

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Taynná El Cury Silva

**Avaliação da aplicabilidade de polímeros sintéticos na
vitrificação de tecido ovariano bovino**

Belo Horizonte - MG

Abril - 2022

Taynná El Cury Silva

Avaliação da aplicabilidade de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Professor Dr. Fernando Marcos dos Reis
Coorientadora: Professora Dra. Jhenifer Kliemchen Rodrigues

Belo Horizonte - MG

Abril - 2022

Silva, Taynná El Cury.
SI586a Avaliação da aplicabilidade de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino [recursos eletrônicos]. / Taynná El Cury Silva. - - Belo Horizonte: 2022.
100f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Fernando Marcos dos Reis.
Coorientador (a): Jhenifer Kliemchen Rodrigues.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ovário. 2. Polímeros. 3. Criopreservação. 4. Crioprotetores. 5. Bovinos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Rodrigues, Jhenifer Kliemchen. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QT 37.5.P7

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DE POLÍMEROS SINTÉTICOS NA VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO

TAYNNA EL CURY SILVA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia seis de abril de dois mil vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Fernando Marcos dos Reis - Orientador
UFMG

Jhenifer Kliemchen Rodrigues - Coorientadora
UFMG

Fabio Vasconcellos Comim
UFMG

Maria Lectícia Firpe Penna
FUMEC

Ana Paula Ribeiro Rodrigues
UECE

Cynthia Dela Cruz de Freitas
Universidade de Michigan

Belo Horizonte, 06 de abril de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 07/04/2022, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Vasconcellos Comim, Professor do Magistério Superior**, em 07/04/2022, às 22:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Ribeiro Rodrigues, Usuário Externo**, em 11/04/2022, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cynthia Dela Cruz de Freitas, Usuário Externo**, em 12/04/2022, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Lectícia Firpe Penna, Usuário Externo**, em 14/04/2022, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jhenifer Kliemchen Rodrigues, Usuário Externo**, em 03/05/2022, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1357207** e o código CRC **B83AF26C**.

AGRADECIMENTOS

Fico feliz em chegar até essa parte da escrita... Foram tantos desafios...

O agradecimento é um momento de olhar para trás e pensar em todos e tudo que te fez chegar até aqui.

O mais importante é Deus! Obrigada Deus, por eu ser uma pessoa tão beneficiada por ti, pois sei que não sou a filha predileta, mas os presentes são tantos que acabo me sentindo como se fosse.

Agradeço ao meu orientador Professor Fernando Reis pela confiança, paciência e orientação, por tamanha calma e sabedoria em momentos em que precisamos de uma direção.

Agradeço minha coorientadora Dra Jhenifer Rodrigues, minha mentora desde a época de estágio em 2013, quando me apresentou o mundo da Preservação da Fertilidade.

Gratidão as oportunidades confiadas a mim!

Agradeço LRH – Professor Aroldo F. Camargos, pelo apoio a pesquisa! E a equipe maravilhosa lá presente.

Agradeço ao LABER, pelo apoio, conhecimento passado e a amizade!

Agradeço a Fricon/Dimeza e todos os colaboradores!

Agradeço a Monique, pela ajuda, amizade e ouvidos ao longo desses anos!

Agradeço ao Marcelo e Bárbara pelo apoio.

Agradeço,

Aos meus pais, Carlos e Raquel, pelo amor incondicional, pela criação, investimento e por todo apoio. Como pode nesse mundo alguém crescer sozinho? Sem uma mínima base, sem direção? Digo no sentido de desenvolvimento pessoal como também no profissional. Meus pais batalharam muito, ainda muito jovens, para nos dar uma vida de oportunidades que eles não tiveram. Gratidão meus pais, por todo recurso emocional e financeiro fornecido a mim.

Ao meu marido e Amor Bruno, de quem ganhei apoio desde o ensino médio! Gratidão ao companheirismo e carinho nesses 14 anos! Obrigada por entender minha ausência e falta de tempo. Em estar longe em km e depois longe em atenção.

Aos meus queridos irmãos Pedro, Arthur e Eduarda, por fazerem meus momentos mais divertidos e dinâmicos. Em me ensinarem a arte da fraternidade: Irmãos, seus

melhores amigos e piores inimigos! Em me fazerem sentir que não estou sozinha nesse mundo!

Ao Nilton, por ter apoiado meu estudo, entender esta etapa e por toda oportunidade confiada a mim em todos esses anos!

À minha amiga Baianinha, por estar presente em toda caminhada e por me conceder o mais importante da vida: o seu tempo e amizade.

Às minhas amigas Amandinha e Bianca, pela amizade, pelo incentivo aos meus estudos, pelos ouvidos e pelas orações nos momentos difíceis dessa jornada!

Aos meus sogros Marlene e Edmar, pelo apoio, carinho e incentivo.

À vovó Eni e vovô Pico por todo amor! Saudades eternas vô!

Ao Carlos por toda ajuda!

Ao Lucas Manente pela ajuda!

Aos meus filhotes pets Mia, Pingo e Todynho por toda companhia, carinho, destruição e diversão sem igual.

Agradeço também a todos os meus amigos e familiares, os quais não citei aqui, mas de alguma forma torceram por mim!

Me desculpem amigos e familiares a falta de tempo, prometo estar mais presente quando tudo passar!

RESUMO

A preservação da fertilidade em pacientes com câncer objetiva assegurar a saúde reprodutiva. A criopreservação de tecido ovariano é a única técnica disponível para meninas pré-púberes e para casos em que o tratamento não pode ser adiado. A técnica de vitrificação está associada a uma melhor preservação de fragmentos do córtex ovariano quando comparada ao congelamento lento. Estudos preliminares demonstraram que a combinação de polímeros sintéticos na vitrificação preservou melhor o tecido e os folículos secundários no córtex de ovários de macacos, por serem miméticos às proteínas naturais responsáveis pela proteção conferida a alguns organismos durante o inverno. A técnica de vitrificação associada a polímeros sintéticos é uma alternativa promissora, mas ainda não está disponível um protocolo padrão que demonstre resultados consistentes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de polímeros sintéticos na criopreservação por vitrificação de tecido ovariano bovino. Ovários bovinos foram obtidos a partir de animais abatidos para consumo em um abatedouro local. O córtex foi extraído e cortado em fragmentos. Os fragmentos foram divididos em três grupos (controle fresco, vitrificação com (CP) e sem (SP) adição de polímeros sintéticos). Os fragmentos de tecido de todos os grupos antes e após aquecimento foram fixados em paraformaldeído a 4%, corados com hematoxilina e eosina para avaliação de morfologia, contagem e observação do estágio folicular. Parte dos fragmentos tiveram seus folículos secundários isolados mecanicamente e cultivados em matriz de alginato até atingirem o estágio antral. Durante o cultivo, para análise de viabilidade, foram avaliados a sobrevida, crescimento e formação de antro folicular. Para avaliação da funcionalidade folicular, o meio de cultivo foi coletado para posterior dosagem de esteróides ovarianos. Então, os três grupos foram comparados estatisticamente. Os tecidos ovarianos vitrificados apresentaram uma morfologia com sinais de injúria, com espaços vazios e menos densos, além de exibirem uma menor porcentagem de folículos normais quando comparados ao tecido fresco (Fresco x CP $p < 0,0001$; Fresco x SP $p = 0,0004$). Contudo, não foi observada diferença entre os grupos vitrificados com e sem polímeros (CP x SP $p = 0,7173$). Os folículos que passaram pela vitrificação apresentaram uma sobrevida similar entre si e menor que o controle fresco ($\chi^2(2) = 19,87$; $p < 0,0001$). Todos os grupos avaliados foram semelhantes na taxa de formação de antro ($\chi^2(1) = 0,6569$; $p < 0,4176$). Em todos os grupos houve crescimento folicular durante o cultivo. No entanto, os folículos frescos e com adição de polímeros aumentaram de diâmetro durante todo o cultivo, ao passo que os folículos sem adição de polímeros cresceram apenas na primeira semana. No fim do cultivo, os folículos que passaram pelo processo de vitrificação produzem menos hormônios que os frescos ($p < 0,05$), mas sem diferença entre SP e CP. A partir desses resultados, é possível concluir que a combinação do uso de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano é uma técnica promissora, que poderá proteger o desenvolvimento folicular, mas são necessários mais estudos que possam aperfeiçoar esse protocolo.

PALAVRAS - CHAVE: Ovários, Polímeros sintéticos, Criopreservação, Agentes crioprotetores, Bovinos.

ABSTRACT

The preservation of fertility in cancer patients aims to ensure reproductive health. Ovarian tissue cryopreservation is the only technique available for prepubescent girls and for cases where treatment cannot be delayed. The vitrification technique is associated with better preservation of ovarian cortex fragments when compared to slow freezing. Preliminary studies in the cortex of monkeys' ovaries have shown that the combination of synthetic polymers in vitrification is better to preserve the tissue and secondary follicles, as they are mimetic to the natural proteins responsible for the protection during the winter in some organisms. The vitrification technique associated with synthetic polymers is a promising alternative, but a standard protocol that demonstrates consistent results is not yet available. Thus, this work aimed to evaluate the applicability of synthetic polymers in cryopreservation by vitrification of bovine ovarian tissue. Bovine ovaries were obtained at a local abattoir. The cortex was extracted and cut into fragments. The fragments were divided into three groups (fresh control, vitrification with (CP) and without (SP) addition of synthetic polymers). Tissue fragments from all groups before and after heating were fixed in 4% paraformaldehyde, stained with hematoxylin and eosin for morphology assessment, counting and observation of the follicular stage. Part of the fragments had their secondary follicles mechanically isolated and cultivated in alginate matrix until they reached the antral stage. During cultivation, for viability analysis, survival, growth and follicular antrum formation were evaluated. To evaluate the follicular functionality, the culture medium was collected for later measurement of ovarian steroids. The vitrified ovarian tissues presented a morphology with signs of injury, with empty and less dense spaces, in addition to showing a lower percentage of normal follicles when compared to fresh tissue (Fresh control x CP $p < 0.0001$; Fresh control x SP $p = 0.0004$). However, no difference was observed between the groups vitrified with and without polymers (CP x SP $p = 0.7173$). Follicles that underwent vitrification had a similar survival rate and lower than the fresh control ($\chi^2(2) = 19.87$; $p < 0.0001$). All groups evaluated were similar in the rate of antrum formation ($\chi^2(1) = 0.6569$; $p < 0.4176$). In all groups there was follicular growth during cultivation. However, fresh and polymer-added follicles increased in diameter throughout the cultivation, whereas follicles without polymer additions grew only in the first week. At the end of cultivation, the follicles that underwent the vitrification process produced less hormones than the fresh ones ($p < 0.05$), but there was no difference between SP and CP. From these results, it is possible to conclude that the combination of the use of synthetic polymers in the vitrification of ovarian tissue is a promising technique, which may protect follicular development, but further studies are needed to improve this protocol.

KEYWORDS: Ovary, Synthetic polymers, Criopreservation, Cryoprotective agents, Bovine.

“Se você tem um sonho, por menor que seja, tudo o que você precisa fazer é pensar nele, trabalhar nele todos os dias e, então, você o alcançará”.

Sebastião, A pequena sereia - Disney.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Opções de preservação da fertilidade em crianças e meninas pré-púberes. Figura Original – Biorender. 20
- Figura 2. Córtex e fragmentos de tecido ovariano bovino. Figura Original. 27
- Figura 3. Tipos de criopreservação do tecido ovariano. Figura Original – Biorender. 28
- Figura 4. Congelamento x vitrificação. Gota sólida 1 - água congelada pura no nitrogênio líquido. Gota sólida 2 - Solução de criopreservação, contendo crioprotetores, vitrificada no nitrogênio líquido. Observe o aspecto translúcido quando comparado a gota 1. Figura Original. 30
- Figura 5. Sistemas de criopreservação. A- Palheta de vitrificação, sistema fechado. B- Tira de metal para vitrificação de fragmentos de córtex ovariano, sistema aberto. C- Armazenamento em botijão de nitrogênio líquido. Figura Original. 31
- Figura 6. Figura esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. Linha superior, esquema de desenvolvimento folicular, com seus respectivos folículos cultivados in vitro (bovino). Folículo primordial composto por ovócito e uma camada de células foliculares achatadas. Folículo primário com uma camada de células cúbicas e ovócito, enquanto o secundário a teca interna está formada e as células que rodeiam o folículo (granulosa) encontram-se dispostas em diversas camadas, mas sem presença de antro. No folículo terciário o ovócito está rodeado de células da granulosa, com formação de antro e presença de teca interna e externa. O folículo maduro pré-ovulatório possui todas essas estruturas e apresenta um diâmetro maior. Figura Original – Biorender. 34
- Figura 7. Figura da esquerda representa o isolamento folicular pelo método mecânico com agulhas e a da direita, seu respectivo cultivo 3D em matriz de alginato, ilustrando um folículo isolado em desenvolvimento. Figura Original. 37

Figura 8. Figura ilustrativa e útero fresco com par de ovários bovino. Figura Original – Biorender.	45
Figura 9. Quadro esquemático dos métodos. Figura original – Biorender.	50
Figura 10. Processamento de tecido ovariano bovino. 1- Retirada de ligamentos do ovário. 2- Corte frontal dos ovários. 3- Preparo do semi-ovário no cortador de tecidos. Figuras Originais - Bio Render.	50
Figura 11. Processamento de tecido ovariano bovino. 4- Manejo e corte da fina camada do córtex ovariano. 5 e 6- Preparo de tiras e fragmentos de córtex. Figuras Originais.	51
Figura 12. Processamento de tecido ovariano bovino. 7- Vitriificação em soluções com crioprotetores. 8- Vitriificação em sistema aberto, folha de alumínio. 9- Armazenamento em nitrogênio líquido. Figuras Originais - Bio Render.	51
Figura 13. Esquema do aquecimento pós vitriificação do tecido ovariano bovino. Figuras Originais - Bio Render.	53
Figura 14. Figuras representativas do isolamento mecânico seguido de cultivo folicular 3D em matriz de alginato. Figuras Originais.	55
Figura 15. Figuras representativas do meio de cultivo e dos folículos cultivados 3D em matriz de alginato.	56
Figura 16. Folículos bovinos isolados mecanicamente e cultivados 3D em matriz de alginato. Os folículos 1,2 e 3 estão vivos, mas o 3 não formou antro. Folículos 4, 5 e 6 estão mortos e não possuem antro.	57
Figura 17. Fotomicrografias representativas do estroma do córtex ovariano bovino em menor 5x (Linha superior) e maior aumento 100x (linhas inferiores). A, D - Controle tecido fresco, estroma denso. B,E,G - Tecido vitriificado com polímeros. C, F, H -	

Tecido vitrificado sem polímeros. Nos tecidos vitrificados, com e sem o uso de polímeros, zonas com sinais de injúrias, com espaços vazios e menos densos. 61

Figura 18. Fotomicrografias representativas de folículos pré-antrais. Tecido Fresco, Tecido Vitrificado com polímeros e sem polímeros respectivamente. 62

Figura 19. Porcentagem folicular pré-antral morfológicamente normal. a- Porcentagem de folículos primordiais. b- Porcentagem de folículos primários. c- Porcentagem de folículos secundários. 63

Figura 20. Diâmetro folicular após isolamento para cultivo, correspondente ao diâmetro do dia 1 de cultivo (D1). 64

Figura 21. Sobrevida folicular – Grupos vitrificados sobreviveram menos que o grupo controle fresco. 65

Figura 22. Cultivo Folicular. a - Formação de Antro Folicular – com semelhança entre os grupos. b- Fotomicrografias semanais da cultura 3D de folículos isolados. Os folículos de tecido fresco mostraram diâmetro aumentado ao longo dos dias com formação de antro (setas). Os folículos isolados dos tecidos vitrificados com adição (CP) e sem adição polímeros (SP) mostraram menor crescimento, mas com formação de antro na maior parte dos folículos. 66

Figura 23. Diâmetro semanais dos folículos durante 15 dias em cultura 3D. Os dados são apresentados como média \pm SEM de folículos isolados que sobreviveram. a - Diâmetro final dos folículos. b- Diâmetro dos folículos frescos. c- Diâmetro dos folículos com polímeros. d- Diâmetro dos folículos sem polímeros. – Os folículos frescos e os CP cresceram durante todo cultivo, enquanto os SP pararam de crescer significativamente na última semana. * $p > 0,05$. 68

Figura 24. Produção de hormônio esteróide (E2 e P4) durante 2 semanas de cultivo folicular. Os dados são apresentados como média \pm SEM de folículos isolados que sobreviveram. 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos de Crioprotetores. Quadro Original.

41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação e porcentagem de folículos morfológicamente normais. 62

Tabela 2. Sobrevivência e Formação de Antro. 65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACP** - Agentes Crioprotetores
- AFP**- Proteínas Anticongelantes
- ASRM** - Associação Americana de Medicina Reprodutiva
- COL** - Isolamento enzimático por collagenase
- CP** - Com Polímeros
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- E2** - Estradiol
- EG** - Etilenoglicol
- ES** - Solução equilíbrio
- FSH** - Hormônio Folículo Estimulante.
- GLI** - Glicerol
- GnRH** - Gonadotropin-Releasing Hormone.
- IGF-I** - Fator de crescimento semelhante à insulina
- ITS** - Insulina, Transferrina, Selenito
- LH** - Hormônio Luteinizante.
- LIB** - Isolamento enzimático por liberase
- LMC** - Leucemia mielóide crônica
- MCH** - Isolamento mecânico
- MEM** - Meio essencial mínimo
- MNC** - Isolamento picado
- N2** - Nitrogênio
- OTC** - Criopreservação de Tecido Ovariano
- P4** - Progesterona
- PBS** - Tampão salino fosfato
- PVA** - Álcool polivinílico $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$
- PVP** - Polivinilpirrolidona
- RHA** - Reprodução humana assistida
- SEM** - Erro padrão da média ou mediana
- SP** - Sem polímero
- SSS** - Soro Sintético Substituto
- RLU** - Unidade Relativa de Luz
- VS** - Solução de Vitrificação

SUMÁRIO

1.	19	
2.	22	
2.1	Breve histórico: A criopreservação na Reprodução Humana Assistida	22
2.2	Criopreservação de Tecido Ovariano	25
2.3	Técnicas para criopreservação de tecido ovariano	28
2.4	Aspectos da vitrificação	29
2.5	Desenvolvimento dos folículos ovarianos	31
2.6	Cultivo folicular <i>in vitro</i> : uma opção para pacientes com células cancerígenas remanescentes	34
2.7	O uso de crioprotetores	37
2.8	O uso de polímeros sintéticos anticongelantes	41
2.9	Modelo bovino para criopreservação	43
3.	48	
3.1	Objetivo geral	47
3.2	Objetivos específicos	47
4.	50	
4.1	Animais e coleta de ovários	49
4.2	Vitrificação e Aquecimento	52
4.3	Histologia	53
4.4	Isolamento e encapsulamento folicular	54
4.5	Cultivo folicular 3D em matriz de alginato	55
4.6	Sobrevida folicular, crescimento e formação de antro	56
4.7	Dosagem de estradiol (E2) e progesterona (P4) do cultivo <i>in vitro</i>	57
4.8	Análise de dados e estatística	58
5.	61	

5.1 Morfologia do tecido e folículos ovarianos	60
5.2 Avaliação do desenvolvimento folicular no cultivo 3D em matriz de alginato	64
5.2.1 Avaliação do desenvolvimento folicular in vitro: Isolamento folicular	64
5.2.2 Avaliação do desenvolvimento folicular in vitro: Sobrevida Folicular	65
5.2.3 Avaliação do desenvolvimento folicular in vitro: Formação de antro	66
5.2.4 Avaliação do desenvolvimento folicular in vitro: Crescimento	67
5.3 Dosagem hormonal do meio de cultivo	69
6.	73
7.	81
8.	83
ANEXOS	99
ANEXO I: Comissão de Ética no Uso de Animais	100
ANEXO II: Abatedouro fornecedor de ovário.	101

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo as doenças oncológicas estão entre as enfermidades que mais matam, com estimativa de 47% de novos casos nas próximas duas décadas (SUNG *et al.*, 2021; INCA, 2020). Entretanto, o amplo avanço em tecnologias de diagnósticos e tratamentos proporcionam o aumento da sobrevivência de pacientes acometidos (FUENTES *et al.*, 2017; SANTUCCI *et al.*, 2020). Estima-se que mulheres de 0 a 49 anos têm aproximadamente 4 % de chance de desenvolver câncer (GLOBOCAN, 2020), período etário em que a fertilidade poderá ser prejudicada após o tratamento oncológico (HARADA, OSUGA, 2018).

A preservação da fertilidade em pacientes com câncer objetiva assegurar a saúde reprodutiva durante a doença para uma futura restauração. Para mulheres adultas e meninas pós-púberes a criopreservação de oócitos ou embriões são métodos amplamente oferecidos. Em meninas pré-púberes e casos em que o tratamento não pode ser adiado, existe a criopreservação de tecido ovariano, técnica recentemente aprovada pela American Society for Reproductive Medicine (ASRM) e considerada como única opção para essas pacientes (Figura 1) (American Society for Reproductive Medicine (ASRM), 2020; HARADA e OSUGA, 2018).

Embora as atuais técnicas de vitrificação de tecido ovariano sejam capazes de preservar a integridade da maioria dos folículos e já tenham nascidos vivos, a técnica não tem protocolo estabelecido para o uso de crioprotetores com base na seleção do melhor desempenho funcional e clínico (EL CURY-SILVA *et al.*, 2021). Parâmetros variados podem influenciar na eficiência da técnica de vitrificação, como combinação, tempo de exposição, concentração e tipo de crioprotetores (CASTRO *et al.*, 2011).

Proteínas anticongelantes foram encontradas em pequenos animais polares, como peixes, capazes de resistirem a invernos rigorosos através da inibição de formação de cristais de gelo (BIGGS, *et al.*, 2017). Desde então, polímeros sintéticos que mimetizam essa ação foram desenvolvidos e usados como crioprotetores não permeáveis em estudos de criopreservação e vitrificação de tecido ovariano (BIGGS, *et al.*, 2017; TING *et al.*, 2012;).

Estudos preliminares em primatas não-humanos buscaram aprimorar a técnica com o uso de polímeros sintéticos combinados ao glicerol (GLI) e etileno glicol (EG), e foram capazes de evitar a formação de cristais de gelo, preservando o tecido e morfologia de folículos, bem como a função de uma pequena população de folículos

secundários no córtex do ovário de macacos (TING *et al.*, 2012; TING *et al.*, 2013). Contudo, estudos em modelos translacionais são necessários para replicação dos resultados, já que oferecem maior facilidade de obtenção de amostras, até que a técnica seja aprimorada para futura aplicação em humanos.

O modelo bovino é frequentemente considerado em estudos preliminares para avaliação de tecido ovariano por semelhança anatômica dos ovários e a foliculogênese próxima à humana (LANGBEEN *et al.*, 2015). Além de modelo translacional, os dados gerados em bovinos podem contribuir para a própria espécie como opção para conservação de raças nativas em extinção e de importância econômica na evolução da bovinocultura (FERRÉ *et al.*, 2020).

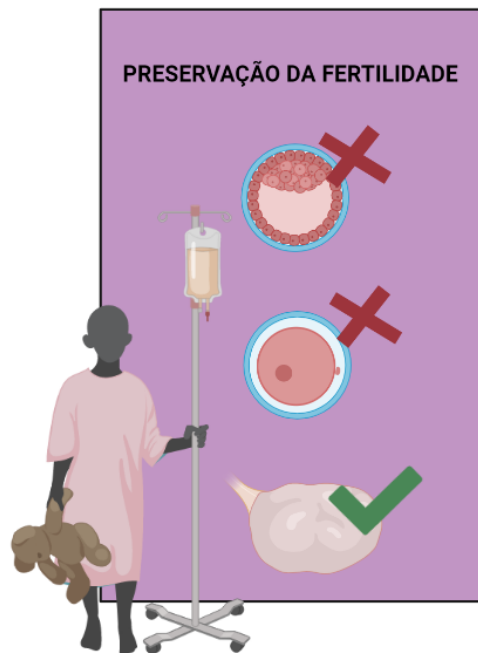


Figura 1. Opções de preservação da fertilidade em crianças e meninas pré-púberes. Figura Original – Biorender.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Breve histórico: A criopreservação na Reprodução Humana Assistida

A criopreservação é um método que utiliza o congelamento a temperaturas baixas para preservar células e tecidos vivos por um longo período de tempo (PEGG, 2007). Os primeiros congelamentos, inicialmente, eram usados para conservação de alimentos e bebidas. Os gregos e romanos perceberam que o resfriamento poderia manter suas refeições por mais tempo sem deteriorar. Depois, estudiosos começaram a aplicar o congelamento em materiais biológicos (SZTEIN, TAKEO, NAKAGATA, 2018). Paulo Mantegazza, em 1866, entendeu que o resfriamento de amostras de sêmen destinadas ao manejo reprodutivo de rebanhos poderia ser uma estratégia mais fácil e mais barata do que transportar os próprios animais reprodutores (SZTEIN, TAKEO, NAKAGATA, 2018).

Em 1949, um trabalho publicado por Polge, Smith e Parkes descreveu pela primeira vez o uso do glicerol como crioprotetor. Em um experimento havia um frasco de glicerol trocado não intencionalmente e esse foi utilizado no congelamento de sêmen de galo a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, preservando a amostra (POLGE, SMITH, PARKES, 1949, SZTEIN, TAKEO, NAKAGATA, 2018; LEIBO, SZTEIN, 2019). Alguns anos depois, foi relatado que espermatozoides bovinos também teriam sido criopreservados com sucesso a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ por meio de uma solução de glicerol, o que resultou em filhotes (POLGE, 1952; ARAV, 2014). No ano de 1953, foi relatado o primeiro nascido vivo de sêmen humano congelado de um pai falecido (BUNGE E SHERMAN, 1953).

A criopreservação evoluiu e teve um marco importante em 1972, quando Whittingham, Leibo e Mazur congelaram embriões de camundongos a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, Whittingham obteve sucesso em seus resultados, filhotes de camundongos nascidos vivos de transferência embrionária após descongelamento. A partir de então, estudos buscaram entender melhor o efeito de agentes crioprotetores, formas de congelamento e descongelamento que poderiam ser utilizados para otimização das técnicas (ARA V, 2014; SZTEIN, TAKEO, NAKAGATA, 2018).

Em 1984, na Austrália, aconteceu o nascimento do primeiro ser humano resultante de embrião criopreservado por congelamento lento no mundo, Zoe Leyland, um grande avanço na história da Reprodução Assistida. Dois anos depois, foi relatado o primeiro nascimento humano a partir de um oócito congelado (KAMEL, 2013;

VAJTA, 2020). Os embriões humanos se adaptaram bem à técnica, enquanto os oócitos foram mais difíceis de criopreservar por sua baixa relação entre área de superfície x volume e sua alta suscetibilidade à formação de gelo intracelular, além dos danos às estruturas internas (PAYNTER *et al.*, 1999; ARGYLE, HARPER, DAVIES, 2016; ARAV, NATAN, 2019).

O congelamento lento era a técnica de criopreservação utilizada, no entanto a formação de cristais de gelo ainda era um problema e necessitava-se de freezer com taxa de resfriamento controlada. Crioprotetores como dimetilsulfóxido (DMSO) e propilenoglicol estavam sendo testados quando, em 1985, foi descrito o uso de altas concentrações desses agentes combinados para a técnica de vitrificação de embriões de animais, com resultados promissores. A vitrificação foi mencionada como um método livre de gelo, sem a formação de cristais, seria uma transição para o estado vítreo, com facilidades de manejo e aplicação quando comparada ao congelamento lento (RALL, FAHY, 1985; GOOK, 2010). No entanto, a vitrificação foi ofuscada pelo congelamento lento por anos (ARAV, NATAN, 2019).

A vitrificação ganhou atenção em 1990, quando pesquisadores direcionaram estudos para a diminuição da toxicidade das soluções de vitrificação e os crioprotetores passaram a ser utilizados de forma combinada, o que levou ao aprimoramento da criopreservação de embriões. Os crioprotetores inicialmente testados foram etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, considerados permeáveis. Outros crioprotetores não permeáveis também foram testados, como sacarose e ficoll (SCHIEWE e ANDERSON, 2017).

A integração da vitrificação no laboratório de reprodução humana assistida (RHA) delongou antes de ser considerada aplicável para criopreservação eficiente de amostras. Os estudos sobre a criopreservação de oócitos foram acelerados por restrições legislativas sobre o armazenamento de embriões e por aspectos ético-legais que não limitavam a preservação de gametas (KONC *et al.*, 2014). A vitrificação de oócitos surgiu como uma opção promissora, as taxas de sucesso foram maiores quando comparada ao congelamento lento e os prejuízos estruturais foram reduzidos (LUSSIG *et al.*, 2019).

Em 2010, a vitrificação de oócitos já estava sendo eleita como uma opção além do congelamento de embriões e seus resultados já se mostraram semelhantes quando comparados ao uso de oócitos frescos. A indústria voltada para reagentes e materiais de vitrificação se expandiu e também contribuiu para aplicabilidade do

“novo” método de congelamento na rotina dos laboratórios (KUWAYAMA, 2007; SCHIEWE e ANDERSON, 2017).

Com a evolução das técnicas de criopreservação, outros tipos de tecidos começaram a ser testados e hoje já existem nascidos vivos a partir do congelamento de fragmentos do córtex ovariano. Nos últimos 20 anos, além das opções de preservação feminina de oócitos e embriões, o tecido ovariano mostrou-se uma estratégia para a potencial perda da fertilidade por tratamentos gonadotóxicos (MARIN *et al.*, 2020).

A criopreservação de tecido ovariano se iniciou em animais por volta de 1950, mas, sem sucesso, a técnica foi deixada de lado e só foi retomada em 1990. No início dos anos 90, o congelamento de fragmentos do córtex ovariano em roedores obteve resultados viáveis (HARP *et al.*, 1994), contudo testes em ovários maiores e com características mais próximas ao humano precisavam ser feitos. Então, em 1994, Gosden e colaboradores publicaram um estudo em ovelhas, onde mostraram que os ciclos ovulatórios foram retomados e um de seis animais atingiu o desenvolvimento a termo, derivado de uma ovulação em um enxerto descongelado. Em estudo publicado em 1996, folículos primordiais humanos sobreviveram e permaneceram viáveis após o congelamento lento e descongelamento com uma combinação de crioprotetores. Apesar disso, a viabilidade da técnica de criopreservação para o tecido ovariano e as técnicas de enxerto mostravam-se ainda com baixa taxa de sucesso. Os estudos dos protocolos de congelamento continuaram concomitantemente às avaliações de técnicas de transplante (HOVATTA *et al.*, 1996; MARIN *et al.*, 2020).

O primeiro desenvolvimento embrionário a partir de tecido ovariano criopreservado e transplantado foi relatado em 2004 e o primeiro caso de nascido vivo após descongelamento foi publicado em 2005 (MARIN *et al.*, 2020).

Com a ampla disponibilidade de crioprotetores, diferentes tipos de protocolos para o congelamento de córtex ovariano foram publicados e a vitrificação, por sua simplicidade e alta eficiência em outras amostras, começou a ser proposta como uma alternativa ao congelamento lento (AMORIM *et al.*, 2011).

Estudos em animais e em humanos forneceram resultados encorajadores quando comparado o congelamento lento versus a vitrificação, indicando que, na vitrificação de fragmentos do córtex ovariano, os danos ao estroma e aos folículos eram menores (SHI *et al.*, 2017). Ainda assim, não existe um protocolo padrão a ser aplicado para criopreservação de tecido ovariano humano.

2.2 Criopreservação de Tecido Ovariano

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo, com aproximadamente 19,3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de mortes no ano de 2020. Em mulheres, a neoplasia mais diagnosticada foi de mama com 2,3 milhões de novos casos (11,7%), responsável por 685 mil mortes, ultrapassando o câncer de pulmão (11,4%). A incidência de câncer no sexo feminino é de 186 casos e a mortalidade de 84,2 mortes em 100 mil mulheres, e as três principais áreas acometidas são a mama, o pulmão e colo de útero. Estima-se que em 20 anos tenha um aumento de 47% em relação aos casos de 2020, o que se deve ao crescimento e envelhecimento da população, agravando-se com o aumento de fatores de risco, como a obesidade, por exemplo (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, a estimativa para o período de 2020 a 2022 é de 625 mil novos casos de câncer por ano, com o câncer de mama em maior frequência entre as mulheres (INCA – ESTIMATIVA, 2020).

Embora a incidência de câncer no mundo aumente, estudos mostram que a mortalidade poderá ser reduzida. Em 2022, o número de sobreviventes poderá se expandir, justificado pelas melhorias no diagnóstico precoce, além do acesso a soluções inovadoras de tratamentos (FUENTES *et al.*, 2017; SANTUCCI *et al.*, 2020). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2021), a detecção precoce é especialmente importante para evitar estágios avançados de neoplasias, como em casos de câncer de colo uterino e mama, cuja incidência aumenta nas mulheres entre 30 a 39 anos e 50 a 69 anos de idade, respectivamente.

O período etário antecedente a menopausa oferta inúmeras possibilidades de realização e desenvolvimento pessoal, mas ao mesmo tempo a incidência de câncer na faixa etária fértil pode ser um risco à saúde reprodutiva feminina, mesmo que as abordagens terapêuticas tenham prolongado a expectativa de vida das pacientes, já que a quimioterapia possui efeito gonadotóxico e pode levar à infertilidade (OMS, 2011).

Esse declínio acelerado da fertilidade após a recuperação do câncer, pode ser psicologicamente traumático para as pacientes que desejavam filhos biológicos. Assim, o restabelecimento da fertilidade pode ser considerado uma extensão do tratamento ao câncer e as modalidades de preservação oferecidas em muitas clínicas de RHA. A falta de informação acessível ao paciente sobre suas opções pode gerar impactos definitivos em sua vida futura a médio e longo prazo, influenciando diretamente em seu direito de constituir família (LOGAN, ANAZODO, 2019).

A preservação da fertilidade consiste em técnicas clínico-laboratoriais que resguardam a saúde reprodutiva por motivos variados, além de infertilidade por agentes gonadotóxicos, como o adiamento da maternidade e casais homoafetivos (DOLMANS, DONEZ, 2020).

As opções de preservação reprodutiva feminina variam de acordo com particularidades de cada paciente. Dos principais métodos disponíveis, destacam-se: criopreservação de embriões e oócitos maduros, que são procedimentos rotineiramente aplicados e instituídos em clínicas de reprodução assistida, e a criopreservação de tecido ovariano (OTC). A OTC recentemente deixou de ser considerada experimental, já é oferecida em algumas clínicas de RHA e conta com aproximadamente 170 nascidos vivos (American Society for Reproductive Medicine (ASRM), 2020; HUSSEIN *et al.*, 2020).

Embora a criopreservação de embriões e oócitos sejam estratégias de preservação da fertilidade eficazes e aumentem o sucesso das fertilizações *in vitro*, essas técnicas são indicadas somente para pacientes que podem adiar o tratamento oncológico e que não têm contraindicações para a estimulação ovariana (HUSSEIN *et al.*, 2020). No entanto, é necessário considerar que algumas pacientes oncológicas podem ser pré-púberes ou precisam iniciar o tratamento imediatamente, ou ainda, têm câncer estrogênio-dependente, o que pode invalidar a possibilidade da realização de uma estimulação clássica sob risco de induzir a proliferação das células cancerígenas. Nesses casos, a OTC é uma possível opção para a manutenção da saúde reprodutiva feminina e surgiu como uma esperança promissora (DOLMANS, DONEZ, 2020).

Outra possibilidade para uso do tecido ovariano criopreservado é o adiamento da menopausa (OKTAY *et al.*, 2021). Há quase um século atrás, a expectativa média de vida de uma mulher era de 48,3 anos, hoje, a média aumentou para 76,6 no Brasil e além dos 80 anos nos países desenvolvidos. O que infere que parte de suas vidas se desenvolverá após a menopausa e que o aumento da expectativa de vida da população mundial colocará mais mulheres nessa situação (CHANG *et al.*, 2019; AMAZI, SADEGHI e MOGHADAM, 2019; IBGE – ESTATÍSTICAS, 2020).

A criopreservação do tecido ovariano previamente à menopausa resguardaria uma população de folículos responsáveis pela produção de hormônios femininos, o que retardaria o início dessa fase. Ainda que o procedimento tenha deixado de ser experimental, são necessários estudos para avaliar o risco-benefício desta opção em mulheres saudáveis e bem como aprimoramentos na técnica para que aumente a

longevidade dos transplantes de córtex ovariano (LEONEL, LUCCI, AMORIM, 2019; OKTAY *et al.*, 2021).

A coleta do tecido pode ser em qualquer fase do ciclo reprodutivo, por laparoscopia ou laparotomia por meio de biópsias ovarianas ou ooforectomia total ou parcial, uni ou bilateral (LIEBENTHRON, MONTAG, 2020). Após a retirada completa ou parcial dos ovários, o córtex é separado da medula em uma espessura aproximada de 0,5 a 1 mm por um cortador de tecido e depois fatiado em fragmentos com dimensões menores (Figura 2). Esse preparo em finas camadas permite a rápida penetração de crioprotetores nos tecidos e evita o uso de altas concentrações que podem ser tóxicas. Um estudo feito em ovários de felinos sugere que as dimensões do tecido sejam de 3 mm x 3 mm, pois fragmentos maiores apresentaram danos e baixa permeação dos crioprotetores (GORRICO *et al.*, 2018; HAINO *et al.*, 2018; HERRAIZ *et al.*, 2020).

Nestas finas camadas de córtex ovariano estão localizados a maior parte dos folículos pré-antrais, que, por serem pequenos, com menor taxa metabólica e pouco diferenciados, são mais criotolerantes que folículos com oócitos maduros (ANDERSON e WALLACE, 2011; LANGBEEN *et al.*, 2015; HAINO *et al.*, 2018). Esses folículos têm maior potencial de reparo a danos nas organelas citoplasmáticas e outras estruturas acometidas durante a criopreservação (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2015).



Figura 2. Córtex e fragmentos de tecido ovariano bovino. Figura Original.

2.3 Técnicas para criopreservação de tecido ovariano

Duas principais técnicas regem a OTC, o congelamento lento e a vitrificação (Figura 3). Durante o **congelamento lento** os fragmentos de tecido passam por uma solução de equilíbrio contendo concentrações baixas de crioprotetores e então são transferidos para criotubos com o meio de congelamento. Os criotubos são resfriados em freezers programáveis para atingir taxas de congelamento controladas. A temperatura reduz de 4 °C a -7,0 °C a uma taxa de -2,0 °C/ min, seguido por “seeding” e resfriamento a -40,0 °C a uma taxa de -0,3 °C/ min. A temperatura continua caindo e vai a -140 °C a uma taxa de -10 °C/ min. Por último, as amostras são armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C. O procedimento dura aproximadamente 90 minutos (NIKIFOROV *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019).

A **vitrificação** surgiu como uma alternativa ao congelamento lento. Esse processo envolve o uso de soluções com altas e crescentes concentrações de crioprotetores, por um curto período, seguido de alta velocidade de congelamento por imersão em nitrogênio líquido. Desse modo a vitrificação faz com que a amostra fique em um estado amorfo, vítreo, e diminui a chance de formação de cristais de gelo (RALL e FAHY, 1985).

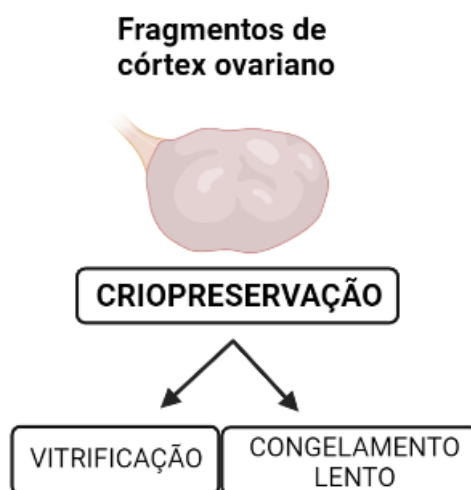


Figura 3. Tipos de criopreservação do tecido ovariano. Figura Original – Biorender.

Já foi debatido em muitos estudos sobre a comparação dos dois métodos e o protocolo que fornece os melhores resultados, conforme os resultados obtidos na revisão sistemática e meta-análise publicada por SHI *et al.* (2017). O congelamento lento é aceito como o procedimento convencional, com o maior número de nascidos

vivos. No entanto, esse método tem uma operação complexa, processo demorado e equipamento com alto custo (PENG, 2021). A vitrificação pode estar associada a uma melhor manutenção do estroma ovariano e das estruturas foliculares, bem como aumento das taxas de sobrevivência do folículo com o mínimo de mudanças na morfologia tecidual, o que pode levar a uma melhor resposta após o transplante (SÁNCHEZ *et al.*, 2006; TING *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2017).

Os pontos favoráveis da vitrificação em relação ao congelamento lento são o menor tempo de execução, mais econômica e poder ser realizada em qualquer laboratório de RHA, pois não necessita de equipamento específico para congelamento (AMORIM *et al.*, 2011).

A taxa de sucesso para criopreservação de tecido ovariano é avaliada a longo prazo e o principal desfecho são crianças nascidas vivas, contudo esse resultado só pode ser determinado depois que o tecido é transplantado e a função ovariana restabelecida para uma posterior gravidez, o que talvez demore décadas em casos de meninas pré-púberes. Além disso, também é preciso considerar o óbito ou perda do acompanhamento de parte das pacientes. Portanto, estudos que avaliam protocolos de OTC após descongelamento disponibilizam mais facilmente informações que podem ser usadas para otimizar a técnica (ANDERSEN, MAMSEN e KRISTENSEN, 2019).

2.4 Aspectos da vitrificação

O vidro é um estado amorfo que pode ser alcançado por meio do rápido resfriamento de uma massa ou líquido viscoso, e suas principais características são a transparência e a rigidez. Os processos que induzem os líquidos a entrar no estado vítreo incluem, além do super resfriamento, a viscosidade do meio (Figura 4) (DEBENEDETTI e STILLINGER, 2001).

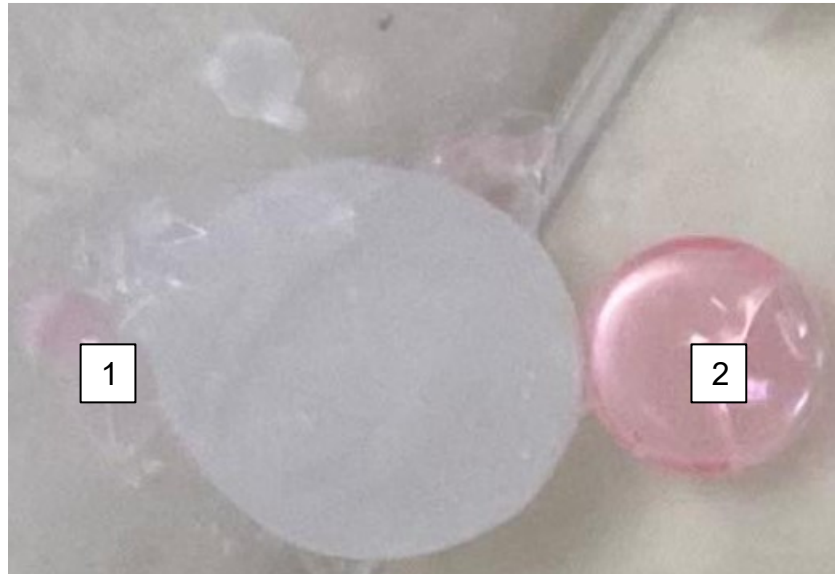


Figura 4. Congelamento x vitrificação. Gota sólida 1 - água congelada pura no nitrogênio líquido. Gota sólida 2 - Solução de criopreservação, contendo crioprotetores, vitrificada no nitrogênio líquido. Observe o aspecto translúcido quando comparado a gota 1. Figura Original.

A técnica que submete uma matéria a transição vítrea é chamada de vitrificação, a qual é frequentemente utilizada para criopreservar células e tecidos. Essa alternativa de congelamento simplifica a técnica de preservação com o uso de substâncias altamente viscosas e facilita a busca por taxas de resfriamento e aquecimento ideais, já que o resfriamento rápido é suficiente para a transição vítrea e minimização de formação de cristais. Contudo, durante a vitrificação é necessário minúcia para adição e remoção dos crioprotetores, a fim de evitar danos por efeitos osmóticos e toxicidade nas amostras (FAHY e WOWK, 2014).

A temperatura de transição vítrea é alcançada e determinada durante o resfriamento e aquecimento, quando uma solução com elevada viscosidade ultrapassa a cinética da formação de gelo (FAHY e WOWK, 2014). Em um estudo publicado por Ting e colaboradores (2013), o tecido ovariano de macacos foi vitrificado, as temperaturas de resfriamento/aquecimento e concentração de crioprotetores foram calculadas. Os termogramas mostraram que a transição vítrea sem cristalização iniciou na faixa de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o aquecimento em protocolo de duas etapas a temperatura ambiente, seguido de imersão rápida no banho maria a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ evitou danos no tecido. A concentração mínima de crioprotetores necessários para vitrificação de fragmentos em dimensões de $3\times 3\times 1\text{ mm}$ utilizando glicerol e etilenoglicol foi de 27% cada, com concentração total da solução de 54% para garantir a não desvitrificação da amostra. Os autores também abordam sobre o tempo em

contato com a solução de crioprotetores, onde a incubação de 5 minutos permite a vitrificação e evita a toxicidade (TING *et al.*, 2013).

Em outro trabalho, Mullen e Fahy (2011) também discutem que, durante a transição vítrea, a redução expressiva da temperatura entre $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, faz com que a energia térmica seja insuficiente para movimentar as moléculas, então elas se estabilizam e permanecem acima da fase de formação de gelo. Contudo, esse evento só ocorreria em soluções com viscosidade acima de 15 vezes a viscosidade da água em temperatura ambiente (MULLEN e FAHY, 2011).

A vitrificação e o armazenamento são feitos comumente em nitrogênio líquido, por alcançar as temperaturas necessárias e garantir a estabilidade do processo. Para tanto, existem dois tipos de métodos: o sistema aberto e o fechado. No primeiro, a amostra tem contato direto com o nitrogênio, enquanto o fechado, as amostras são vitrificadas dentro de palhetas. O necessário é que o tecido esteja armazenado em temperatura menor que a transição vítrea, sem variações, assim, o material poderá ser viável por longos períodos (MULLEN e FAHY, 2011).

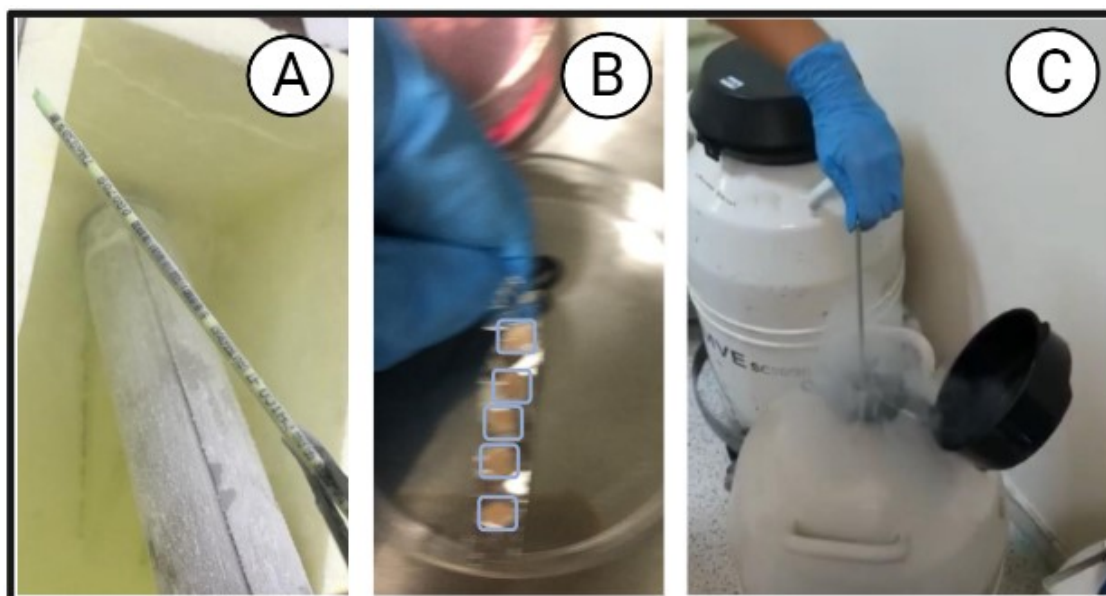


Figura 5. Sistemas de criopreservação. A- Palheta de vitrificação, sistema fechado. B- Tira de metal para vitrificação de fragmentos de córtex ovariano, sistema aberto. C- Armazenamento em botijão de nitrogênio líquido. Figura Original.

2.5 Desenvolvimento dos folículos ovarianos

Os ovários são estruturas ovais, localizados na região pélvica bilateralmente, que produzem oócitos e hormônios sexuais, como os estrógenos e progesterona. A superfície ovariana é composta por epitélio germinativo e logo abaixo está situada a

túnica albugínea. Sob a túnica albugínea, há uma região nomeada de córtex, na qual predominam os folículos ovarianos e o estroma, composto de tecido conjuntivo com a presença de fibroblastos. Localizada na região interna do ovário está a medula, formada por tecido conjuntivo frouxo e vasos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 13ª ed).

O folículo ovariano é o composto de um oócito envolvido por uma ou mais camadas de células especializadas. Seu desenvolvimento ocorre no processo de foliculogênese e inclui folículos primordiais, primários, secundários e pré-ovulatórios (Figura 6) (SANTOS, 2011).

A foliculogênese tem início na vida fetal e, a partir da puberdade, com os ciclos menstruais, uma coorte de folículos é ativada e dá continuidade ao crescimento folicular até a maturação, que acontece em aproximadamente 90 dias, formando um oócito fertilizável (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 13ª ed; SANTOS, 2011).

Diversos hormônios e fatores de crescimento estão envolvidos na interação das três principais estruturas foliculares: o oócito (gameta feminino), as células da granulosa que protegem e fornecem suporte para o desenvolvimento oocitário e as células da teca que produzem precursor estrogênico, necessários para a maturação folicular e do oócito (EDSON, NAGARAJA e MATZUK, 2009).

Os folículos primordiais são compostos de um oócito com um núcleo grande parado na primeira prófase da meiose I e células epiteliais achatadas. Durante a puberdade, o crescimento folicular é intensificado, os folículos primordiais são ativados e dão origem aos folículos primários, os quais terão células foliculares cubóides que envolvem os oócitos em uma camada completa. Essas células continuam proliferando e são chamadas de células da granulosa. Posteriormente, uma estrutura glicoproteica se forma ao redor do oócito, a zona pelúcida (VERDE, ROSSETTO e FIGUEIREDO, 2011).

Os folículos secundários possuem inúmeras camadas de células da granulosa e, após repetidas divisões, observa-se o início da formação da teca folicular interna. As tecas são formadas a partir de células do estroma que rodeiam o folículo em duas camadas: teca interna e externa, que são separadas da granulosa por uma lâmina basal. A teca interna é vascularizada e está envolvida na produção de esteróides (EDSON, NAGARAJA e MATZUK, 2009).

Os hormônios esteróides podem fornecer uma retroalimentação conforme sua concentração circulante na corrente sanguínea, o que induz a liberação ou bloqueio

do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), regulando indiretamente a atividade gonadal (COSTA *et al.*, 2014).

O GnRH é secretado pelo hipotálamo e, ao atingir a glândula hipofisária anterior estimula a produção das gonadotrofinas, FSH (hormônio do folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). O FSH e o LH estimulam os ovários para o desenvolvimento folicular, ovulação e liberação de progesterona, androstenediona e estradiol (MIHM, GANGOOLY E MUTTUKRISHNA, 2011).

Após mitoses sucessivas, o líquido folicular começa a ser produzido e se acumula entre as células da granulosa que se organizam e formam uma cavidade, o antro. Com a reorganização do folículo, o oócito continuará fixado na parede folicular e com um conjunto de células da granulosa ao seu redor, que servirá de apoio. Essas estruturas são chamadas de *cumulus oophorus* e *corona radiata* respectivamente (SANTOS, 2011).

A partir da formação do antro e mudança progressiva de morfologia, os folículos são chamados de folículos antrais. Nesta fase, o crescimento será hormônio dependente e a activina aumentará a produção de FSH, que estimulará a secreção de estradiol pelas células da granulosa. O LH se ligará aos receptores das células da teca interna, ativará a conversão de colesterol em pregnenolona e, posteriormente pela ação da enzima 3 β -hidroxidesidrogenase, em progesterona. A progesterona é precursora da androstenediona e difundirá para as células da granulosa para formação de estradiol (VEGETTI e ALAGNA, 2006).

Um folículo antral, designado como dominante, se desenvolverá mais que os outros pelo aumento de receptores de LH e de resposta ao FSH, o qual seguirá com o maior diâmetro e alta produção de estradiol até se tornar um folículo maduro para ovulação – o Folículo de Graaf ou pré-ovulatório. O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) também aumentará o número de receptores de FSH nas células da granulosa e é encontrado em folículos de diferentes estágios (COSTA *et al.*, 2014).

O estradiol em concentrações elevadas, chega ao pico máximo próximo à ovulação e inibe o FSH com auxílio da inibina e folistatina. O conjunto de folículos que estavam em crescimento nesse momento, regride e entra no processo de atresia (VEGETTI, ALAGNA, 2006). Em seguida, os acentuados níveis de LH causam a ovulação e a formação do corpo lúteo, além de elevar a produção de progesterona e promover a luteinização (VEGETTI e ALAGNA, 2006; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 13^a ed).

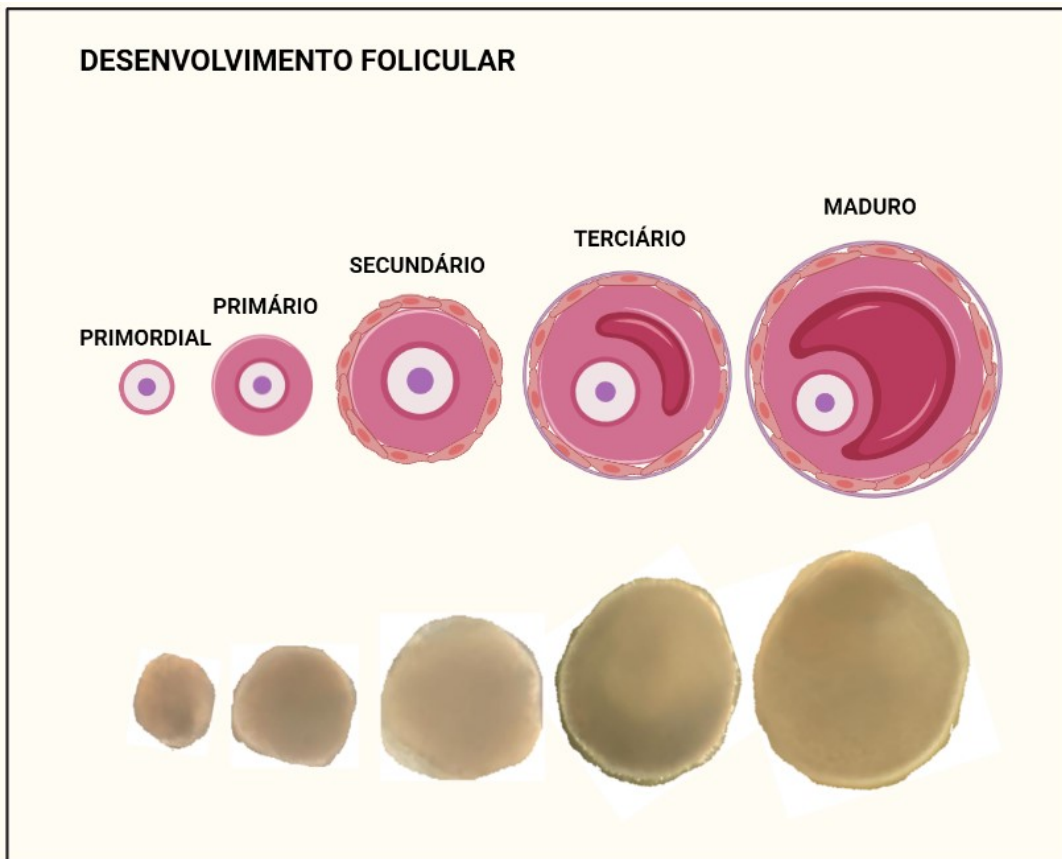


Figura 6. Figura esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. Linha superior, esquema de desenvolvimento folicular, com seus respectivos folículos cultivados *in vitro* (bovino). Folículo primordial composto por ovócito e uma camada de células foliculares achatadas. Folículo primário com uma camada de células cúbicas e ovócito, enquanto o secundário a teca interna está formada e as células que rodeiam o folículo (granulosa) encontram-se dispostas em diversas camadas, mas sem presença de antro. No folículo terciário o ovócito está rodeado de células da granulosa, com formação de antro e presença de teca interna e externa. O folículo maduro pré-ovulatório possui todas essas estruturas e apresenta um diâmetro maior. Figura Original – Biorender.

2.6 Cultivo folicular *in vitro*: uma opção para pacientes com células cancerígenas remanescentes

A OTC tem sido utilizada como única opção para preservação da fertilidade em crianças e adolescentes com câncer. No entanto, é preciso destacar a possível reintrodução de células malignas por meio do enxerto, principalmente em pacientes com leucemia, caso em que a técnica não é recomendada (SOARES, *et al.*, 2017; LEONEL, LUCCI, AMORIM, 2019). Para evitar esse risco e a incerteza da transmissão da doença em pacientes com leucemia ou câncer ovariano, uma opção potencial de

manutenção da fertilidade é o cultivo *in vitro* de folículos imaturos isolados do tecido ovariano criopreservado (ABIR *et al.*, 2013).

Um estudo de caso feito por ABIR *et al.* (2013) em uma paciente de OTC que sobreviveu à leucemia mielóide crônica (LMC) e decidiu reimplantar o tecido criopreservado mostrou que o ovário estava com células residuais malignas de LMC, o que excluiu a possibilidade de auto enxerto ovariano neste caso (ABIR *et al.*, 2013). Em outro estudo, foram testados métodos de isolamento folicular que evitassem células cancerígenas remanescentes e os resultados mostraram que todos os folículos isolados não tinham a presença de células leucêmicas. Isso mostra a importância de estudos da avaliação da técnica de isolamento folicular como uma possibilidade para esses pacientes, visto que o método ainda não é aplicado à prática clínica e encontra-se em desenvolvimento (SOARES, *et al.*, 2017).

Além da opção de criopreservação, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (Figura 7) pode ser útil para recuperar uma grande quantidade folicular, já que aproximadamente 99% não serão ovulados e entrarão em atresia ao longo da vida dos mamíferos (MARKSTRÖM *et al.*, 2002; BIZARRO-SILVA *et al.*, 2018).

O cultivo *in vitro* de folículos consiste a priori em seu isolamento por duas principais técnicas: isolamento mecânico ou enzimático, seguido de cultivo com ou sem matriz, que utilizam o sistema tridimensional (3D) ou bidimensional (2D), respectivamente. Um estudo realizado por HE *et al.* (2020) comparou os dois sistemas de cultivo e concluiu que para períodos curtos não existia diferença entre os métodos, mas para períodos acima de 4 dias, o cultivo 3D seria melhor (HE *et al.*, 2020).

O melhor método para o isolamento folicular ainda não foi definido, tanto para humanos quanto para os mamíferos de modo geral. Um estudo realizado em modelo murino que comparou 4 métodos distintos: isolamento mecânico (MCH) (Figura 7), isolamento picado (MNC), digestão enzimática usando colagenase (COL) e digestão enzimática usando liberase (LIB), mostrou que tanto o método MCH quanto o MNC tiveram melhores resultados para o diâmetro folicular, sobrevivência, integridade do DNA e oócito maduro no cultivo (KIM *et al.*, 2017).

Durante o isolamento, as principais dificuldades incluem a detecção de folículos viáveis e em estágio ideal, visto que a distribuição dos folículos no córtex ovariano de mamíferos é heterogênea e apresenta uma variação em quantidade, o que deixa mais difícil a comparação do número de folículos extraídos de um fragmento para outro (TELFER e ZELINSK, 2013).

Para tentar solucionar esse problema, um protocolo utilizando vermelho neutro foi desenvolvido, a fim de corar folículos pré-antrais nos tecidos corticais. Alguns estudos em modelos animais mostraram que o corante cumpre com o objetivo proposto e facilita a visualização folicular (LANGBEEN *et al.*, 2014). No entanto, no cultivo fresco em macacos, a produção de hormônios esteróides em folículos de crescimento rápido está comprometida e são necessárias pesquisas adicionais sobre a possível toxicidade a longo prazo (BULGARELLI *et al.*, 2017).

Além do processamento inicial da amostra, diferentes variáveis podem interferir no desenvolvimento do folículo *in vitro*, como a composição do meio de cultivo (MBEMYA *et al.*, 2018). O meio de cultivo é composto pelo fornecimento de nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas e fatores de crescimento, pois todas essas substâncias adicionadas são essenciais para promover a viabilidade folicular e contribuem para as necessidades fisiológicas das células (PICTON *et al.*, 2018). Rossetto e colaboradores (2012) testaram diferentes tipos de meio base e seus resultados mostraram que o α -MEM e TCM199 eram mais adequados por manterem a funcionalidade folicular (ROSSETO *et al.*, 2012).

Wright e colaboradores (1999) avaliaram a adição de suplementos em meios base para o desenvolvimento *in vitro* de folículos humanos. O uso de α -MEM promoveu aumento na iniciação e no crescimento dos folículos no início da cultura. Esse meio suplementado com FSH diminuiu a atresia e aumentou o diâmetro médio dos folículos. A albumina sérica humana e o ITS (insulina, transferrina, selenito de sódio) quando adicionados ao meio, gerou folículos maiores e mais desenvolvidos (WRIGHT *et al.*, 1999). Xiao *et al.* (2015) mostraram a maturação meiótica do oócito humano a partir do crescimento de folículos *in vitro*, empregando um protocolo atualizado e semelhante ao utilizado por Wright *et al.* (1999). Até o momento, o desenvolvimento de folículos ovarianos *in vitro* busca alcançar um bom equilíbrio entre todos os componentes do meio de cultura, para obter concentrações corretas e a interação que deve existir entre os componentes do meio.

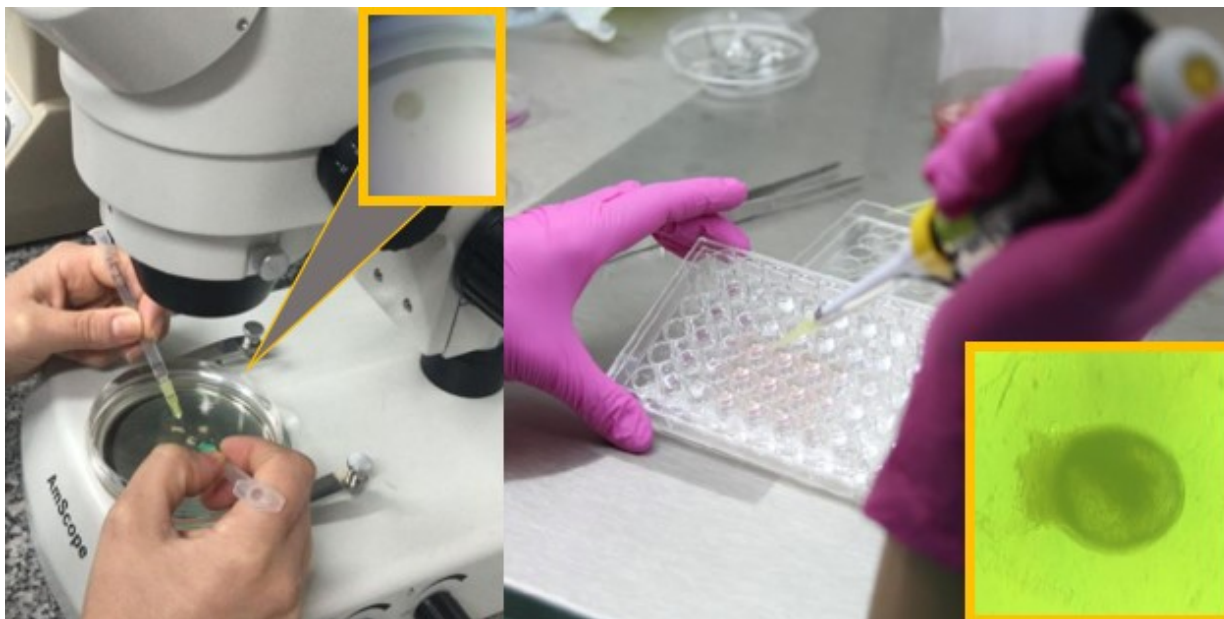


Figura 7. Figura da esquerda representa o isolamento folicular pelo método mecânico com agulhas e a da direita, seu respectivo cultivo 3D em matriz de alginato, ilustrando um foliculo isolado em desenvolvimento. Figura Original.

2.7 O uso de crioprotetores

O fundamento da criopreservação é interromper o relógio biológico por tempo ilimitado em temperaturas abaixo de zero com o mínimo de lesão tecidual. Durante o congelamento é cessada qualquer atividade celular por diminuir a frequência das colisões entre as partículas, o que evita a degradação a nível molecular. Entretanto, a queda de temperatura em uma célula ou tecido pode gerar alguns problemas como a formação de cristais de gelo e o desequilíbrio no fluxo de fluidos (LIEBENTHRON e MONTAG, 2020).

O principal componente da célula é a água, variando de 60 a 85% do seu volume total. Ao decorrer de um resfriamento, fragmentos de gelo são originados e estes podem perfurar membranas, organelas e romper vasos. Então, a densidade começa a sofrer variações, o que faz com que as moléculas se organizem iniciando a formação de cristais de gelo, denominado de nucleação. A nucleação é instável e pode se desfazer rapidamente, mas com a diminuição constante da temperatura os cristais de gelo aumentam de tamanho e quantidade, o que resulta em congelamento seguido de injúria a morte celular (MORRIS e ACTON, 2013; LIEBENTHRON e MONTAG, 2020).

Outro dano produzido por efeito indireto do congelamento é o desequilíbrio no fluxo de fluidos. Quando o gelo é formado, os solutos presentes tendem a ser

excluídos da estrutura sólida e conservam-se em uma solução altamente concentrada não congelada. O excesso de solutos (sais, metabólitos, proteínas) externos à célula causa o efluxo da água intracelular para contrabalancear a pressão osmótica, assim não só a ultraestrutura é prejudicada por desidratação, mas também as interações iônicas, a estabilidade enzimática e a homeostasia celular (WOLF e BRYANT, 1999).

Existem substâncias que podem ser utilizadas como crioprotetores (ACPs) durante o congelamento de células e tecidos, que evitam a formação de cristais de gelo e reduzem a incidência dos efeitos adjuntos aos danos por desidratação. Com a sua descoberta, as técnicas de congelamento puderam ser aprimoradas, contribuindo não apenas para a área biológica, mas também para a indústria (HERRAIZ, DIAZ-GARCIA e PELLICER, 2016). Na indústria química os crioprotetores são utilizados para procedimentos industriais, em aditivos de automóveis para reduzir o ponto de congelamento e aumentar o ponto de ebulição em sistemas fechados de refrigeração. Na indústria alimentícia, como em cervejarias, podem ser usados para agilizar o resfriamento no processo de produção de cerveja (MAKISHI *et al.*, 2020).

Na criobiologia, os ACPs são amplamente utilizados em protocolos de vitrificação e são indispensáveis para o sucesso da técnica. Eles podem ser classificados como extracelulares/ não permeáveis ou intracelulares/permeáveis (Quadro 1). A eficácia pode variar de acordo com o tipo de material biológico, tempo de exposição, concentração, combinação e protocolo utilizado. Contudo, a técnica exige concentrações relativamente altas que podem gerar metabólitos tóxicos para as células, seguido de injúria celular (CASTRO *et al.*, 2011; BEST, 2015; MULLEN e FAHY, 2011).

Os ACPs intracelulares são solventes orgânicos penetrantes de baixo peso molecular. Aproximadamente 100 compostos já foram identificados e muitas combinações avaliadas em soluções de vitrificação para células, tecidos e órgãos reprodutivos, mas apenas alguns selecionados para criobiologia. Os agentes permeáveis geralmente utilizados são dimetil sulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PROH), etilenoglicol (EG) e glicerol (GLI) (WOWK, 2007; EL CURY-SILVA *et al.*, 2021).

Os mecanismos pelos quais esses ACPs permeáveis protegem as células e tecidos vivos se iniciam pela substituição parcial de água dentro da célula com aumento da viscosidade que reduz o ponto de solidificação. Eles evitam a formação de cristais de gelo quando se intercalam entre os arranjos de moléculas de água no

congelamento. Assim, a água ficará disponível e não haverá a superconcentração relativa de solutos que resultaria em alterações osmóticas seguido de desidratação celular brusca (HERRAIZ, DIAZ-GARCIA, PELLICER, 2016).

Os ACPs extracelulares não permeiam a célula, são moléculas de cadeia longa solúveis em água que aumentam a osmolaridade da solução, e geralmente são combinados com os ACPs intracelulares durante a criopreservação. A ação dos agentes não penetrantes também reduz a formação de cristais de gelo e controla a desidratação para a proteção celular. A viscosidade da solução é mantida, o que impede a formação de gelo extracelular e aumenta a pressão osmótica externa de forma a moderar a saída de água do interior da célula (MCGANN, 1978; MATSUMURA *et al.*, 2021). Os ACPs não permeáveis utilizados em tecido ovariano humano com mais frequência são dissacarídeos como sacarose e trealose e alguns polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico, Ficoll (EL CURY-SILVA *et al.*, 2021). Estudos mostraram menor toxicidade ao combinar ACPs. Ao usar apenas um, avaliado como menos tóxico, foi necessário utilizar altas concentrações para alcançar a vitrificação, o que levou a efeitos tóxicos específicos (FAHY *et al.*, 2004; ALMANSOORI *et al.*, 2012).

A toxicidade de um ACP pode ser específica, de acordo com cada tecido e agente protetor, ou inespecífica, nesse caso, a toxicidade dos crioprotetores seria inerente ao contato com as células, dependendo apenas da força de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos polares do ACP durante a formação de gelo (FAHY, 1986).

A toxicidade específica de alguns crioprotetores está ligada a determinadas células e tecidos ou a temperaturas mais elevadas. O EG durante sua metabolização no fígado pode gerar metabólitos que resultam em acidose metabólica, precipitação de oxalato de cálcio em vários tecidos, irritação gastrointestinal e edema pulmonar (BEST, 2015). Chang *et al.* (2011) testaram diferentes tempos de exposição do tecido ovariano humano ao EG e encontraram danos na morfologia e no DNA dos folículos preservados no menor e maior tempo (5 min e 20 min), enquanto a exposição de 10 minutos obteve folículos viáveis.

O propilenoglicol é empregado na indústria alimentícia como emulsificante e umidificante (ADICEL, 2021). Esse agente é utilizado com segurança e parece não ter efeitos tóxicos para o organismo. Embora sua aplicação em técnicas de vitrificação de tecido ovariano humano possa apresentar toxicidade, o propilenoglicol promoveu boa

preservação tecidual quando combinado a outros ACPs, como o EG na concentração de 1,5M (SANFILIPPO *et al.*, 2015).

O glicerol foi um dos primeiros crioprotetores a ser utilizados para a conservação de tecidos biológicos, no entanto ele pode induzir lesão renal em modelos murinos e danos na motilidade de espermatozóides humanos, quando empregado em elevadas concentrações. Em tecido ovariano de macaco, o glicerol manteve a viabilidade tecidual e folicular (KORRAPATI, SHANER, SCHNELLMANN, 2012; TING *et al.*, 2013; ROBINSON, 2018).

O DMSO é um dos crioprotetores mais utilizados, mas parece causar prejuízos em baixas e altas concentrações. O DMSO mostrou diminuir a firmeza e aumentar a fluidez das membranas celulares. Um estudo em tecido ovariano humano mostrou que o DMSO não preservou a estrutura e a viabilidade do tecido em uma concentração de 50%, empregada sem combinações na solução de congelamento (LEONEL *et al.*, 2019; BEST, 2015).

Quanto à toxicidade inespecífica, os agentes crioprotetores podem ser avaliados pela força média da ligação de hidrogênio entre os seus grupos polares e as moléculas de água em uma solução. Um ACP com alta afinidade por essa ligação precisará de uma menor concentração e terá um maior poder de vitrificação. Contudo, o poder de vitrificação é indiretamente proporcional à viabilidade, pois quanto mais potente é o crioprotetor, mais tóxico ele poderá ser para as células, por indisponibilizar moléculas de água para hidratação de macromoléculas. Logo, é sugerido o uso de combinações dos agentes de menor a médio potencial de vitrificação, assim a toxicidade seria reduzida e o processo de transição vítreo efetivo (FAHY *et al.*, 2004; BEST, 2015).

CRIOPROTETORES	
Permeáveis	Não permeáveis
Baixo peso molecular – atravessam a membrana lentamente.	Macromoléculas – NÃO atravessam a membrana, desidratação controlada.
Glicerol	Açúcares (sacarose, trealose, rafinose)
Etilenoglicol	Ficoll
Propilenoglicol	Polímeros sintéticos
DMSO (dimetilsulfóxido)	-

Quadro 1. Tipos de Crioprotetores. Quadro Original.

2.8 O uso de polímeros sintéticos anticongelantes

As proteínas anticongelantes (AFPs) são macromoléculas encontradas em algumas espécies que se adaptaram para suportar invernos rigorosos, como peixes que sobrevivem ao congelamento e descongelamento ou plantas que são tolerantes ao frio. Os mecanismos exatos de cada uma ainda são investigados e podem variar de acordo com cada tipo, mas essas macromoléculas têm em comum a capacidade de inibir a recristalização do gelo, formar cristais de gelo em morfologias incomuns e diminuir o ponto de congelamento de uma maneira não coligativa (MØBJERG *et al.*, 2011; VOETS, 2017).

O controle sobre a formação de gelo pode impactar tanto o setor industrial quanto social. A partir dessas características peculiares, as proteínas anticongelantes entraram em diversos ramos da indústria como na produção de sorvetes para melhora da consistência e estão sendo inseridas na criopreservação. Contudo, a origem desses materiais pode ser onerosa e eles nem sempre são adequados para criopreservação, devido ao potencial de imunogenicidade e toxicidade. Como substituição, polímeros sintéticos foram desenvolvidos (BIGGS *et al.*, 2017).

Os polímeros sintéticos são repetições monoméricas, com estruturas variadas, produzidos para mimetizar as propriedades funcionais de proteínas anticongelantes.

Os resultados são promissores em diversas áreas, tais como o armazenamento de células ou tecidos a baixa temperatura, suspensões de gelo para sistemas de refrigeração e armazenamento de alimentos (BANG *et al.*, 2013).

O uso de pequenas concentrações de polímeros sintéticos anticongelantes combinados a soluções de vitrificação parece melhorar a criopreservação, através do bloqueio do gelo pela inibição da nucleação heterogênea, além de também reduzir as concentrações de crioprotetores permeáveis necessários para o processo (WOWK *et al.*, 2000).

O primeiro polímero descrito na literatura e ainda utilizado até o momento foi o PVA - álcool polivinílico $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$. Outros exemplos de polímeros sintéticos são: polivinilpirrolidona – PVP K12 $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$ e poliglicerol - $(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_n (\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2)_m$ (WOWK *et al.*, 2000; BIGGS *et al.*, 2017). O PVA é hidrossolúvel, usado na fabricação de papel, para colagem de preparo têxtil e como emulsificante. O PVA pode ser usado também em aplicações biológicas por ser de baixa toxicidade, como em produtos de higiene, colírios e lentes de contato (GAFFAR, HUNTER, MIRAJKAR, 2002; DEBOTTON e DAHAN, 2017; ALHALAFI, 2017). O PVP K12 é solúvel em água, utilizado em produções de cerâmicas, fibras de vidro, vidros, peças para eletrônicos e tecidos (Instruções de produtos, ASHLAND, 2021). O poliglicerol é hidrofílico e biocompatível, pode ser utilizado como emulsificante na indústria de chocolate e possui propriedades para a fixação e sobrevivência das células no cultivo em 3D (WILSON, SCHIE e HOWES, 1998; PUBCHEM, 2021). Na indústria farmacêutica esses polímeros podem ser usados como veículos inertes de drogas, em comprimidos, líquidos e adesivos transdérmicos (DEBOTTON e DAHAN, 2017).

Com relação à vitrificação, em um estudo realizado por Wowk e colaboradores (2000), o álcool polivinílico (PVA) foi testado e permitiu reduzir as concentrações de glicerol e DMSO utilizadas, como também inibiu a desvitrificação em soluções de etilenoglicol. Os dados encontrados por Deller *et al.* (2014) corroboram o estudo de Wowk, demonstrando que a criopreservação de eritrócitos apresentou uma boa biocompatibilidade quando utilizadas baixas concentrações (1 mg ml^{-1}) de PVA combinado, o que tornou possível recuperar eritrócitos viáveis.

O uso do PVP na vitrificação de tecidos ovarianos caninos preservou a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento dos folículos primordiais quando adicionado ao DMSO (FUJIHARA, KANEKO e INOUE-MURAYAMA, 2019). Além disso, o uso de

PVA e poliglicerol acrescentados ao DMSO+EG durante a vitrificação de embriões de coelho permitiu a obtenção de descendentes vivos (MARCO-JIMENEZ *et al.*, 2014).

Em bovinos, os polímeros PVA, poliglicerol e PVP K-12 foram testados separadamente e comparados para a vitrificação de tecido ovariano juntamente com DMSO, EG e sacarose. A taxa de folículos morfológicamente normais foi maior nas amostras de PVA, embora a viabilidade e a função estivessem prejudicadas quando comparadas às amostras de PVP K-12. O poliglicerol mostrou-se ineficaz, o tecido apresentou baixa porcentagem de folículos normais e viabilidade. Os autores sugeriram que tecido ovariano bovino usando polímeros sintéticos pode ser preservado. No entanto, mais análises para confirmar a funcionalidade do uso de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino são necessárias (SHAHSAVARI *et al.*, 2020).

Baseado em alguns estudos que obtiveram melhora dos resultados da criopreservação, quando combinaram polímeros na solução de vitrificação, Ting e colaboradores (2012) testaram a mistura de três polímeros sintéticos (PVA, PVP K-12, poliglicerol) junto ao glicerol+EG na vitrificação de tecido ovariano de macacos e encontraram folículos pré-antrais preservados quanto a morfologia e funcionalidade. Os autores destacam a importância da replicação deste estudo, principalmente em humanos, dada a relevância do trabalho (TING *et al.*, 2012).

2.9 Modelo bovino para criopreservação

O modelo animal permite fornecer uma base hipotética para futuras pesquisas em humanos. Existe um crescente interesse no uso de modelos bovinos para estudos aprofundados sobre técnicas de preservação da fertilidade (BAERWALD, 2009; ROVANI *et al.*, 2017). O modelo bovino possibilita a aquisição de experiência, treinamento e novos protocolos experimentais, para posterior aplicação humana, devido à semelhança fisiológica entre humanos e bovinos, como a duração da foliculogênese e ovulação única, bem como conteúdo lipídico de oócitos e metabolismo do embrião (LANGBEEN *et al.*, 2015). Além disso, trabalhar com modelos *in vitro* de bovinos é viável pelo fácil acesso ao abatedouro para aquisição de ovários e protocolos bem estabelecidos para técnicas de reprodução, o que garante a disponibilidade irrestrita de espécimes de estudo (LANGBEEN *et al.*, 2015).

Assim como a espécie humana, bovinos possuem ovários em pares, com formato de amêndoas, sua superfície é revestida por epitélio pavimentoso ou cúbico simples, os folículos estão predominantemente no córtex e a região mais interna é chamada de medula, composta por tecido conjuntivo frouxo e vasos. Em bovinos, os ovários medem aproximadamente de 1,5 a 5 cm de comprimento, de 1,5 a 2,0 cm de largura e 1 a 3 cm de espessura (Figura 8) (SOARES e JUNQUEIRA, 2007). Os ovários humanos possuem medidas similares, com aproximadamente 3 cm de comprimento, 1,5 cm de largura e 1 cm de espessura (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 13^a ed).

Assim como as mulheres têm um ciclo menstrual, os bovinos têm o ciclo estral com duração de 21 dias que acontece ao longo de todo o ano, dividido em proestro, estro, metaestro e diestro. O início do ciclo reprodutivo em bovinos é marcado pelo estro, já que a menstruação não acontece. A ovulação ocorre próximo ao dia 11 de 21 dias do ciclo estral, enquanto no ciclo menstrual humano ela acontece próximo ao dia 14 de 28 dias. A fase folicular em bovinos é mais curta, ocupando ~1/5 do ciclo, já nas mulheres metade do ciclo é tomado pela fase folicular (GASPERIN, SALES e VASCONCELOS, 2021; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 13^a ed).

O período da transição de folículos primordiais até a pré-ovulação é parecido entre as espécies humana e bovina, podendo durar aproximadamente 175 dias. Ambos são monovulares, com existência de folículos dominantes e subdominantes, porém a taxa de crescimento desses folículos é maior em bovinos, com 2,7 mm, enquanto em humanos é de 1,2 mm. O tamanho do folículo ovulatório humano é de ~20 mm e o bovino é ~16 mm (SANTOS, 2011; SANTOS *et al.*, 2012).

As concentrações de estradiol circulante aumentam com crescimento contínuo do folículo dominante e o pico acontece um dia antes do pico de LH em mulheres e no mesmo dia do pico de LH em vacas. Em bovinos, a ovulação ocorre geralmente de 12 a 16 horas após o término do cio (SANTOS, 2011; GASPERIN, SALES e VASCONCELOS, 2021).

Em bovinos, desde a década de 1990 (PAYNTER *et al.*, 1999), é possível congelar fragmentos de tecido ovariano preservando um percentual razoável de folículos morfológicamente normais. Em concordância com esses resultados, estudos mais recentes demonstraram também um alto percentual de folículos viáveis, semelhante ao controle fresco, após a criopreservação de tecido ovariano bovino (LUCCI *et al.*, 2004; CELESTINO *et al.*, 2008). Em um trabalho realizado por Gandolfi

e colaboradores (2006) em que se avaliou a eficiência da vitrificação para a comparação da criopreservação de tecido ovariano humano, suíno e bovino, a fim de determinar o melhor modelo experimental para o futuro desenvolvimento de novos protocolos, os autores mostraram que os folículos pré-antrais bovinos apresentaram comportamento similar aos folículos humanos, quando expostos a diferentes crioprotetores, sendo portanto um bom modelo translacional. Em outro trabalho preliminar realizado por Isachenko e colaboradores (2002), observou-se que a criopreservação de tecido ovariano bovino por vitrificação juntamente com a curta exposição a Supercool X-1000 (PVA) proporcionava uma melhor qualidade do tecido após descongelamento, por evitar danos pela formação de cristais de gelo. Os autores, ainda, destacaram a importância de trabalhos futuros destinados ao desenvolvimento deste tipo de protocolo (ISACHENKO *et al.*, 2003).

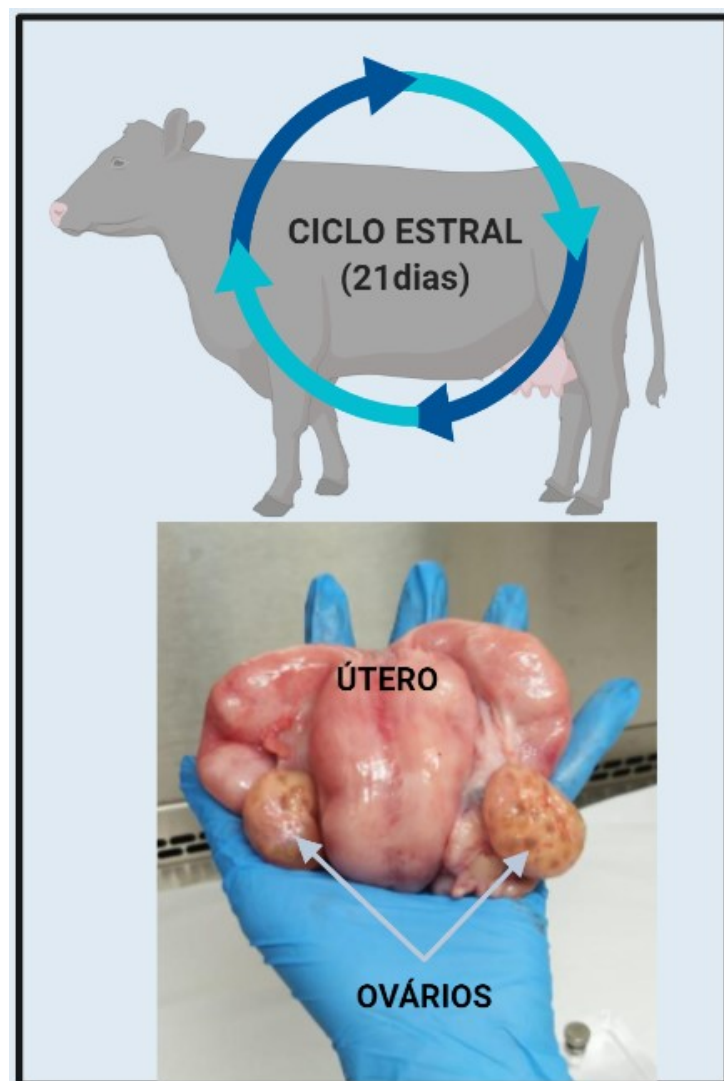


Figura 8. Figura ilustrativa e útero fresco com par de ovários bovino. Figura Original – Bio Render.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a histomorfologia dos fragmentos de tecido ovariano após a vitrificação com e sem o uso de polímeros sintéticos;
2. Avaliar a sobrevivência folicular *in vitro*, em cultivo 3D na matriz de alginato após o isolamento mecânico de folículos em fragmentos de tecido ovariano vitrificados com e sem o uso de polímeros sintéticos.
3. Avaliar a formação de antro folicular *in vitro*, em cultivo 3D na matriz de alginato após o isolamento mecânico de folículos em fragmentos de tecido ovariano vitrificados com e sem o uso de polímeros sintéticos.
4. Avaliar a produção hormonal folicular *in vitro* no meio de cultivo 3D na matriz de alginato após vitrificação com e sem o uso de polímeros sintéticos.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Animais e coleta de ovários

O presente trabalho é um estudo experimental com o uso de ovários de bovinos abatidos em frigorífico para consumo humano, dispensado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG). “A CEUA esclarece que a coleta de tecido post mortem não requer submissão de protocolo, conforme informação do CONCEA (Anexo da Carta Consulta 007/2017 da plenária da 36ª Reunião do CONCEA). Para todos os questionamentos que envolvem peças de abatedouro, dentes, entre outros, sem manipulação de animal vivo, a resposta é: Não há necessidade de obter a autorização da CEUA para os procedimentos listados” (anexo I).

Todos os reagentes utilizados são da Sigma-Aldrich, salvo polímeros sintéticos cuja marca está especificada no item Vitrificação e aquecimento.

Os ovários (n = 10) (Figura 9) foram coletados de dez vacas adultas mestiças em um abatedouro local por funcionária treinada (anexo II).

Imediatamente após o abate os ovários eram retirados, imersos em uma solução de transporte (meio essencial mínimo (α -MEM) suplementado 100 μ g/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 29 μ g/ml de ácido ascórbico), armazenados em um recipiente plástico e transportados à temperatura de 15 a 20 °C em uma caixa de isopor no prazo de 1h (WANG, *et al.*, 2011; SHAHSAVARI, 2020).

No laboratório, a gordura e resto de tecido adjacente foram retirados, o ovário foi cortado por bisturi em secção frontal e o córtex separado da medula por um cortador de tecido em espessura de aproximadamente 1 milímetro (Figura 10) (Thomas Scientific Cortador de Tecido / Lâminas). A medula foi descartada, o córtex manipulado em um meio padrão de manipulação a 37°C (constituído de α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 29 μ g/ml de ácido ascórbico e 100 μ g/ml penicilina G + estreptomicina, aquecido a 37 ° C) e cortado em 30 fragmentos de ~ 3 x 3 mm (Figura 11). Para cada animal, 10 fragmentos foram usados como controle fresco, 10 fragmentos foram usados para o grupo vitrificado com o uso de polímeros sintéticos e 10 para o grupo vitrificado sem o uso de polímeros sintéticos (Figura 12). O controle fresco e os grupos vitrificados foram destinados para análise histológica e isolamento folicular.

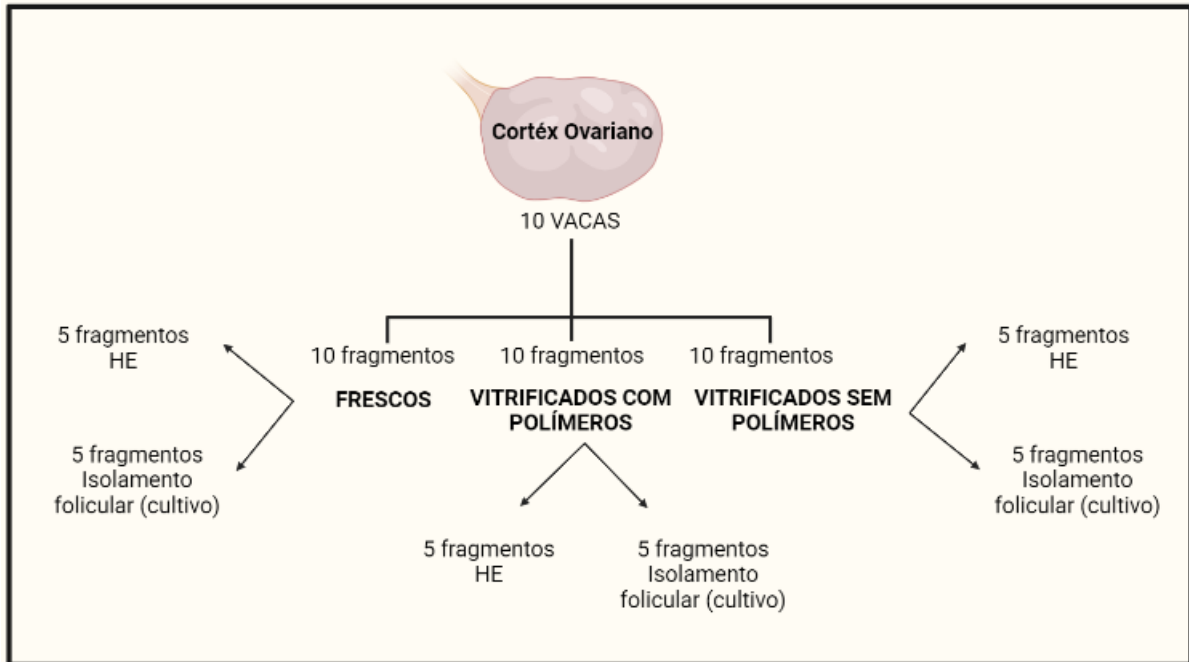


Figura 9. Quadro esquemático dos métodos. Figura original – Bio Render.

PROCESSAMENTO DE TECIDO OVARIANO - CRIOPRESERVAÇÃO

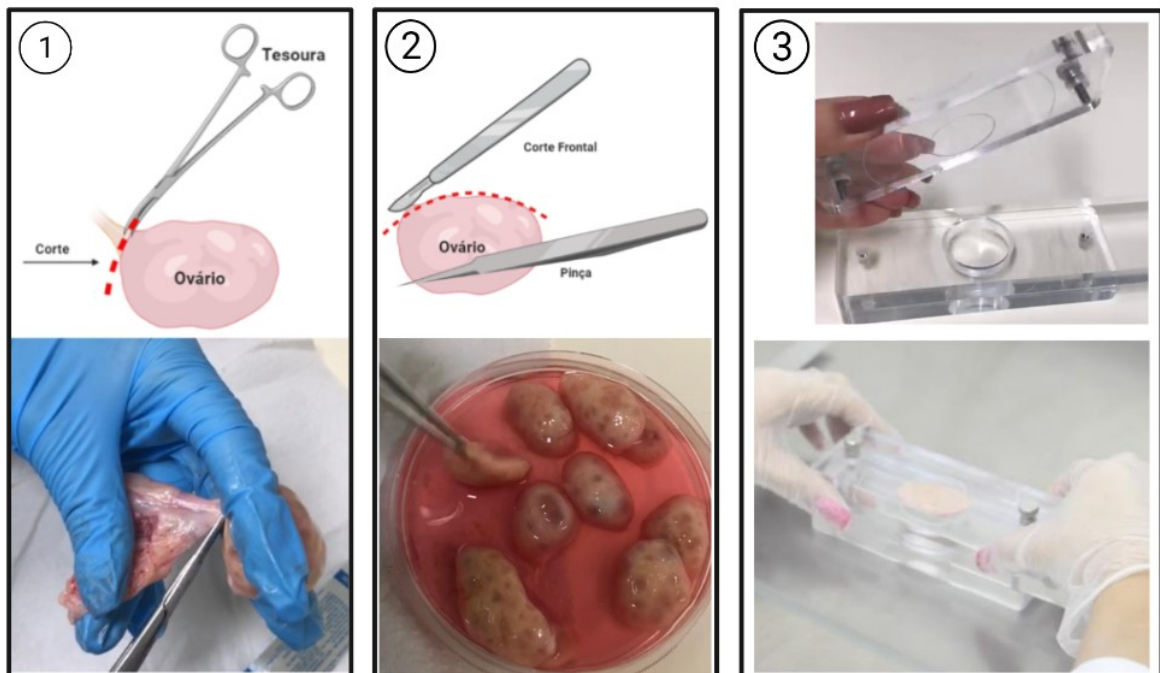


Figura 10. Processamento de tecido ovariano bovino. 1- Retirada de ligamentos do ovário. 2- Corte frontal dos ovários. 3- Preparo do semi-ovário no cortador de tecidos. Figuras Originais - Bio Render.

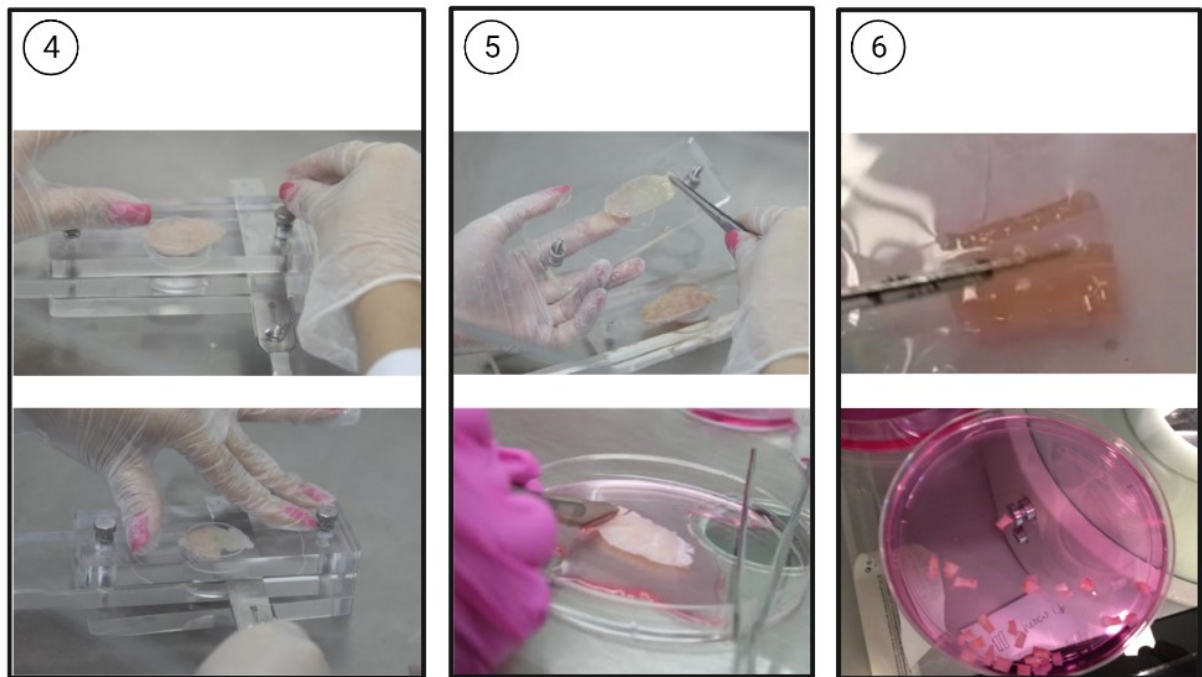


Figura 11. Processamento de tecido ovariano bovino. 4- Manejo e corte da fina camada do córtex ovariano. 5 e 6- Preparo de tiras e fragmentos de córtex. Figuras Originais.

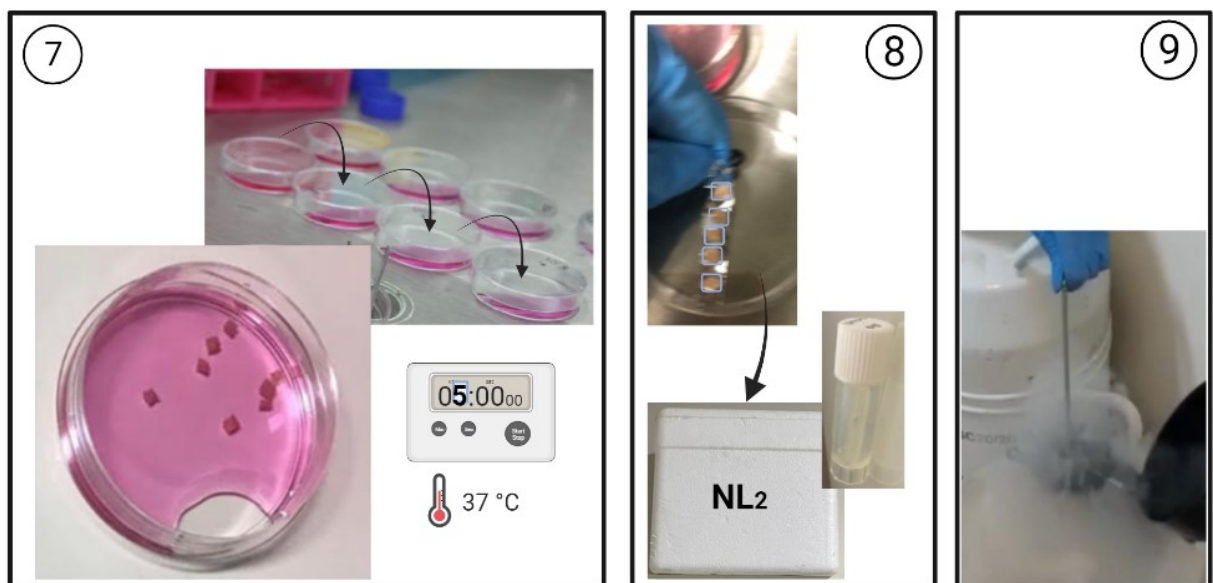


Figura 12. Processamento de tecido ovariano bovino. 7- Vitrificação em soluções com crioprotetores. 8- Vitrificação em sistema aberto, folha de alumínio. 9- Armazenamento em nitrogênio líquido. Figuras Originais - Bio Render.

4.2 Vitrificação e Aquecimento

As soluções de vitrificação foram preparadas com 24-48 horas de antecedência.

Para o processo de vitrificação, os fragmentos foram sequencialmente imersos em soluções de equilíbrio (Meio suplementado sem crioprotetores, ES, VS1 e VS2) e por último na solução final de vitrificação (VS3 e VS3 CP) contendo:

- 1- Meio suplementado sem crioprotetores – 5 minutos;
- 2- ES – 5 % de glicerol (p/v) – 5 minutos;
- 2- VS1 - $\frac{1}{4}$ da solução de vitrificação VS3 - 5 minutos;
- 3- VS2 - $\frac{1}{2}$ da solução de vitrificação VS3 - 5 minutos;
- 4- Grupo sem polímeros: VS3 - 25% de glicerol (p/v), 25% de Etilenoglicol (p/v) - 1 minuto;
- 5- Grupo com polímeros: VS3 CP – 25% de glicerol (p/v), 25% de Etilenoglicol (p/v), e polímeros sintéticos (0,2% PVP K-12, 0,2% SuperCool X-1000 TM e 0,4% SuperCool Z-1000 TM; 21st Century Medicine, Fontana, CA, EUA) - 1 minuto.

Todas as soluções de congelamento e descongelamento foram feitas com o meio essencial mínimo (α -MEM) suplementado com 15% de soro fetal bovino e 29 μ g/ml de ácido ascórbico.

As vitrificações aconteceram sob homogeneização constante à temperatura de 37°C, segundo protocolo descrito anteriormente (TING *et al.* 2012 e 2013).

Após a imersão na última solução, os fragmentos foram colocados individualmente em uma tira de alumínio (8 x 4 mm²), mergulhados em nitrogênio líquido (N₂), transferidos para criotubos identificados e armazenados em N₂ até o descongelamento (Figura 12).

Para o aquecimento, os criotubos foram removidos do N₂, mantidos por 1 minuto à temperatura ambiente e por 30 segundos a 40°C no banho-maria. Os fragmentos descongelados foram colocados em meios suplementados com sacarose em diluições decrescentes e sequenciais de 1M; 0,75M; 0,5M; 0,25M; 0,125M por 5 minutos cada (TING *et al.* 2012 e 2013). Em seguida, foram transferidos para meio α -MEM suplementado com 3% de soro fetal bovino e 29 μ g/ml de ácido ascórbico 2 vezes por 10 minutos a 37°C, e incubados por 2 horas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ antes de fixar o material (Figura 13).

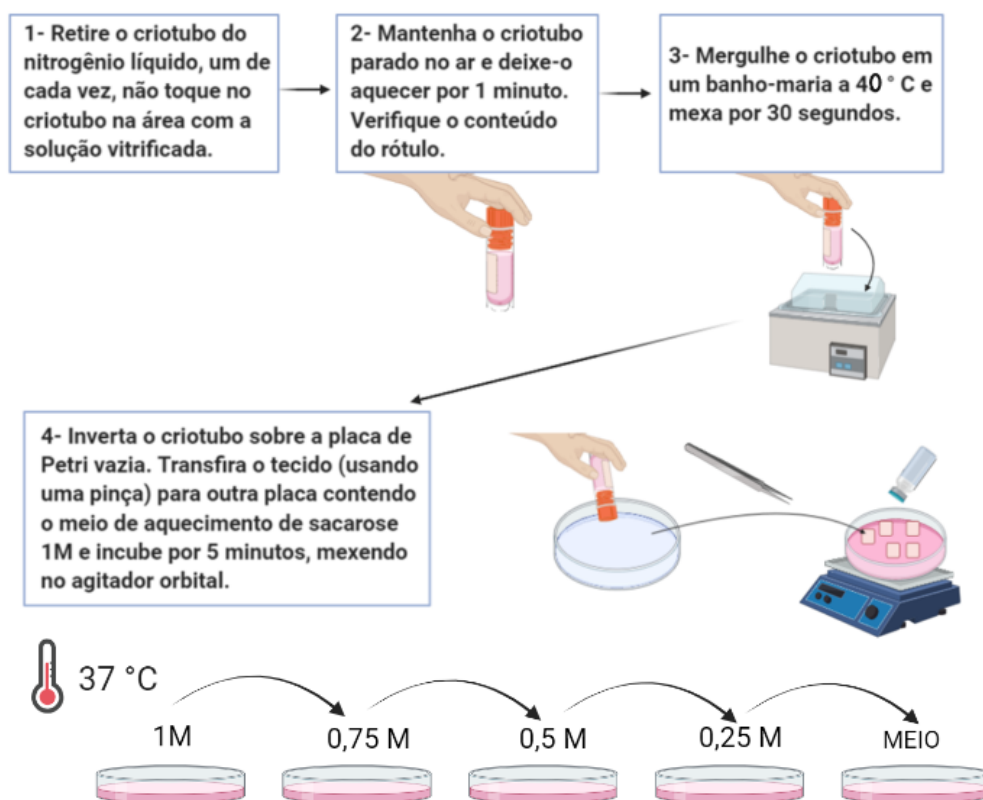


Figura 13. Esquema do aquecimento pós vitrificação do tecido ovariano bovino. Figuras Originais – Bio Render.

4.3 Histologia

Os fragmentos (n= 5 /grupo) de tecido fresco e descongelados foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M (pH 7,2-7,4) a 4 °C overnight. Retirados do fixador, foram transferidos para tampão fosfato a 0,1M (pH 7,2-7,4) a 4 °C. Para incluir em paraplast (Merk), os tecidos ovarianos foram desidratados em uma série gradual de álcoois (70%, 80%, 95%, absoluto - 2 vezes, xilol – 2 vezes) e então inseridos no paraplast (58°C) por 3 banhos de 25 minutos. O material incluído foi seccionado em fragmentos de 5 µm de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H & E) e avaliados em um microscópio óptico (Nikon) com aumento de 40x, tendo os folículos identificados e contados em um a cada 10 cortes histológicos seriados.

Os estágios de desenvolvimento dos folículos foram definidos como (SHAHSAVARI *et al.*, 2020):

- Primordial: uma camada de células granulosas achatadas ou achatadas com algumas cuboidais ao redor do oócito e sem antro.

- Primários: uma camada de células granulosas cuboidais ao redor do oócito e sem antro.
- Secundários: duas ou mais camadas de células granulosas cuboidais ao redor do oócito e sem antro.

Os folículos foram considerados morfológicamente normais se apresentavam com oócitos e células da granulosa intactos, ou degenerados/atrésicos se exibissem um núcleo de oócito picnótico ou ooplasma encolhido, sem ou com células da granulosa desorganizadas. Os folículos foram analisados apenas nas seções em que foi observado o oócito com núcleo, para evitar repetição na contagem (SHAHSAVARI *et al.*, 2020).

4.4 Isolamento e encapsulamento folicular

Após o descongelamento, o tecido criopreservado foi mantido a 37°C, 20% O₂ e 5% CO₂ até o início do isolamento de cada fragmento.

Fragmentos (n= 5/ grupo) de tecido a fresco e descongelados foram usados para isolamento e cultivo de folículos.

Para o isolamento folicular, os fragmentos continuaram imersos em meio padrão de manipulação. Os folículos foram mecanicamente isolados com o uso de agulhas (25 x 8mm e 13x4,5mm) e estereomicroscópio (MICRONAL). Folículos de diâmetros entre 120-195 μ m que apresentassem membrana basal intacta foram selecionados, transferidos individualmente para gotículas de 5 μ L 0.25% (p/v) de alginato de sódio estéril e solução tamponada PBS (Tampão fosfato-salino). As gotas contendo cada folículo foram submersas cuidadosamente em uma solução “cross-linking” (50 mM CaCl₂, 140 mM NaCl e PBS), durante aproximadamente 60 segundos. Os folículos encapsulados em matriz de alginato foram então transferidos para placa de cultivo (Figura 14).



Figura 14. Figuras representativas do isolamento mecânico seguido de cultivo folicular 3D em matriz de alginato. Figuras Originais.

4.5 Cultivo folicular 3D em matriz de alginato

Para o início do cultivo folicular 3D em matriz de alginato, o meio de cultivo foi preparado com um dia de antecedência e equilibrado a 37°C e 5% CO₂ (Figura 15). No dia do isolamento folicular, a placa de cultivo (48 poços – KASVI) foi previamente organizada em ambiente estéril. 300 µL do meio de cultivo foram adicionados em cada um de 12 poços centrais, onde o folículo encapsulado em alginato seria cultivado individualmente, e os poços restantes foram preenchidos com a mesma quantidade de água de injeção para evitar a rápida evaporação do meio durante o cultivo. A placa foi identificada e marcada quanto à localização dos folículos (Figura 15).

Composição do meio de cultivo (Solução estéril - filtrada no filtro de 0,22µm):

- Meio αMEM
- 60 µL/ml de SSS;
- 44 mUI/ml Hormônio Folículo Estimulante (FSH);
- 0,5 mg/ml de fetuína bovina (proteína do plasma fetal);
- 29 µg/ml de fosfato de ácido ascórbico;
- 5 µg/ml de transferrina;
- 0,5 µg/ml de insulina bovina;
- 5 ng/ml de selenito de sódio;
- 100 µg/ml penicilina G + estreptomicina (cada).

O cultivo dos folículos foi acompanhado por 15 dias a 37°C e 5% CO₂. Fotografias foram feitas no dia 1 (D1), dia 7 (D7) e dia 15 (D15) através do microscópio invertido (NIKON).

O meio de cultivo foi trocado parcialmente (50%) a cada dois dias, e semanalmente essas amostras foram coletadas e congeladas para análise dos hormônios ovarianos estradiol e progesterona.

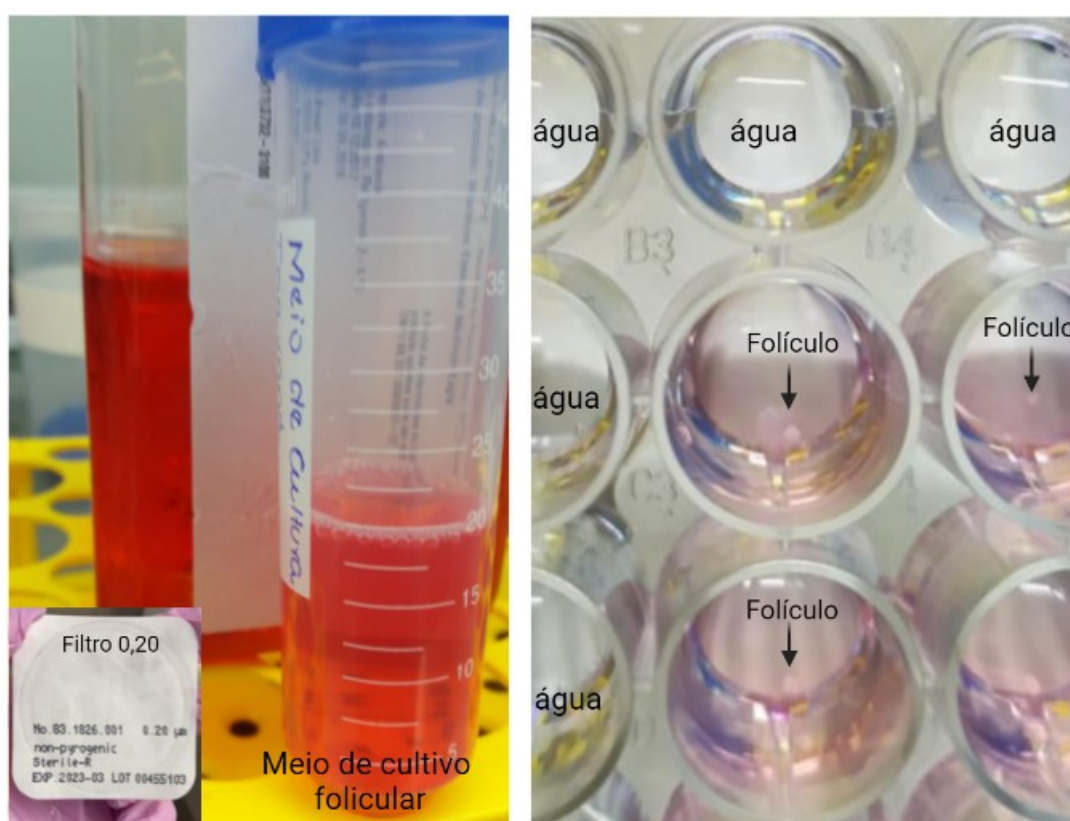


Figura 15. Figuras representativas do meio de cultivo e dos folículos cultivados 3D em matriz de alginato.

4.6 Sobrevida folicular, crescimento e formação de antro

A sobrevida folicular, o diâmetro e a formação de antro foram avaliados por meio de um microscópio invertido acoplado a uma câmera digital (NIKON) e as fotografias semanais foram analisadas no software de imagem ImageJ 1.44 p.

Para avaliar o crescimento, os folículos foram medidos a partir da camada externa de células, através da média de duas medidas perpendiculares entre si. A média destes valores foi considerada o diâmetro do folículo.

Os folículos classificados como degenerados apresentavam uma ou mais características como:

- 1- oócito fora da parede folicular ou sem células da granulosa;
- 2- fragmentado;
- 3- diâmetro diminuído;
- 4- escurecimento total do folículo durante o cultivo.

A formação de antro foi avaliada através do acompanhamento da cultura, com a formação de uma cavidade clara no interior folicular (Figura 16).

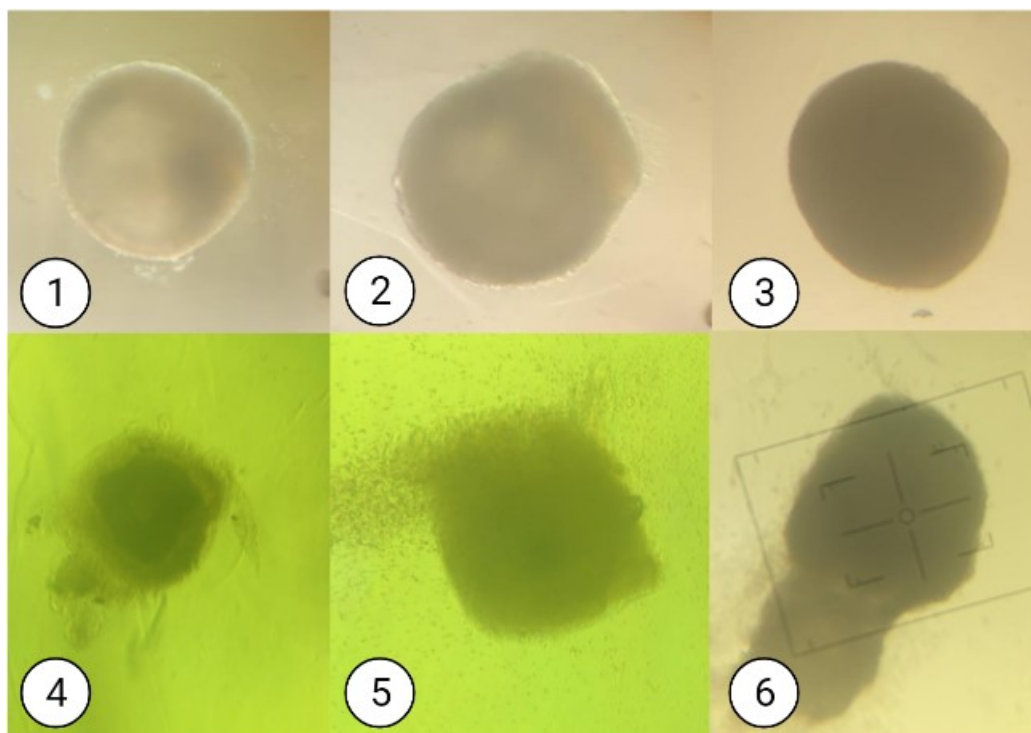


Figura 16. Folículos bovinos isolados mecanicamente e cultivados 3D em matriz de alginato. Os folículos 1,2 e 3 estão vivos, mas o 3 não formou antro. Folículos 4, 5 e 6 estão mortos e não possuem antro.

4.7 Dosagem de estradiol (E2) e progesterona (P4) do cultivo *in vitro*

Amostras de meio de cultivo foram coletadas nos dias 7 e 15, durante o período de cultivo, e congeladas. Posteriormente, foram analisadas para a determinação das concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4).

As dosagens foram feitas pelo método de imunoenensaio automatizado (Beckman Coulter). O ensaio imunoenzimático é expresso por quimioluminescência de ligação competitiva.

Depois da calibração do equipamento, as amostras foram organizadas e adicionadas em cubetas. O equipamento pipeta as amostras e as adiciona a um recipiente de reação contendo partículas paramagnéticas revestidas com anticorpos de cabra antiprogesteronas ou anticorpos de coelho antiestradiol e uma solução proteica TRIS tamponada. As amostras são incubadas e após esse período o conjugado estradiol ou progesterona - fosfatase alcalina é adicionado à reação e mais um período de incubação é realizado. O hormônio da amostra compete com o hormônio conjugado pelos sítios de ligação limitados. Os complexos antígeno-anticorpo formados ligam-se ao anticorpo de captura nas partículas paramagnéticas e são retidos em um campo magnético, enquanto os não ligados são removidos por lavagem. Em seguida, o substrato quimioluminescente (Dioxetano fosfato) é adicionado ao recipiente, a luz gerada pela reação química é medida com um luminômetro e transformada em Unidade Relativa de Luz (RLU). A intensidade de luz é inversamente proporcional à concentração de hormônio na amostra. A leitura da amostra é múltipla e a média liberada automaticamente pelo equipamento. O meio de cultivo puro sem cultivo foi considerado o padrão branco da reação (CARDOSO, 2018). O meio de cultura foi usado como branco para corrigir os valores encontrados.

4.8 Análise de dados e estatística

Na análise do número de folículos pré-antrais nas seções de H&E, os dados dos vários cortes histológicos de cada animal foram combinados de forma a obter uma única contagem folicular por animal. Os dados foram apresentados como porcentagem de folículos pré-antrais normais em relação ao número total de folículos de cada grupo. Para o cultivo 3D, as taxas de sobrevivência e formação de antro foram analisadas por qui-quadrado. Para a análise de crescimento folicular (diâmetro semanal) e produção hormonal entre cada grupo, quando apresentada distribuição normal, os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e os diferentes grupos de tratamento foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de testes de comparações múltiplas (Tukey's). Se não apresentaram distribuição normal, os grupos foram comparados pela ANOVA de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Em comparações dentro do mesmo grupo para os acompanhamentos hormonais de D7 e D15 será utilizado teste T pareado ou Wilcoxon, os valores foram expressos em média/mediana \pm erro padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Morfologia do tecido e folículos ovarianos

O estroma foi avaliado qualitativamente quanto a seu aspecto. Nos tecidos frescos, apresentava-se em morfologia densa e compacta. No entanto, nos grupos vitrificados, foram observadas zonas com sinais de injúria, com espaços vazios e menos densos (Figura 17).

Para análise morfológica, foram contados e classificados 3235 folículos pré-antrais (Figura 18). Os grupos que passaram pela vitrificação tinham uma menor porcentagem de folículos normais quando comparados ao tecido fresco (Fresco x CP $p < 0,0001$; Fresco x SP $p = 0,0004$). Contudo, não foi observada diferença entre os grupos vitrificados com e sem polímeros (CP x SP $p = 0,7173$) (Tabela 1).

Para todos os grupos avaliados existiam folículos com anormalidades morfológicas, como desorganização das células da granulosa, oócito com citoplasma encolhido ou folículos rompidos.

A fim de comparar se houve uma maior prevalência de anormalidade morfológica em um dos estágios foliculares pré-antrais após a criopreservação, os folículos foram classificados durante a contagem em primordiais, primários e secundários. Os grupos com e sem adição de polímeros apresentaram uma menor porcentagem de folículos com aspecto morfológico normal em todos os estágios avaliados em relação ao grupo fresco (CP: Primordial $p = 0,0036$; Primário $p = 0,048$; Secundário $p = 0,0385$ / SP: Primordial $p = 0,0157$; Primário $p = 0,0211$; Secundário $p = 0,0094$) (Tabela 1) (Figura 19). Quando comparados os dois grupos vitrificados, não foi observada diferença (Primordial $p = 0,8201$; Primário $p = 0,8139$; Secundário $p > 0,9999$) (Tabela 1) (Figura 19).

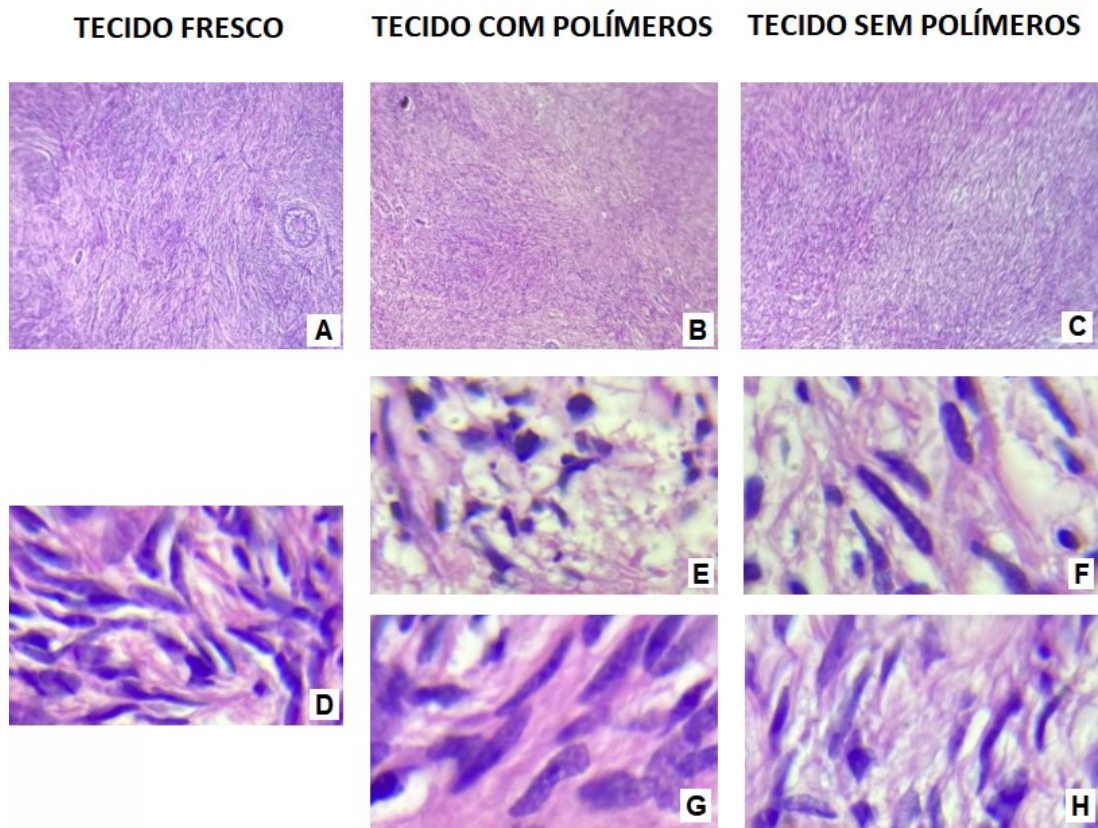


Figura 17. Fotomicrografias representativas do estroma do córtex ovariano bovino em menor 5x (Linha superior) e maior aumento 100x (linhas inferiores). A, D - Controle tecido fresco, estroma denso. B,E,G - Tecido vitrificado com polímeros. C, F, H - Tecido vitrificado sem polímeros. Nos tecidos vitrificados, com e sem o uso de polímeros, zonas com sinais de injúrias, com espaços vazios e menos densos.

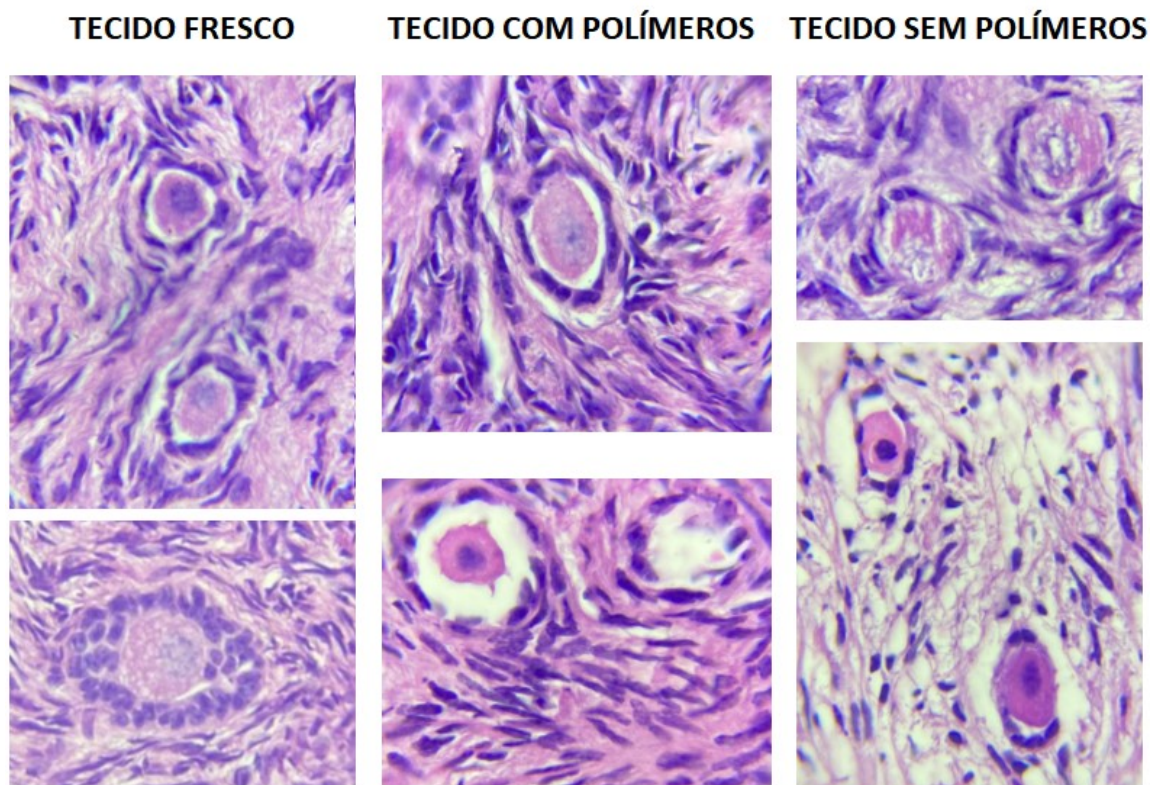


Figura 18. Fotomicrografias representativas de folículos pré-antrais. Tecido Fresco, Tecido Vitrificado com polímeros e sem polímeros respectivamente.

Tabela 1. Classificação e porcentagem de folículos morfolologicamente normais.					
	Total Pré-antrais	Primordiais	Primários	Secundários	Anormais
FRESCO	76 ± 2,8	53 ± 2,4	17 ± 1,5	6 ± 0,9	24 ± 2,8
COM POLÍMEROS	49,6 ± 2,7	36 ± 2,4	10 ± 0,8	3 ± 0,3	50 ± 2,7
SEM POLÍMEROS	53,7 ± 4,9	39 ± 4,2	11 ± 1,7	3 ± 0,4	46 ± 4,9

Média ± SEM

Tabela 1. Classificação e porcentagem de folículos morfolologicamente normais.

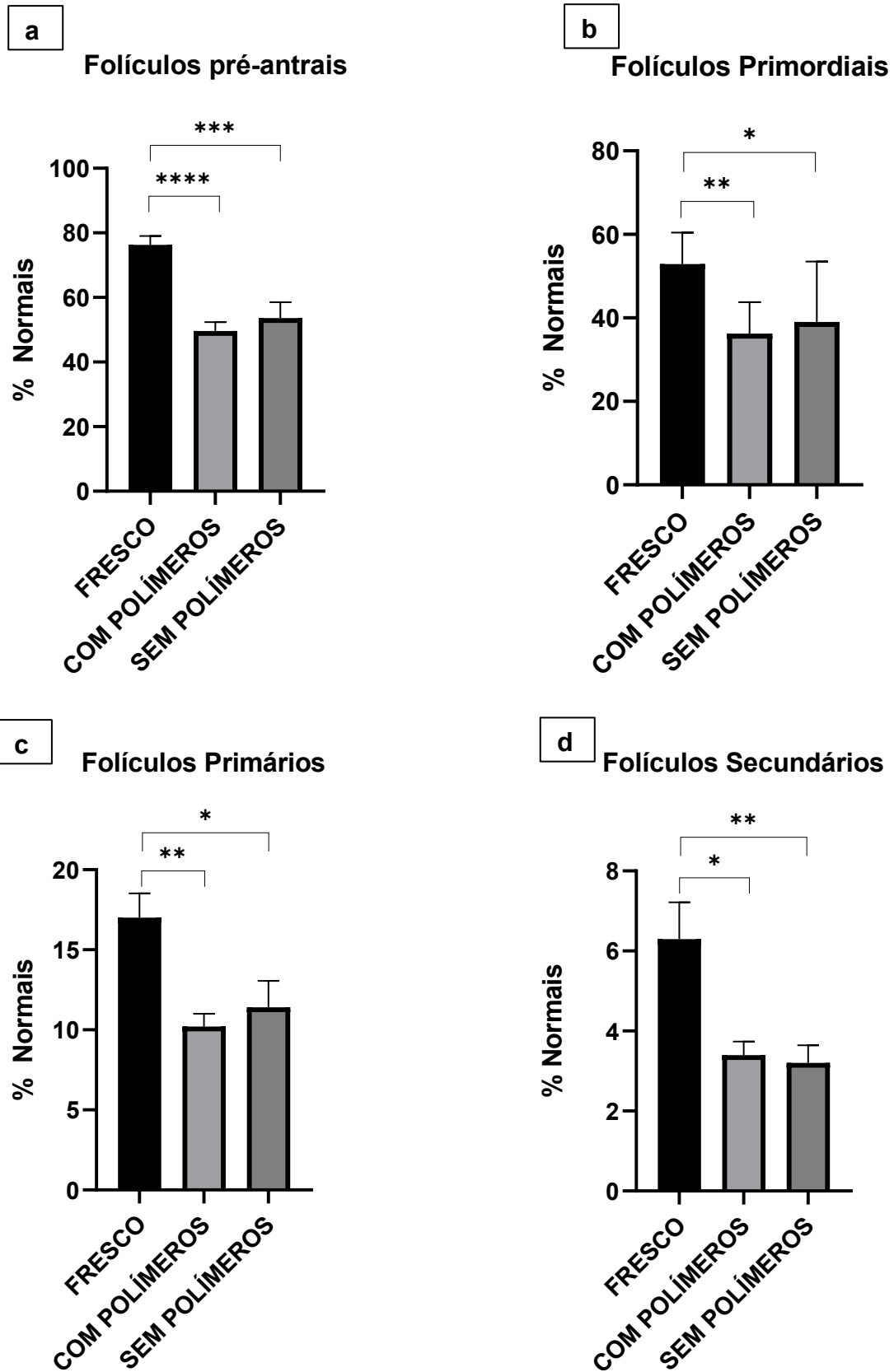


Figura 19. Porcentagem folicular pré-antral morfologicamente normal. a- Porcentagem de folículos primordiais. b- Porcentagem de folículos primários. c- Porcentagem de folículos secundários.

5.2 Avaliação do desenvolvimento folicular no cultivo 3D em matriz de alginato

5.2.1 Avaliação do desenvolvimento folicular *in vitro*: Isolamento folicular

Após o isolamento e encapsulamento dos folículos, o diâmetro folicular (μm) foi avaliado no mesmo dia e não houve diferença quanto ao tamanho dos folículos para início do cultivo nos 3 grupos (Fresco x CP $p = 0,0927$; Fresco x SP $p = 0,0714$; CP x SP $p > 0,9999$) (Figura 20).

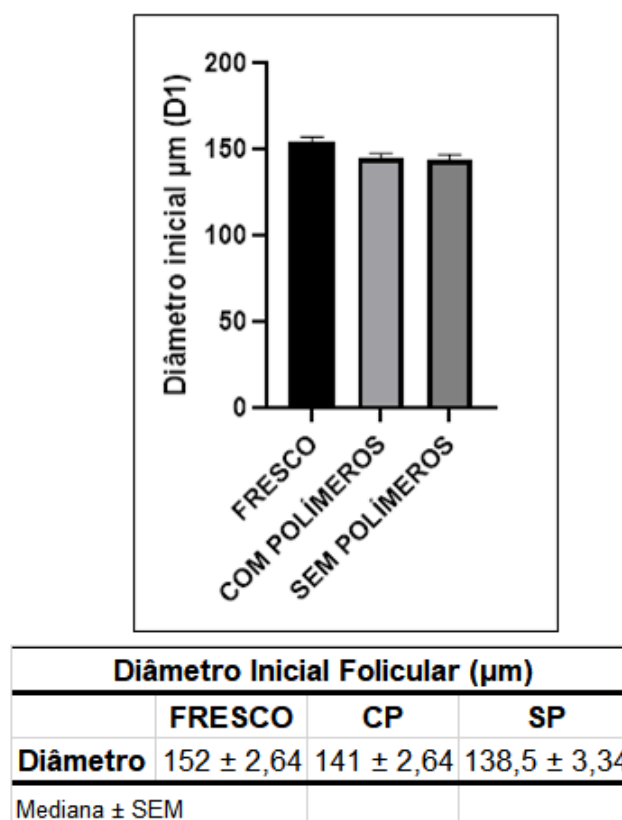


Figura 20. Diâmetro folicular após isolamento para cultivo, correspondente ao diâmetro do dia 1 de cultivo (D1).

A média de folículos isolados por animal no grupo fresco foi de $7,0 \pm 0,8$; no grupo CP foi de $3,9 \pm 0,8$ e no grupo SP foi de $3 \pm 0,7$. Os grupos de tecidos ovarianos submetidos a vitrificação tiveram um menor número de folículos extraídos quando comparado ao tecido fresco (Fresco x CP $p = 0,0224$; Fresco x SP $p = 0,0030$; CP x SP $p = 0,6914$), mas quando comparado o grupo CP com o SP não houve diferença durante o isolamento folicular (Gráfico não apresentado).

5.2.2 Avaliação do desenvolvimento folicular *in vitro*: Sobrevida Folicular

Para avaliação da viabilidade folicular após a criopreservação dos fragmentos de córtex ovariano, os folículos pré-antrais foram isolados e cultivados durante 15 dias.

A taxa de sobrevida encontrada foi de 94% no grupo fresco, 62% no grupo CP e 67% no grupo SP (Tabela 2). Quando comparados os três grupos, os folículos que passaram pela vitrificação apresentaram uma sobrevida similar entre si e menor que o controle fresco ($\chi^2(2) = 19,87$; $p < 0,0001$) (Figura 21). O número de folículos, suas taxas de sobrevida e formação de antro são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Sobrevivência e Formação de Antro

	Fresco	CP	SP
Média do número de folículos/animal (total)	7,0 ± 0,8 (70)	3,9 ± 0,8 (39)	3,0 ± 0,7 (30)
% Sobrevida (total)	94% (66)	62% (24)	67% (20)
% Formação de Antro (total)	89% (59)	79% (19)	85% (17)

Média ± SEM

Tabela 2. Sobrevivência e Formação de Antro.

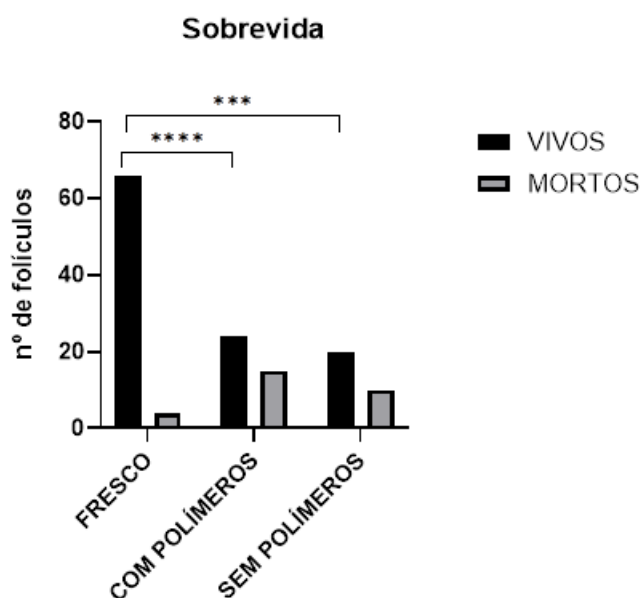


Figura 21. Sobrevida folicular – Grupos vitrificados sobreviveram menos que o grupo controle fresco.

5.2.3 Avaliação do desenvolvimento folicular *in vitro*: Formação de antro

Entre os folículos sobreviventes, a formação de antro foi observada em 89% (59) no grupo fresco, 79% (19) no grupo CP e 85% (17) no grupo SP (Tabela 2) (Figura 22). E não foi observada diferença entre os grupos ($\chi^2(1) = 0,6569$; $p = 0,4176$).

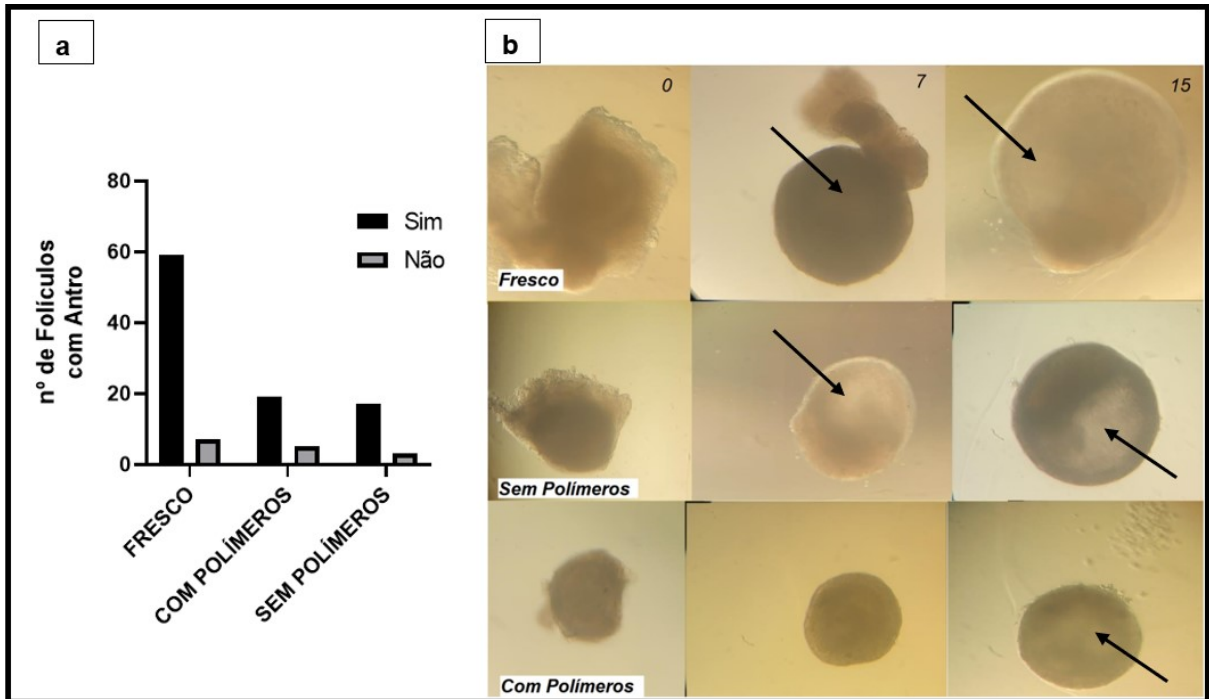


Figura 22. Cultivo Folicular. a - Formação de Antro Folicular – com semelhança entre os grupos. b- Fotomicrografias semanais da cultura 3D de folículos isolados. Os folículos de tecido fresco mostraram diâmetro aumentado ao longo dos dias com formação de antro (setas). Os folículos isolados dos tecidos vitrificados com adição (CP) e sem adição polímeros (SP) mostrou menor crescimento, mas com formação de antro na maior parte dos folículos.

5.2.4 Avaliação do desenvolvimento folicular *in vitro*: Crescimento

Os diâmetros foliculares foram semelhantes em todos os grupos no dia do isolamento ($p > 0,05$; $145 \pm 1,7 \mu\text{m}$). Os folículos de tecido fresco mostraram diâmetros aumentados durante a primeira semana de cultivo e continuaram a crescer até a segunda semana ($p < 0,0001$) (Figura 23b). Os diâmetros foliculares do grupo CP também aumentaram ($p = 0,0050$) durante a primeira semana e continuaram a crescer até o último dia de cultivo ($p < 0,0001$) (Figura 23c). No grupo SP os diâmetros dos folículos aumentaram apenas na primeira semana ($p = 0,0003$) e permaneceram com crescimento lento e não significativo até o fim do cultivo ($p = 0,2262$) (Figura 23d).

No entanto, na última semana os diâmetros dos folículos vitrificados mostraram um menor tamanho ($p < 0,0001$) quando comparados aos controles frescos. Mas não foi encontrada diferença de tamanho entre os folículos CP e SP no fim do cultivo (Figura 23a).

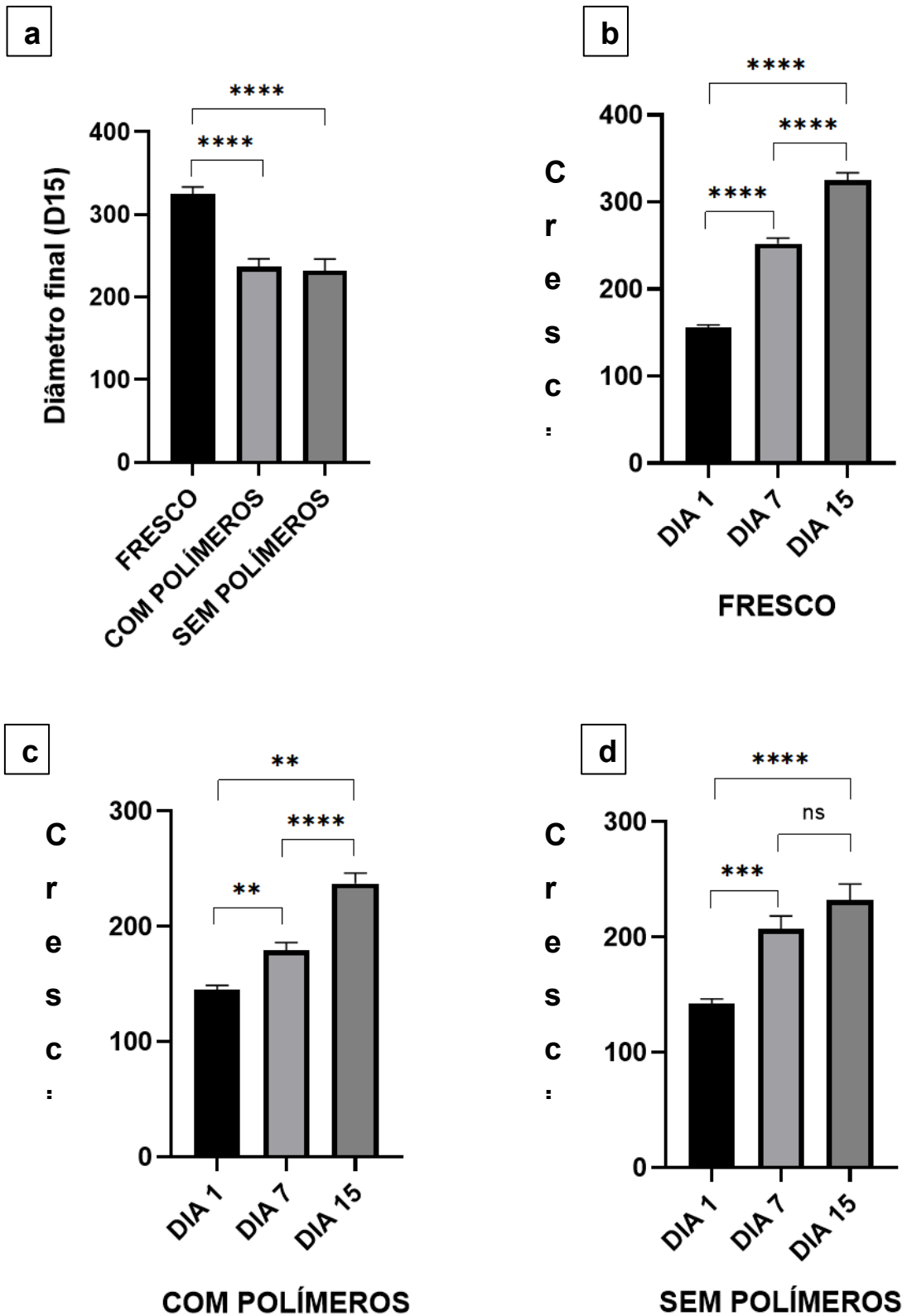


Figura 23. Diâmetro semanais dos folículos durante 15 dias em cultura 3D. Os dados são apresentados como média \pm SEM de folículos isolados que sobreviveram. a - Diâmetro final dos folículos. b- Diâmetro dos folículos frescos. c- Diâmetro dos folículos com polímeros. d- Diâmetro dos folículos sem polímeros. – Os folículos frescos e os CP cresceram durante todo cultivo, enquanto os SP pararam de crescer significativamente na última semana. * $p > 0,05$.

5.3 Dosagem hormonal do meio de cultivo

Para avaliação da função folicular após a criopreservação dos fragmentos de córtex ovariano, foram feitas dosagens hormonais do meio de cultivo nos dias 1, 7 e 15 (D1, D7, D15) dos folículos pré-antrais isolados (Figura 24).

A produção de E₂ pelo grupo de folículos frescos foi de 21 ± 1,5 pg/ml no dia 7 e continuou a aumentar ao longo da semana até o último dia de cultivo (57,6 ± 6,7 pg/ml) ($p = 0,0004$). Os folículos dos tecidos vitrificados produziram E₂, mas somente no CP foi observado aumento entre D7 e D15 (CP 15 ± 2,2 pg/ml e 26 ± 2,2 pg/ml - $p = 0,0050$ / SP 11 ± 4,4 pg/ml e 21,5 ± 3,3 pg/ml - $p = 0,1055$). Quando comparados aos folículos do tecido fresco, apenas os folículos do grupo SP tiveram uma menor produção de E₂ ($p = 0,0082$) no D7, enquanto os CP não apresentaram diferença ($p = 0,0713$). No fim do cultivo (D15), os folículos vitrificados apresentaram uma menor produção de E₂ ($p < 0,0001$) em relação aos frescos. Entre CP e SP não houve diferença relevante entre os dias.

Os folículos vitrificados, assim como os frescos, também mostraram aumento na produção de P₄ entre D7 e D15 do cultivo (Fresco D7 – 0,9 ± 0,24 e D15 – 8,8 ± 1,15 ng/ml $p = 0,0001$ / CP D7 – 0,6 ± 0,24 e D15 – 5,0 ± 0,93 ng/ml/ SP D7 – 1,6 ± 0,5 e D15 – 5,9 ± 1,00 ng/ml). Entretanto, no D15, a produção de P₄ de CP e SP foi menor comparada ao grupo fresco (CP $p = 0,0145$ e SP $p = 0,0479$), mas sem diferença entre eles ($p = 0,8595$).

Comparado ao fresco, os folículos SP e CP não apresentaram diferença na produção de P₄ em D7 (CP $p > 0,9999$ e SP $p = 0,3967$), mas SP produziu mais que os folículos CP ($p = 0,0445$).

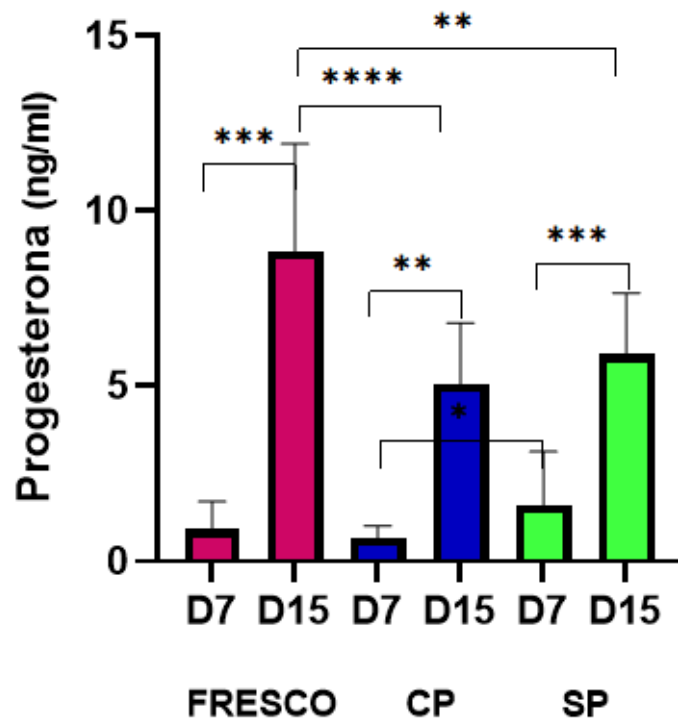
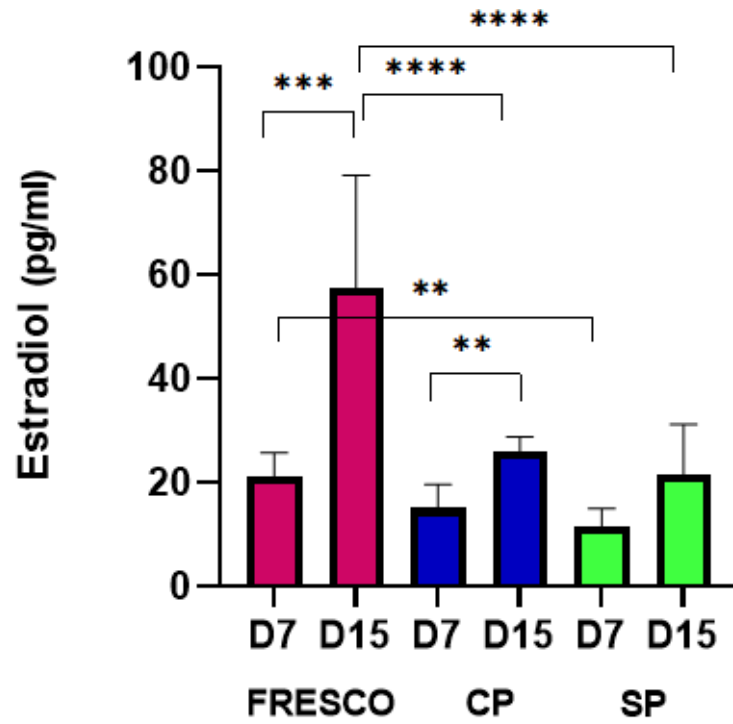


Figura 24. Produção de hormônio esteróide (E2 e P4) durante 2 semanas de cultivo folicular.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Tecido é o conjunto de células especializadas em diferentes composições celulares, líquidos e funções em um organismo. Criopreservar tecidos ou até órgãos é um processo complexo, que exige a combinação harmônica de diferentes fatores, quando comparado à preservação de células isoladas. A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica promissora para preservação da fertilidade e restauração da função endócrina feminina, principalmente para meninas pré-puberes e para mulheres que por algum motivo não podem ser submetidas às técnicas tradicionais (OKTAY *et al.*, 2021; SUZUKI *et al.*, 2015).

O presente estudo avaliou a aplicabilidade de polímeros sintéticos (X-1000, Z-1000 e PVP K12) na solução de vitrificação para criopreservação de tecido ovariano bovino, com a finalidade de testar a proteção dessa combinação nas estruturas e funcionalidade ovariana.

Os polímeros sintéticos já estão presentes e descritos em muitos produtos utilizados no cotidiano, como emulsificantes alimentares, gomas de mascar, produtos de higiene bucal, soluções intra-oculares, excipientes de medicamentos e cosméticos (EUROPEAN PATENT SPECIFICATION, 1992; GAFFAR, HUNTER e MIRAJKAR, 2002; DEBOTTON e DAHAN, 2017; ALHALAFI, 2017). Pesquisas também vêm tentando incorporar o uso desses polímeros na criopreservação, no alcance de aumentar a eficiência da técnica e reduzir os efeitos tóxicos dos crioprotetores (VOETS, 2017; JANG *et al.*, 2017).

Os protocolos de vitrificação dependem de diferentes condições para garantir a viabilidade da amostra, que podem variar do momento da coleta até o aquecimento do tecido (CASTRO *et al.*, 2011; BEST, 2015; MULLEN e FAHY, 2011).

O tempo e a temperatura de transporte são fatores que contribuem para o bom desempenho da técnica (CHENG *et al.*, 2021). Neste estudo, os ovários foram coletados, imersos em α MEM suplementado e transportados em uma caixa de isopor à temperatura de 15° a 20° C no prazo de 1 hora. Wang *et al.* (2011) avaliaram o efeito da temperatura de transporte na competência do ovário bovino e determinaram que a temperatura de 15 °C, por um período de 3 a 4 horas em solução salina, seria benéfica para a viabilidade dos oócitos. Shavsavari e colaboradores (2020) utilizaram uma temperatura de 20°C em 1 hora, em meio essencial mínimo e também obtiveram morfologia satisfatória. Entretanto, um estudo mais recente (CHENG *et al.*, 2021)

testou o procedimento utilizado na prática clínica para transporte de ovário humano e verificou que o armazenamento do tecido em solução de transplante de órgãos, na temperatura de 4 a 8 ° C por 24 a 48 horas, parece preservar melhor as amostras. Baixas temperaturas reduzem o metabolismo celular e o consumo de oxigênio, consequentemente estendendo a viabilidade dos tecidos e órgãos (BECKMANN *et al.*, 2019). De todo modo, a morfologia e a porcentagem de folículos normais do controle fresco no presente estudo parecem compatíveis com o estudo anterior em bovino (SHAHSAVARI *et al.*, 2020), o que confirma a eficiência do método que nós utilizamos para a coleta e o transporte das amostras.

A criopreservação e transplante de tecido do córtex ovariano é muito mais simples do que a conservação do ovário inteiro e sua revascularização (HOSSAY, DONNEZ, DOLMANS, 2020). O método de processamento do ovário para obtenção de fragmentos do córtex é frequentemente discutido na literatura (HERRAIZ *et al.*, 2020). Alguns kits disponibilizam um fatiador prático de tecido, para cortes com espessura de 1 mm (KITAZATO, 2021).

Kagawa *et al.* (2009) tentou estabelecer um protocolo completo e eficaz para a vitrificação de tecido ovariano bovino e humano, utilizando o método Cryotop. Os resultados mostraram que um dos pontos cruciais da técnica é a espessura da amostra de 0,75 a 1,0 mm. Com essa fina camada, é possível manter um número considerável de folículos primordiais e primários, os quais são mais resistentes à criopreservação, além de facilitar a permeação dos crioprotetores no tecido. Condizantemente, nossos resultados de contagem e classificação morfológica folicular apresentam distribuição predominante de folículos primordiais e primários em todos os grupos estudados (Tabela 1).

Outro estudo tentou vitrificar fragmentos teciduais maiores, a fim de aumentar a reserva de folículos pré-antrais criopreservados, contudo a densidade folicular e a função ovariana após o transplante não foram tão satisfatórias quanto o esperado (ZHAO *et al.*, 2019).

Após o processamento ovariano, os fragmentos são imersos inicialmente em soluções de equilíbrio, que contêm ACPs em concentrações gradativas para facilitar a permeação desses agentes no tecido, até chegar à solução final de vitrificação (SANFILIPPO *et al.*, 2015).

Parâmetros que envolvem o uso de crioprotetores para redução da toxicidade, como concentração, tipo, combinação e tempo de exposição são o ponto principal da

criobiologia (BEST, 2015; MULLEN e FAHY, 2011). No presente estudo, para vitrificar o tecido ovariano bovino nós utilizamos a combinação EG, glicerol e três polímeros sintéticos: X-1000, Z-1000 e PVP K12. Os tecidos foram expostos a soluções de equilíbrio no tempo de 5 minutos cada, seguido da solução de vitrificação com ou sem polímeros, conforme descrito em Ting *et al.* (2012 e 2013). Embora os resultados em macacos tenham alcançado uma melhor morfologia e viabilidade (TING *et al.* 2012 e 2013), morfologicamente, em bovinos, os tecidos vitrificados com ou sem polímeros sintéticos mostraram injúrias no estroma (Figura 17) e menor porcentagem de folículos normais comparados ao tecido fresco (Tabela 1). Aparentemente, os polímeros não foram suficientes para proteger a morfologia do córtex ovariano (Figura 17).

É possível que esses resultados contraditórios sejam devidos às diferenças entre espécies, soluções, bem como ao uso de diferentes sistemas de vitrificação. Em Ting *et al.* (2013), foi feito o uso do sistema fechado com uso de concentrações maiores de crioprotetores, os tecidos foram transferidos para palhetas com solução de vitrificação e as palhetas foram vedadas, deixadas em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos, seguido de imersão e armazenamento. Entretanto, a metodologia aplicada no presente trabalho foi a do sistema aberto, os fragmentos foram dispostos em uma tira fina de metal (papel alumínio) com um volume mínimo de solução, e submersos diretamente em nitrogênio líquido. Kagawa *et al.* (2009) mostraram resultados satisfatórios em bovinos e humanos com o método, mas com diferentes crioprotetores. Recentemente, Sugishita *et al.* (2021) utilizando EG + PVP, compararam os dois sistemas e não encontraram diferença na qualidade do tecido e folículos vitrificados, o que mostra a viabilidade de ambos dispositivos.

Para a melhor preservação do tecido ovariano, é comum que os ACPs intracelulares e extracelulares sejam combinados para diminuir a concentração utilizada dos agentes e assim reduzir o potencial tóxico (FAHY *et al.*, 2004; ALMANSOORI *et al.*, 2012). A permeabilidade de cada crioprotetor diminui à medida que o tamanho molecular aumenta, de modo que o glicerol e o PROH permeiam mais lentamente que o DMSO e EG. Já em misturas, esses solutos se comportam de maneira diferente (HAN *et al.*, 2019). Ting *et al.* (2013) testaram as combinações de 51% de EG+DMSO e 54% de GLI+EG mais o uso de polímeros, contudo mesmo a primeira combinação sendo mais permeável a viabilidade dos folículos e do tecido ovariano foi pior. Xiao *et al.* (2010) testaram em humanos diferentes concentrações de EG+DMSO com ou sem a adição de sacarose durante a vitrificação. O estudo

mostrou que o uso de menores concentrações de crioprotetores e adição de sacarose, a ultraestrutura das células da granulosa e o estroma foi melhor preservado, enquanto nos folículos primordiais a incidência de apoptose diminui.

LUCCI *et al.* (2002) relataram que tecido ovariano bovino criopreservado em concentração de 10% de glicerol reteve uma porcentagem maior de folículos morfologicamente normais do que o tecido congelado em 20% de glicerol ou nas concentrações de 1,5M ou 3M de EG. Mas é preciso considerar que a técnica de congelamento lento apresenta resultados piores em relação à vitrificação (LUCCI *et al.*, 2002).

No presente estudo, para avaliar a viabilidade e funcionalidade do tecido ovariano vitrificado com o uso de polímeros, os folículos foram isolados mecanicamente e cultivados. Esse método de isolamento mantém as camadas da teca, o que melhora a qualidade do folículo comparado ao isolamento enzimático, o qual pode danificar os oócitos, especialmente em folículos pré-antrais (SAHA *et al.*, 2012).

Os tecidos CP e SP tiveram uma menor quantidade de folículos extraídos durante o isolamento (Tabela 2). As amostras vitrificadas apresentavam estroma mais firme e folículos mais sensíveis a microdissecação, rompendo-se facilmente, talvez pelo elevado percentual de folículos anormais visualizados na morfologia por HE. A microdissecação fornece uma boa qualidade de isolamento folicular, mas comparada a outros métodos pode ter um rendimento mais baixo (SAHA *et al.*, 2012).

Além disso, a população de folículos pré-antrais e o número de folículos isolados podem ser afetados por diferentes fatores, como raça, espécie, idade e tratamentos. A diferença entre espécies pode ser relacionada a diferença na composição ovariana. Estromas mais fibrosos podem ser mais difíceis de isolar (LUCCI *et al.*, 2002).

Vanacker *et al.* (2013) avaliaram a viabilidade de folículos pré-antrais criopreservados antes e depois do isolamento. Na publicação, relatam que não encontraram diferença no número de folículos extraídos dos dois grupos, mas que esses resultados são inesperados, já que tiveram dificuldades no isolamento. Os autores atribuem o sucesso dos dados ao isolamento enzimático utilizando liberase DH, pois a enzima parece não prejudicar a membrana basal dos folículos primordiais e primários (VANACKER *et al.*, 2013).

Assim, considerando o menor número de folículos isolados, o método enzimático pode ser uma boa opção para extração folicular do tecido criopreservado, com rendimento comparável ao do tecido fresco (WIWEKO, MUTIA e MANSYUR, 2013).

Durante o cultivo dos folículos pré-antrais, foi analisada a sobrevivência, o crescimento e a formação de antro (Tabela 2). Os folículos do grupo de vitrificados morreram mais comparados ao grupo fresco e a adição de polímeros não teve diferença na sobrevivência *in vitro*. Entretanto, a formação de antro foi vista igualmente para todos os grupos.

Guedes e colaboradores (2017) avaliaram o impacto da vitrificação na viabilidade de folículos bovinos utilizando a cultura tridimensional *in vitro*. Os crioprotetores permeáveis e os protocolos utilizados foram os mesmos deste trabalho, mas em concentrações diferentes e sem o uso de polímeros. Guedes *et al.* (2017) não encontraram diferença na sobrevivência e formação de antro entre os folículos frescos e vitrificados, mas relataram quase 50% de discrepância entre as taxas. Os autores também descreveram a maior fragilidade dos folículos vitrificados e a dificuldade de sua remoção, o que explicou o menor número de folículos extraídos nesse grupo.

Nos grupos fresco e CP, foi observado crescimento folicular contínuo ao longo do cultivo. No entanto, os folículos SP cresceram minimamente na última semana, mas sem diferença relevante do diâmetro final dos CPs (Figura 23). Como esperado, o grupo folicular fresco cresceu mais e obteve maior diâmetro que o grupo vitrificado (Figura 23).

O uso de polímeros melhora a vitrificação de tecido ovariano, sem aumentar a toxicidade quando usado em baixas concentrações e parece ser um agente inibidor de gelo altamente eficaz (TING *et al.*, 2012; MULLEN e FAHY, 2011). Contudo, são poucos os trabalhos que testaram a combinação desses agentes em uma mesma solução de vitrificação para análise de efetividade, viabilidade e funcionalidade do tecido (TING *et al.*, 2012; TING *et al.*, 2013).

A princípio, este trabalho parece ser o primeiro a testar a aplicabilidade da mistura de polímeros sintéticos neste protocolo de vitrificação para tecido ovariano bovino. Outros trabalhos testaram a aplicabilidade de polímeros em bovinos e caprinos (VIZCARRA *et al.*, 2020; SHAHSAVARI *et al.*, 2020), mas a avaliação foi feita individualmente para cada agente. É importante entender o impacto de cada polímero no processo de criopreservação, assim é possível identificar fatores importantes que

influenciam a probabilidade de um resultado bem-sucedido (SHAHSAVARI *et al.*, 2020).

Em caprinos e bovinos, foi encontrado um maior percentual de folículos morfologicamente normais e uma melhora na vitrificação das amostras com X-1000 (PVA) (VIZCARRA *et al.*, 2020; SHAHSAVARI *et al.*, 2020) em relação as PVP e Z-1000 (poliglicerol). Em camundongos, a adição de supercool X-1000 permitiu o uso de menores concentrações de crioprotetores (TAN *et al.*, 2012). Os resultados para Z-1000 sozinho sugerem que esse polímero é ineficaz durante a vitrificação, pois haveria formação de um filme ao redor do fragmento, o que pode prejudicar a remoção do ACP e a perfusão de elementos importantes para o cultivo *in vitro* do tecido (SHAHSAVARI *et al.*, 2020).

Em um estudo, o PVP usado em cães na vitrificação de tecido ovariano preservou a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento dos folículos primordiais quando associado ao DMSO (FUJIHARA, KANEKO, INOUE-MURAYAMA, 2019). Em humanos, além do DMSO, o PVP foi combinado ao PrOH e EG, resultando em uma boa integridade morfológica do estroma durante a vitrificação (KERON *et al.*, 2009). Contudo, Vizcarra e seu grupo (2020) relatam que não alcançaram resultados satisfatórios na morfologia e cultivo tecidual utilizando PVP ou Z-1000 isolados.

Embora o uso dos polímeros sintéticos não tenha alcançado a proteção esperada na morfologia do tecido ovariano, a dosagem de hormônios esteroidais do meio de cultivo dos folículos CP mostrou a viabilidade e funcionalidade dos folículos sobreviventes, que além de crescer e formar antro, produziram estradiol e progesterona (E_2 e P_4) ao longo do cultivo. A produção de E_2 no grupo CP não foi diferente do grupo fresco na primeira semana, mas na última os valores foram menores, enquanto o SP teve os níveis reduzidos em todo o cultivo. Ainda assim, a dosagem final de E_2 entre os grupos vitrificados não teve diferença. A produção de P_4 nos folículos vitrificados foi gradativa ao longo do cultivo e sem diferença na primeira semana em relação ao fresco. Contudo, a dosagem final de E_2 e P_4 foi maior nos folículos frescos (Figura 24). A produção de hormônios esteróides condiz com o crescimento e formação de antro dos folículos pré-antrais (HULSHOF *et al.*, 1995), portanto nossos achados indicam que a vitrificação manteve a função folicular *in vitro*.

No presente estudo, apenas no grupo fresco foram observados alguns folículos de crescimento rápido, enquanto os vitrificados apresentaram em sua maioria

crescimento lento ou ausência de crescimento. A produção de estradiol e progesterona pelos tecidos cultivados *in vitro* após a criopreservação sugere que as células da granulosa se mantiveram viáveis, embora a produção hormonal estivesse baixa em comparação com o tecido fresco. Esses dados podem condizer com o crescimento aparentemente atrasado dos folículos submetidos à vitrificação, comparados aos controles frescos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas diferentes fases experimentais desta tese, permitem concluir que:

- a) O uso de polímeros sintéticos não parece proteger a morfologia dos fragmentos de tecido ovariano após a vitrificação, por produzir resultados similares ao protocolo sem a adição desses agentes, com baixo percentual de folículos pré-antrais normais.
- b) A vitrificação utilizada (EG+GLI) parece prejudicar a sobrevivência dos folículos no cultivo *in vitro*. E o uso de polímeros sintéticos parece não ser suficiente para evitar esses danos.
- c) A vitrificação não prejudicou a formação de antro folicular *in vitro* independentemente do grupo. Contudo, o uso de polímeros não apresentou vantagens sobre a vitrificação sem adição de polímeros.
- d) Existe um atraso no crescimento e na produção dos níveis hormonais foliculares durante o cultivo dos grupos vitrificados, mas há proliferação das células da granulosa e da teca, condizentes com a produção de E₂ e P₄.
- e) A combinação do uso de polímeros sintéticos na vitrificação de tecido ovariano bovino é uma técnica promissora, com potencial de proteção do desenvolvimento folicular pré-antral durante a criopreservação. Porém, são necessários mais estudos que possam aperfeiçoar esse protocolo e validar a proteção combinada desses polímeros em bovinos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABIR, R. et al. Ovarian minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 2, p. 255–260, fev. 2014. PMID: 24365024.

ADICEL TRAY TECNOLOGIA. Propilenoglicol - 1kg. Disponível em: <<https://www.adicel.com.br/aditivos-alimenticios/propilenoglicol-1kg>>. Acesso em: 22 dez. 2021.

ALHALAFI, A. Applications of polymers in intraocular drug delivery systems. **Oman Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 1, p. 3, 2017. PMID: 28298856.

ALMANSOORI, K. A. et al. Cryoprotective agent toxicity interactions in human articular chondrocytes. **Cryobiology**, v. 64, n. 3, p. 185–191, jun. 2012. PMID: 22274740.

AMORIM, C. A. et al. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 2, p. 160–186, ago. 2011. PMID: 21676653.

ANDERSEN, C.Y.; MAMSEN, L. S.; KRISTENSEN, S. G. FERTILITY PRESERVATION: Freezing of ovarian tissue and clinical opportunities. **Reproduction**, v. 158, n. 5, p. F27–F34, nov. 2019. PMID: 31284266.

ANDERSON, R.A; WALLACE, W.H.B. Fertility preservation in girls and young women. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 75, n. 4, p. 409 -19, 2011. PMID: 21575025.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 96–102, jan. 2014. PMID: 24274414.

ARAV, A.; NATAN, Y. The Near Future of Vitrification of Oocytes and Embryos: Looking into Past Experience and Planning into the Future. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 182–187, 2019. PMID: 31244586.

ARGYLE, C. E.; HARPER, J. C.; DAVIES, M. C. Oocyte cryopreservation: where are we now? **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 440–449, 22 mar. 2016. PMID: 27006004.

American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 112, n. 6, p. 1022–1033, dez. 2019.

BANG, J.K. et al. Antifreeze peptides and glycopeptides, and their derivatives: potential uses in biotechnology. **Mar Drugs**, v. 11, n. 6, p. 2013 – 2041, 2013. PMID: 23752356.

BAERWALD, A. R. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 20–29, 2009.

BECKMANN, M. et al. Concept Paper on the Technique of Cryopreservation, Removal and Transplantation of Ovarian Tissue for Fertility Preservation. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 79, n. 01, p. 53–62, 9 out. 2019. PMID: 30686834.

BEST, B. P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, n. 5, p. 422–436, out. 2015. PMID: 25826677.

BIGGS, C.I. et al. Polymer mimics of biomacromolecular antifreezes. **Nature Communications**, v. 16, n. 8, p 1546, nov 2017. PMID: 29142216.

BIZARRO-SILVA, C. et al. Interval in the replacement of in vitro culture medium affects the integrity and development of equine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 2284–2288, dez. 2018.

BULGARELLI, D. L. et al. Development of macaque secondary follicles exposed to neutral red prior to 3-dimensional culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 1, p. 71–79, 21 set. 2017. PMID: 28936565.

BUNGE, R. G.; SHERMAN, J. K. Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. **Nature**, v. 172, n. 4382, p. 767–768, out. 1953. PMID: 13111181.

CARDOSO, C. A. Utilização da quimioluminescência na determinação das concentrações séricas de progesterona, hormônios luteinizantes e folículo estimulante em novilhas holandesas. 2018.

CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta sci. vet. (Online)**, p. 1–17, 2011.

CELESTINO, J.J.H. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Anim Reprod Sci**, v.108, n. 3-4, p. 309 – 318. 2008.

CHANG, A. Y. et al. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Public Health**, v. 4, n. 3, p. e159–e167, mar. 2019. PMID: 30851869; PMCID: PMC6472541.

CHANG, H. J. et al. Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 37, n. 8, p. 1092–1101, 19 abr. 2011. PMID: 21501331.

CHENG, J. et al. Long-time low-temperature transportation of human ovarian tissue before cryopreservation. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 43, n. 2, p. 172–183, ago. 2021. PMID: 34183267.

CHERUKURL, S. R., MANSUKHANL, G. Polyvinylacetate bubble gum base composition. Proprietor: WARNER-LAMBERT COMPANY. Representative: JONES, Michael Raymond. US 846690. Publication: 0 242 325 B1. Date of filing: March, 27, 1987. Date publication: August, 19, 1992.

DEBENEDETTI, P. G.; STILLINGER, F. H. Supercooled liquids and the glass transition. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 259–267, mar. 2001. PMID: 11258381.

DEBOTTON, N.; DAHAN, A. Applications of Polymers as Pharmaceutical Excipients in Solid Oral Dosage Forms. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 1, p. 52–97, 9 ago. 2017.

DELLER, R. C. et al. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, 3 fev. 2014. PMID: 24488146.

DOLMANS, M.-M.; DONNEZ, J. Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 70, p. 63–80, jan. 2021. PMID: 32800711.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 624–712, 1 out. 2009. PMID: 19776209.

EL CURY-SILVA, T. et al. Cryoprotectant agents for ovarian tissue vitrification: Systematic review. **Cryobiology**, ago. 2021. PMID: 34370991.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74–91, jun. 2017. PMID: 28428046.

FAHY, G. M. et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 22–35, fev. 2004. PMID: 14969679.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, n. 1, p. 1–13, fev. 1986. PMID: 3956226.

FAHY, G. M.; WOWK, B. Principles of Cryopreservation by Vitrification. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 21–82, 14 nov. 2014. PMID: 25428002.

FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020. PMID: 31760966

FUENTES, A. C. et al. Cancer Survivor's History and Physical. **Southern Medical Journal**, v. 110, n. 1, p. 37–44, jan. 2017. PMID: 28052173.

FUJIHARA, M.; KANEKO, T.; INOUE-MURAYAMA, M. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 8 mar. 2019. PMID: 30850725.

GAFFAR, A., HUNDER, C.M., MIRAJKAR, Y.R.K. Applications of polymers in dentifrices and mouthrinses. **The Journal of clinical dentistry**, v. 13, n. 4, 2002. PMID: 12116724.

GANDOLFI, F. et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertil Steril**, v. 85, suppl 1, p. 1150 – 1156, 2006. PMID: 16616087.

GASPERIN, SALES e VASCONCELOS. Biotecnias aplicadas a reprodução assistida animal e a humana. Cap. 3, p37-40, 2021 – Editora Gen 3ª edição.

GLOBOCAN. **Estimated cumulative risk of mortality in 2020, cervix uterine, ages 0-74**, 2021. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>.

GOOK, D. A. History of oocyte cryopreservation. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 3, p. 281–289, set. 2011.

GORRICO, C. M. et al. Vitrification of cat ovarian tissue: Does fragment size matters? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 125–132, nov. 2018. PMID: 30474327.

GOSDEN, R. G. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. **Human Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 597–603, abr. 1994. PMID: 8046009.

GUEDES, J. et al. Follicle Viability after Vitrification of Bovine Ovarian Tissue. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 39, n. 11, p. 614–621, 31 ago. 2017. PMID: 28859209.

HAINO, T. et al. Determination of Follicular Localization in Human Ovarian Cortex for Vitrification. **Journal of Adolescent and Young Adult Oncology**, v. 7, n. 1, p. 46–53, fev. 2018. PMID: 28846463.

HAN, J. et al. Spectroscopic monitoring of transport processes during loading of ovarian tissue with cryoprotective solutions. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 30 out. 2019. PMID: 31666561.

HARADA, M.; OSUGA, Y. Fertility preservation for female cancer patients. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 1, p. 28–33, 3 mar. 2018. PMID: 29502284.

HARP, R. et al. Cryopreservation of Murine Ovarian Tissue. **Cryobiology**, v. 31, n. 4, p. 336–343, ago. 1994.

HE, Y. et al. Comparison of Bovine Small Antral Follicle Development in Two- and Three-Dimensional Culture Systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. suppl 2, 2020. PMID: 33146258.

HERRAIZ, S. et al. Optimizing ovarian tissue quality before cryopreservation: comparing outcomes of three decortication methods on stromal and follicular viability. **Fertility and Sterility**, v. 113, n. 3, p. 609-617.e3, mar. 2020. PMID: 32192593.

HERRAIZ, S.; DIAZ-GARCIA, C.; PELLICER, A. Ovarian Tissue Cryopreservation: Slow Freezing. **Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation**, p. 53–77, 2016.

HOSSAY, C.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Whole Ovary Cryopreservation and Transplantation: A Systematic Review of Challenges and Research Developments in Animal Experiments and Humans. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 3196, 2 out. 2020. PMID: 33023111.

HOVATTA, O. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. **Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1268–1272, 1 jun. 1996. PMID: 8671438.

HULSHOF, S. C. J. et al. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, n. 2, p. 217–226, jul. 1995. PMID: 16727721.

HUSSEIN, R. S.; KHAN, Z.; ZHAO, Y. Fertility Preservation in Women: Indications and Options for Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 95, n. 4, p. 770–783, abr. 2020. PMID: 32247351.

IBGE. **Agência IBGE notícias**, 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29502-em-2019-expectativa-de-vida-era-de-76-6-anos>

INCA. Estimativa 2020. **Ministério da Saúde**, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

INCA. Gestor e Profissional de Saúde Conceito e Magnitude. p. 20–21, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>.

ISACHENKO, V. et al. **Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into nitrogen: Ingenta Connect**. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2002/00000023/00000005/art00008>>. Acesso em: 27 dez. 2021. PMID: 12447493.

IUSSIG, B. et al. A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 98, n. 5, p. 550–558, 25 mar. 2019. PMID: 30739329.

JANG, T. H. et al. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12–18, mar. 2017. PMID: 28462139.

MORRIS, J.G.; ACTON, E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 85–92, abr. 2013. PMID: 23246475.

Junqueira, Luiz Carlos Uchoa; Carneiro, José. *Histologia Básica - Texto & Atlas – 13ª edição*. Guanabara koogan. Edição do Kindle.

Kagawa, N.; Silber, S.; Kuwayama, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reprod Biomed Online**, v. 18, n. 4, p. 568 – 577, 2009. PMID: 19401001.

KAMEL, R. M. Assisted reproductive technology after the birth of louise brown. *J Reprod Infertil*. 2013 Jul;14(3):96-109. PMID: 24163793.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, n. 7, p. 1670–1683, 9 abr. 2009. PMID: 19359339.

KIM, E. J. et al. Comparison of Follicle Isolation Methods for Mouse Ovarian Follicle Culture In Vitro. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 8, p. 1270–1278, 7 nov. 2017. PMID: 29113581.

KONC, J. et al. Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014. PMID: 24779007; PMCID: PMC3980916.

KORRAPATI, M. C.; SHANER, B. E.; SCHNELLMANN, R. G. Recovery from Glycerol-Induced Acute Kidney Injury Is Accelerated by Suramin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, n. 1, p. 126–136, 6 jan. 2012. PMID: 22228809.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73–80, jan. 2007. PMID: 17055564.

LANGBEEN, A. et al. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 477–489, set. 2015. PMID: 25981885.

LANGBEEN, A. et al. Effects of neutral red assisted viability assessment on the cryotolerance of isolated bovine preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 12, p. 1727–1736, 2 out. 2014. PMID: 25273277.

LEE, S. et al. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3346, 8 jul. 2019. PMID: 31288388.

LEIBO, S. P.; SZTEIN, J. M. Cryopreservation of mammalian embryos: Derivation of a method. **Cryobiology**, v. 86, p. 1–9, fev. 2019. PMID: 30677413.

LEONEL, E. C. R. et al. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, dez. 2019. PMID: 31882972.

LIEBENTHON, J.; MONTAG, M. Cryopreservation and Thawing of Human Ovarian Cortex Tissue Slices. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 485–499, 15 ago. 2020. PMID: 32797429.

LIMA-VERDE, I.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese Influence of steroid hormones on folliculogenesis. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, n. 4, p. 472–482, [s.d.].

LOGAN, S.; ANAZODO, A. The psychological importance of fertility preservation counseling and support for cancer patients. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 98, n. 5, p. 583–597, 21 mar. 2019.

COSTA, L. et al. Caracterização estrutural do hormônio folículo estimulante e seu papel na fisiologia de células ovarianas (Structural Characterization of the Follicle Stimulating Hormone and its role in the physiology of ovarian cells). *Ciência Animal*, v. 24, n. 1, p. 11–23, 2014.

LUCCI, C. M. et al. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1101–1114, abr. 2004. PMID: 15036998.

LUCCI, C. M. et al. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1467–1483, mar. 2002. PMID: 12054205.

LUSSIG, B. et al. A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 98, n. 5, p. 550-558, may. 2019. PMID: 30739329.

MAKISHI, F.; FARIA, J.T.; PINTO, M.S. **UTILIZAÇÃO DO DIETILENOGLICOL NA INDÚSTRIA DE BEBIDAS**, 2020. Disponível em: https://www.ica.ufmg.br/wp-content/uploads/2020/01/NOTA-TEC_UTILIZA%C3%87%C3%83O-DO-DIETILENOGLICOL-NA-IND%C3%91ASTRIA-DE-BEBIDAS.pdf.

MARCO-JIMENEZ F. et al. Generation of live offspring from vitrified embryos with synthetic polymers SuperCool X-1000 and SuperCool Z-1000. *Cryo Letters*. 2014 Jul-Aug;35(4):286-92. PMID: 25282495.

MARIN, L. et al. History, Evolution and Current State of Ovarian Tissue Auto-Transplantation with Cryopreserved Tissue: a Successful Translational Research Journey from 1999 to 2020. **Reproductive Sciences**, v. 27, n. 4, p. 955–962, 6 jan. 2020. PMID: 32046442.

MARKSTROM, E. et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, p. 23–30, 1 jan. 2002. PMID: 11869183.

MATSUMURA, K. et al. Molecular mechanisms of cell cryopreservation with polyampholytes studied by solid-state NMR. **Communications Materials**, v. 2, n. 1, 9 fev. 2021.

MBEMYA, G. T. et al. Supplementation of in vitro culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208760, 7 dez. 2018. PMID: 30532263.

MCGANN, L. E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 15, n. 4, p. 382–390, ago. 1978. PMID: 81120.

MIHM, M.; GANGOOLY, S.; MUTTUKRISHNA, S. The normal menstrual cycle in women. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 229–236, abr. 2011. PMID: 20869180.

MØBJERG, N. et al. Survival in extreme environments - on the current knowledge of adaptations in tardigrades. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 3, p. 409–420, 22 mar. 2011. PMID: 21251237.

VIZCARRA, D.A.M. et al. Use of synthetic polymers improves the quality of vitrified caprine preantral follicles in the ovarian tissue. **Acta Histochemica**, v. 122, n. 2, p. 151484, fev. 2020. PMID: 31902536.

MULLEN, S. F.; FAHY, G. M. Fundamental aspects of vitrification as a method of reproductive cell, tissue and organ cryopreservation. *Principles and Practice of Fertility Preservation*, p. 145–163, 2011.

Organização Mundial da saúde. Mulheres saúde mulheres saúde evidências de hoje agenda de amanhã. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.who.int/eportuguese/publications/Mulheres_Saude.pdf>.

NAMAZI, M.; SADEGHI, R.; BEHBOODI MOGHADAM, Z. Social Determinants of Health in Menopause: An Integrative Review. **International Journal of Women's Health**, v. Volume 11, p. 637–647, dez. 2019. PMID: 31849539.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 9843407, Polyglycerol polyricinoleate. Disponível em: from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyglycerol-polyricinoleate>. Acessado em: 20 de Dezembro de 2021.

NIKIFOROV, D. et al. Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method. **Journal of Ovarian Research**, v. 11, n. 1, 7 ago. 2018. PMID: 30086787.

OKTAY, K. H. et al. Delaying Reproductive Aging by Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation: Is it Prime Time? **Trends in Molecular Medicine**, v. 27, n. 8, p. 753–761, ago. 2021. PMID: 33549473.

Ovarian Tissue Vitrification - Kitazato IVF. Disponível em: <<https://www.kitazato-ivf.com/vitrification/ovarian-tissue-vitrification/>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

PAYNTER, S. J. et al. Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the cryoprotectant dimethylsulphoxide. **Human Reproduction**, v. 14, n. 9, p. 2338–2342, set. 1999. PMID: 10469706.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 39–57, 2007. PMID: 18080461.

PENG, L. Ovarian tissue freezing and activation after thawing: an update. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 26, n. 1, 2 abr. 2021.

PICTON, H.M. Preservation of female fertility in humans and animal species. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 301-309, 2018. PMID: 34178153.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666–666, out. 1949. PMID: 18143360.

POLGE, C. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. **Nature**, v. 169, n. 4302, p. 626, apr. 1952. PMID: 14929257.

PVP K-12 – Ashland. Product data. Disponível em: https://www.brenntag.com/media/documents/bsi/product_data_sheets/material_science/ashland_polymers/pvp_k-12_polymer_pds.pdf.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. **Nature**, v. 313, n. 6003, p. 573–575, fev. 1985. PMID: 3969158.

LEONEL, E.R; LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 173–181, 2019.

ROBINSON, C.A. The cryopreservation of human semen, and subsequent evaluation of a commercially-available device to isolate motile evaluation of a commercially-available device to isolate motile sperm sperm, 2018.

ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v. 21, n. 2, p. 125–128, 2 may 2012. PMID: 22717039.

ROVANI, M. T. et al. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. *Animal Reproduction*, v. 14, n. 2, p. 383–391, 2017.

SAHA, S. et al. Comparison of enzymatic and mechanical methods for the collection of bovine preantral follicles. **Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 155–161, fev. 2002.

SALAMA, M. et al. Installing oncofertility programs for common cancers in limited resource settings (Repro-Can-OPEN Study): An extrapolation during the global crisis of Coronavirus (COVID-19) pandemic. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 37, n. 7, p. 1567–1577, 27 jun. 2020. PMID: 32594284.

SÁNCHEZ, M. et al. Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results. **Human Reproduction**, v. 22, n. 3, p. 786–791, 26 set. 2006. PMID: 17110398.

SANFILIPPO, S. et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, 25 jun. 2015. PMID: 26109179.

SANTOS, K.J.G. et al. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **PUBVET**, v. 6, n. 36, ed. 223, p.1483, 2012.

SANTOS, T. **Fisiologia do ovário e da fecundação**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.fspog.com/fotos/editor2/cap_03.pdf>.

SANTUCCI, C. et al. Progress in cancer mortality, incidence, and survival: a global overview. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 29, n. 5, p. 367–381, 22 maio 2020. PMID: 32740162.

SCHIEWE, M.; ANDERSON, R. Vitrification: the pioneering past to current trends and perspectives of cryopreserving human embryos, gametes and reproductive tissue. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, v. Volume 5, p. 57–68, set. 2017.

SHAHSAVARI, M. H. et al. Impacts of different synthetic polymers on vitrification of ovarian tissue. **Cryobiology**, v. 94, p. 66–72, jun. 2020. PMID: 32339491; PMCID: PMC7660932.

SHI, Q. et al. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 17 ago. 2017. PMID: 28819292.

SOARES, M. et al. Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients. **British Journal of Haematology**, v. 178, n. 2, p. 231–239, 17 abr. 2017. PMID: 28419412.

SOARES, P. H. A.; JUNQUEIRA, F. S. Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. *Pubvet*, v. 13, n. 1, p. 1–6, jan. 2019.

SUGISHITA, Y. et al. Comparison of open and a novel closed vitrification system with slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 10, p. 2723–2733, 16 ago. 2021. PMID: 34398400.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 fev. 2021. PMID: 33538338.

SUZUKI, N. et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, n. 3, p. 608–615, 6 jan. 2015. PMID: 31438999.

SZTEIN, J. M.; TAKEO, T.; NAKAGATA, N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 82, p. 57–63, jun. 2018. PMID: 29660317.

TAN, X. et al. Successful vitrification of mouse ovaries using less-concentrated cryoprotectants with Supercool X-1000 supplementation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 48, n. 2, p. 69–74, 11 jan. 2012. PMID: 22234481.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523–1533, maio 2013. PMID: 23635350.

TING, A. Y. et al. Synthetic polymers improve vitrification outcomes of macaque ovarian tissue as assessed by histological integrity and the in vitro development of secondary follicles. **Cryobiology**, v. 1, p 1–11, 2012. PMID: 22569078

TING, A. Y. et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267–1279, 20 fev. 2013. PMID: 23427232.

VAJTA, G. Vitrification in ART: past, present, and future. **Theriogenology**, v. 150, p. 276–279, jul. 2020. PMID: 32164991.

VANACKER, J. et al. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 5, p. 1363-1368.e2, abr. 2013. PMID: 23375199.

VEGETTI, W.; ALAGNA, F. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 6, p. 684–694, jan. 2006. PMID: 16792843.

VOETS, I. K. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. **Soft Matter**, v. 13, n. 28, p. 4808–4823, 2017. PMID: 28657626.

WANG, Y. S. et al. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1–2, p. 48–54, 2011.

WHITTINGHAM, D.G; LEIBO, S.P; MAZUR P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. **Science**, v. 178, n. 4059, p. 411, 1972. PMID: 5077328.

WILSON, R.; VAN SCHIE, B. J.; HOWES, D. Overview of the Preparation, Use and Biological Studies on Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 9-10, p. 711–718, set. 1998. PMID: 9737417.

WIWEKO, B.; MUTIA, K.; MANSYUR, E. Follicle isolation from ovarian tissue before and after cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 3, p. S185–S186, set. 2013.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane– Solute– Water Systems. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 103–129, set. 1999. PMID: 10529304.

WOWK, B. et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v. 40, n. 3, p. 228 – 236, 2000. PMID: 10860622.

WOWK, B. How cryoprotectants work. **Cryonics**, v. 3, p. 28, 2007.

WRIGHT, C. S. et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1555–1562, jun. 1999. PMID: 10357975.

Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. **Fertil Steril**, v. 94, n. 6, p. 2323 – 2328, 2010. PMID: 20189561.

XIAO, S. et al. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 27 nov. 2015. PMID: 26612176.

XU, J. et al. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. **REPRODUCTION**, v. 140, n. 5, p. 685–697, nov. 2010. PMID: 20729335.

ZHAO, Q. et al. Vitrification freezing of large ovarian tissue in the human body. **Journal of Ovarian Research**, v. 12, n. 1, 22 ago. 2019. PMID: 31438999.

ANEXOS

ANEXO I: Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 258/2017

Título do projeto: Avaliação da aplicabilidade de polímeros sintéticos na criopreservação de tecido ovariano bovino

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Fernando Marcos dos Reis

Unidade: Faculdade de Medicina

Departamento: Departamento de Ginecologia e Obstetria

Situação atual: [Decisão da CEUA - Diligência](#)

Após análise de seu projeto a CEUA decidiu solicitar de V. Sa. as seguintes informações. Tendo em vista que o prazo para resposta à diligência é de 60 dias, se a mesma não for respondida até 17/11/2017, informamos que o projeto será arquivado e não terá a aprovação da CEUA. Seu projeto foi julgado na reunião ordinária no dia 18/09/2017. 1. O cálculo estatístico não foi demonstrado, favor enviar em anexo um print deste cálculo; Incluir na aba 11- Documentos- Outros Anexos. 2. A CEUA sugere ao pesquisador que a coleta de material seja realizada em um frigorífico submetido a inspeção oficial. 3. Nos itens referentes à Biossegurança (10.1 a 10.6), solicitamos ao pesquisador a indicação dos procedimentos de forma adequada, inclusive no que se refere ao descarte do material biológico usado no estudo. - A CEUA orienta o pesquisador a respeito dos seguintes aspectos a serem observados em submissões futuras: 1. É necessário o preenchimento adequado da aba "5 Procedimentos" em que devem ser descritos adequadamente os procedimentos de acordo com a metodologia que será realizada no estudo. 2. Em submissões futuras, na aba "3 Grupos de animais" o pesquisador pode selecionar a opção "Outros" quando se tratar de coleta de tecido post mortem e informar o tipo de tecido que será coletado. * O item 11. Documentos foi liberado somente para anexar os documentos solicitados, a resposta à diligência deve ser respondida na janela que será aberta em Situação (Resposta à diligência) A CEUA esclarece que a coleta de tecido post mortem não requer submissão de protocolo, conforme informação do CONCEA (Anexo da Carta Consulta 007/2017 da plenária da 36ª Reunião do CONCEA) Para todos os questionamentos que envolvem peças de abatedouro, dentes, entre outros, sem manipulação de animal vivo, a resposta é: Não há necessidade de obter a autorização da CEUA para os procedimentos listados. No entanto, recomenda-se que o pesquisador tenha todos os documentos que indiquem e autenticam a origem e regularidade da coleta do material, quer seja os termos de consentimento ou de doação do proprietário do animal, ou aqueles que comprovem a sua aquisição. Entretanto, a CEUA informa que não emitirá certificado ou declarações para protocolos não enviados para análise. O pesquisador deverá seguir as orientações do CONCEA, caso não necessite de certificado.

Belo Horizonte, 19/09/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II: Abatedouro fornecedor de ovário.

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL CADASTRO NACIONAL DA PESSOA JURÍDICA			
NÚMERO DE INSCRIÇÃO 09.021.512/0001-09 MATRIZ		COMPROVANTE DE INSCRIÇÃO E DE SITUAÇÃO CADASTRAL	
		DATA DE ABERTURA 23/07/2007	
NOME EMPRESARIAL DIMEZA ALIMENTOS LTDA.			
TÍTULO DO ESTABELECIMENTO (NOME DE FANTASIA) *****			PORTE DEMAIS
CÓDIGO E DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE ECONÔMICA PRINCIPAL 10.99-6-99 - Fabricação de outros produtos alimentícios não especificados anteriormente			
CÓDIGO E DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES ECONÔMICAS SECUNDÁRIAS 10.11-2-01 - Frigorífico - abate de bovinos 10.12-1-03 - Frigorífico - abate de suínos 46.34-6-01 - Comércio atacadista de carnes bovinas e suínas e derivados			
CÓDIGO E DESCRIÇÃO DA NATUREZA JURÍDICA 206-2 - Sociedade Empresária Limitada			
LOGRADOURO AV DOUTOR ANTONIO CHAGAS DINIZ		NÚMERO 545	COMPLEMENTO *****
CEP 32.210-160	BAIRRO/DISTRITO CIDADE INDUSTRIAL	MUNICÍPIO CONTAGEM	UF MG
ENDEREÇO ELETRÔNICO MARCIA@PRIORICONULTORIA.COM		TELEFONE (31) 2104-0717	
ENTE FEDERATIVO RESPONSÁVEL (EFR) *****			
SITUAÇÃO CADASTRAL ATIVA		DATA DA SITUAÇÃO CADASTRAL 23/07/2007	
MOTIVO DE SITUAÇÃO CADASTRAL			
SITUAÇÃO ESPECIAL *****		DATA DA SITUAÇÃO ESPECIAL *****	

Aprovado pela Instrução Normativa RFB nº 1.863, de 27 de dezembro de 2018.

Emitido no dia **16/09/2021** às **14:36:22** (data e hora de Brasília).

Página: 1/1