Fert*, v. 49, p. 89-94, Jan. 1977.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci*, v.11, p. 1071-1079, Nov. 1972.

XIAO, Zh; ZHANG, Y.; FAN, W. Cryopreservation of human ovarian tissue using the silver closed vitrification system. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 11, p. 1435–1444, 2017.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO INTERNATIONAL JOURNAL CRYOLETTERS

### INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The journal publishes **concise original research reports, authoritative reviews**, technical developments and commissioned book reviews of the effects produced by low temperatures on a wide variety of biophysical and biological processes, or studies involving low temperature techniques in the investigation of biological and ecological topics. The Journal will accept papers that reach a high standard of scientific endeavour as judged by international peer review.

Contributions are peer-reviewed by an international editorial board and referees, and normally **published within eight weeks of receiving an acceptable manuscript. There are no page charges and we offer a free pdf. file to authors. Circulation is world-wide and the journal is abstracted by all major services.**

#### *Manuscript Layout*

1. Papers will be edited directly from authors' electronic submissions, using **the downloadable template** which therefore must conform to a standardised house-style, be accurate, clear and well laid out. For speed of publication, no proofs are printed, and final responsibility for accuracy rests with author(s) who may be contacted by the editor for clarification during sub-editing.
2. Authors have access to a **downloadable [template](#)** for authors **which must be used for submission of their article**. Double column format is directed simply by the using template (see **Template Instructions** below - point 16 onwards) with page numbering .
3. Contributions must be **concise** and no longer than **12 pages**. Because of pressure on space a **maximum of 12 pages including figures, tables and references is allowed**. Manuscripts longer than 12 pages **will be returned to the author for shortening** unless prior agreement has been reached with the editor.
4. **Electronic submission is essential, using the downloadable [template](#)**. Manuscripts should be singlespaced with the text in Times (New) Roman 12 point font. Manuscripts which do not conform to this specification may be returned for resetting. (In the event of difficulty in conforming to the specification, contact the editorial

office for help). All **Final Printing** will normally be in **Black and White** . Images can only be accepted for **Colour Printing** by prior arrangement to pay the costs of printing (£150 per page). Images should only be submitted in **colour** if the authors state that they **agree to pay** for the colour images in the Letter of Submission. This decision must be taken by the authors **before** submitting the manuscript for assessment to ensure consistency in the refereeing procedure.

5. **Author Open Access.** Authors may choose to select Open Access option at the time of manuscript submission. A modest fee is charged to cover administrative costs. You will be asked to confirm that you will pay the open access fee (**600 Euros**) when invoiced. You will need to **choose the 'Open Access' option when you first submit your paper to the Editorial Office.** The article will be made available by Ingenta Open Access **on receipt** of the fee.
6. The title page should have:
  - The **TITLE (in 14-point font)** in **BOLD CAPITALS CENTRED** on the page with a **50 mm top margin**
  - This should be followed by the Author(s)' names (regular font) separated from the title by a single line space, centred and indicated by an asterisk\* the author to whom correspondence should be addressed. The last author name should be preceded by 'and'. To assist information retrieval, titles should be specific and informative
  - The full correspondence address(es) should **left-adjusted** and separated by a single line space from the author names. Additionally, a valid email contact address **must** be given. Superscripted numeral should be used to indicate which addresses are associated with which authors
  - An **Abstract** of no more than 150 words, with bold, initial capital centred heading. The abstract should be specific and informative to assist retrieval
  - Up to six **Keywords:** (heading left adjusted) continuing the line.
7. The text should normally be divided into conventional sub-sections : Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References. These headings should be **BOLD, CAPITAL** and **CENTRED**. Any **Acknowledgements:** (heading left adjusted) should appear after the text (before the References) continuing the line.



8. The text (see **Template Instructions** - point 16 onwards) should be fully justified and continuous with no spaces between paragraphs, the first line of which should be indented approximately four spaces. Subheadings should be in lower case italic with initial capital. Sub-subheadings should be in regular script underlined with initial capital and conclude with colon or full stop; text should then continue the line. If you use a font other than Times Roman or Arial to prepare the document, please ensure that all characters are properly converted to Times Roman or Arial before submitting the document to the editorial office. Please use the correct characters for degree Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) not the superscripted o. Statistical symbols should be italicised according to this example ( $P, F, t, \chi$ ).
9. Tables should be included in the text. All **tables** (titles, footnotes, table entries) should be clearly distinguished from the main text by changing to a sans-serif font such as **Arial 11-point** (this is an example to allow 10% reduction by the printer without loss of legibility, and separated by at least one line from the text above and below. Do not include vertical lines, and keep horizontal lines to the minimum to distinguish the column headings).
10. Figures, graphs, structural formulae etc., should be prepared by computer using a common spreadsheet or graphics package such as Microsoft Excel (see **Template Instructions** - point 16 onwards) . Remove all horizontal scale lines from graphs and do **not** box in either the axes or the whole figure. Line drawings should be sufficiently bold to remain clear after 10% reduction. Figure legends (axis labels, keys) should be clearly distinguished from the main text by changing to a sans-serif font such as Arial 11-point allowing 10% reduction by the printer without loss of legibility. In general unless there is reason to choose 'standard deviation' for error bars standard error of the mean (abbreviated SEM) is preferred. Figure legends should carry enough information to be understood without detailed reference to the text. Numbers of replicates for calculation of the statistical significance should be given. Figures should be included directly in the text. **IT IS VERY IMPORTANT THAT YOU CHECK THE APPEARANCE OF THE FONTS USED AFTER IMPORTING THE FIGURE INTO THE FILE TO ENSURE THEY ARE OF SUFFICIENT SIZE STILL TO BE LEGIBLE AFTER A 10% REDUCTION.** If you use a font other than Times Roman or Arial to prepare the document, please ensure that all characters are properly converted to Times Roman or Arial before submitting the document to the editorial office.

11. Photographs should be submitted electronically embedded in the text (see **Template Instructions** - point 16 onwards) Authors should bear in mind that the page size before reduction is 160 x 250mm and the photograph should fit within that area allowing space for legend. If at all possible, photographs should be grouped together, bearing in mind the maximum possible size. Good contrast is imperative. Labelling should be black or white according to maximum contrast in Arial 11-point font, or similar. For **micrographs**, a **scale bar** indicating magnification should be shown on the photographic print. If several images are used in a figure, they should be electronically grouped
- Units: SI units are preferred. Consistency is essential.
12. References should be referred to in the text by number in parenthesis (5, 21) and should be arranged after the text in alphabetical order and numbered 1...n in the form indicated by the following examples (all authors should be listed). Standard abbreviations for journal titles may be used.:
- Reed BM (2001) *Cryoletters* **22**, 97-104.
  - Thurston LM, Watson PF & Holt WV (2003) *Theriogenology* **60**, 101-113.
  - Songsasen N, Tong J & Leibo S (1998) *J Exp Zool* **280**, 189-196.
  - Withers LA & Engelmann F (1997) in *Agricultural Biotechnology*, (ed) A Altman, Marcel Dekker Inc, New York, pp 57-88.
13. The Journal maintains its high standard by means of expert refereeing by an international panel. After review, if considered worthy of publication the manuscript will normally be returned for revision as recommended by the referee(s).
14. Revised manuscripts must be marked up to show revisions as requested by the Editorial Office. CryoLetters is a rapid publication journal and the **responsibility** for the **appearance** of the final revised article **rests with the Authors**.
15. **Ethical standards**
- All experimental work involving animals should conform to European Convention on the use of Experimental Animals ([website](#)) and the Directive ([PDF](#)) that seeks to implement it. Where appropriate, authors should state that animal experiments were conducted in accordance with a named National Policy or Licensing Authority and were approved by the Institutional Ethics Committee. Experimental methods should include details of anaesthetic (generic name, dose, route of administration) and surgical procedures. Chilling alone is not an acceptable method for rendering vertebrates insentient; an

anaesthetic agent must be used. Work on isolated tissues, including primary cell cultures, must state from where and how the materials were derived.

- All work involving humans or human tissues or cells must contain in the text a statement that approval for the study has been obtained from the appropriate National or Institutional Ethics Committee and conforms to the standards set by the Declaration of Helsinki (last modified in 2004-[www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)), and that material was obtained only with Informed Consent in writing for each individual in the study.

## 16. How to use the new CryoLetters template

### Main Text File

1. The templates were designed to facilitate the authors of CryoLetters to prepare their camera-ready typescripts in a standardized format. The templates make it easy for one to layout the text, figures, tables, pictures and legends. They conform to the format of the journal, and the type and size of fonts required.
2. The template is written in Microsoft Word 97-2003 Document and is compatible with most other versions. Copy the file to **C: programs/ Microsoft office/templates**. To use it, open Word first, go to **File**, click **New**, and browse the template. Alternatively, you can copy it in any file folder where you would like to store. To use it, you simply click the template file twice.
3. Click on any **macro button** [words in the brackets] and start typing (e.g. title, bylines, abstract, introduction, subtitles and etc.). When a macro button is clicked, it will be highlighted. When you start to type, the **macro** will disappear automatically. **Macrobuttons** specify certain formats, therefore do not delete them before writing. The specification though is fixed (e.g. font type, font size, spacing, margin etc.). Treat the template as a regular file, subscript, superscript, special symbols and other variations could be done just like in any word document. As long as the template is not altered, the format will be maintained.
4. Not every manuscript follows the same sequence: **Summary, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, and DISCUSSION**. The words in

the heading can be changed as you wish. Macrobuttons can be copied and pasted to elsewhere.

5. For references, the number will be listed automatically. The authors can add or delete freely any reference without bothering to change the numbering of the references. If **cut/copy** and **paste** functions are used to sort out the alphabetical order of the references, the number of each reference will change automatically. If you are using any reference software to prepare your list of references, convert the plain text file first, you can then use the copy and paste function.

### **Tables, Photos and Figures**

1. **Blue frames** are prepared in a separate template for the layout of figures and legends. The simplest way is to use one frame for each display item. Should you need more frames, click the frame and point the cursor to the shaded border of the frame, use **copy/paste** function to have more. To save your time, you are advised to finish your text first, and then to layout the display item with frames. You can copy, paste and move the frames to where you wish to place in the paper.
2. If the display item (including photo) is too big and you need to reduce its size, the frame will do it for you. Copy the over-sized display item and past onto the frame. You will see that your over-sized item is now fitted perfectly. To allow you write a legend, drag the bottom edge of the frame down to have more space (the size of the figure will not change). Note the edge of the frame is different from the edge of the display item. If you drag the edge of a display item, the shape of the display item will change.

### ***Submission of Manuscripts***

Electronic submission is essential to the Editorial Office or the appropriate Regional Associate Editor, together with a completed copy of the [Declaration and Copyright Transfer form](#) (Microsoft Word document).

**Executive Editor**

- Professor Barry Fuller, Royal Free & UCL Medical School, Department of Surgery, London NW3 2QG, UK. Email: [editor@cryoletters.org](mailto:editor@cryoletters.org)

**Assistant Editors**

- Prof H.W. Pritchard, Royal Botanic Gardens Kew, Wakehurst Place, West Sussex, UK
- Prof F Engelman, IRD, Montpellier, France
- Dr Wendell Sun, Shanghai, China

### ***Reprints***

A free .pdf file will be sent to the author marked by an asterisk\*. Additional **printed reprints** can be purchased by **completion of the order form enclosed with the manuscript acceptance notice**. Requests for reprints cannot be accepted after publication of the article.

The editors reserve the right to refuse publication of any work which does not conform to these essential ethical standards.