

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

Catiele Garcia Gervásio

**Regeneração da função gonadal após reimplante de tecido
ovariano vitrificado pelo Sistema *Ovarian Tissue Cryosystem*
(OTC) e outros dois protocolos na espécie murina**

RIBEIRÃO PRETO

2018

Catiele Garcia Gervásio

Regeneração da função gonadal após reimplante de tecido ovariano vitrificado pelo Sistema *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) e outros dois protocolos na espécie murina

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas.

Departamento: Ginecologia e Obstetrícia
Área: Biologia da Reprodução

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gervásio, Catielle Garcia.

Regeneração da função gonadal após reimplante de tecido ovariano vitrificado pelo Sistema *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) e outros dois protocolos na espécie murina, 2018.

123 p. il., 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento: Ginecologia e Obstetrícia. Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Rosa-e-Silva, Ana Carolina Japur de Sá.

1. Tecido ovariano.
2. Vitrificação.
3. *Ovarian Tissue Cryosystem*.
4. Transplante tecido ovariano.
5. Imunomarcador.

Folha de Aprovação

Catiele Garcia Gervásio

Título: “Regeneração da função gonadal após reimplante de tecido ovariano vitrificado pelo Sistema *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) e outros dois protocolos na espécie murina”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais **Telma Vieira Garcia dos Santos Gervásio** e **Edivaldo Carvalho Gervásio**, pelo exemplo de força, perseverança e por sempre depositaram em mim sua confiança e por serem meu maior exemplo de vida. Que me trouxeram com todo o amor e carinho a este mundo, dedicaram, cuidaram e doaram incondicionalmente seu sangue e suor em forma de amor e trabalho por mim, despertando e alimentando em mim a personalidade, ainda na infância, a sede pelo conhecimento e a importância deste em minha vida. Por todo o amor incondicional, respeito, dedicação e por sempre se fazerem presentes em minha vida.

Ao meu irmão **José Gervásio de Menezes Neto** que sempre elevou a minha auto estima e por sempre ter sido o meu equilíbrio, a minha fonte de amor, serenidade e incentivo, pelo seu enorme coração, bondade e humildade e para quem busco sempre ser exemplo de dedicação aos estudos.

Ao meu esposo **Francisco Ferreira de Araujo Neto** que de uma forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, ajudou-me compreendendo-me e ensinando-me para que eu conquistasse um lugar ao sol, que sempre me deu atenção, carinho e preciosos conselhos. Pela paciência e compreensão, mas principalmente pelo amor e exemplo de companheirismo no sucesso e no fracasso, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença.

Ao meu filho **Bernardo**, com e por você tudo tem mais sentido, você é minha estrutura, respiração, meu presente de Deus. Obrigado pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor.

Agradecimentos Especiais

Em especial, a **Deus**, pela proteção, força e coragem para enfrentar as dificuldades na vida pessoal e profissional. E por estar presente me guiando, dando força e protegendo durante todos os momentos desta caminhada.

À minha orientadora **Profa. Dra Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva** pela oportunidade de concretizar mais esta etapa da minha vida profissional, pelo apoio, paciência e confiança em realizar este trabalho de doutorado, onde no decorrer dessa caminhada, o conhecimento e a experiência adquiridos tem um valor inestimável para mim. Também, pelas palavras me acalmou em momentos de desespero, pela disponibilidade revelada ao longo desses anos, pelas críticas e sugestões relevantes, pelo apoio moral e amizade. Obrigada por ter me orientado durante este trabalho, sempre com total dedicação, atenção e carinho.

Agradecimientos

A **todos** aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, especialmente:

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP)**, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia (PGGO) que através de sua equipe de funcionários – professores, secretários e coordenadores, muito contribuíram para minha formação profissional.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, ao Departamento de Patologia, ao Departamento de Cirurgia Experimental e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA)** pela oportunidade em desenvolver meu trabalho de doutorado.

À **Universidade Estadual do Ceará (UECE)**, especialmente ao **Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA)**, que contribuíram direta ou indiretamente; A **Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues** por ter dado todo o suporte necessário durante o período de realização do meu trabalho experimental.

Aos **Docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**, especialmente aos do setor da biologia da reprodução pelos ensinamentos, apoio e dedicação prestados.

Ao **Prof. Dr. Julio Rosa e Silva** pela sua imensa ajuda, atenção e contribuição neste trabalho, por ter se mostrado sempre disponível a me ajudar. Onde através do seu senso crítico e da sua força de vontade, se tornou um exemplo de pesquisador.

À **Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho** pela ajuda e colaboração na realização desse trabalho. Agradeço também técnica **Deisy Mara da Silva** pela ajuda na confecção das laminas de imunohistoquímica.

Agradecimento especial à **Maria Aparecida Vasconcelos, Ariane Santana, Danniely Barros** que contribuíram efetivamente com essa pesquisa, obrigada pela amizade conquistada, dedicação, empenho e paciência dedicados durante todo o meu treinamento, padronização e realização de todas as técnicas que envolvem esse trabalho e durante a vivência da pesquisa. Além das palavras de apoio, que tanto me deram força para acreditar na concretização deste trabalho.

À **Suelen Soares, Ricardo, e Suleimy** por toda a atenção, apoio e ajuda em todos os momentos.

Aos meus animais de estimação, **Lucky e Luna**, por alegrarem os meus dias, por me verem chorar sem entender o que acontecia e apenas com seus olhos dentro dos meus, me mostrarem o amor verdadeiro.

À **Banca examinadora**, pela disponibilidade em participar deste momento importante do meu desenvolvimento profissional.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, indispensável para a realização desse trabalho.

Epígrafe

*"Quando o mundo estiver unido na busca do conhecimento, e não
mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim
evoluir a um novo nível."*

Resumo

GERVÁSIO, CG. “**Regeneração da função gonadal após reimplante de tecido ovariano vitrificado pelo Sistema *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) e outros dois protocolos na espécie murina**”. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: A criopreservação de fragmentos de tecido ovariano previamente ao início da terapia oncológica e posterior reimplante do tecido ovariano tem sido sugerido como promissora alternativa para preservação de fertilidade. Neste sentido, um novo sistema de vitrificação denominado *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC), vem sendo desenvolvido visando aperfeiçoar a conservação do tecido congelado. **Objetivo:** Avaliar o impacto da criopreservação sobre a viabilidade do tecido ovariano murino vitrificado por três diferentes protocolos, dentre eles o sistema OTC. E avaliar o impacto do reimplante heterotópico do tecido ovariano murino fresco e descongelado pelos mesmos protocolos, sobre a sua viabilidade. **Metodologia:** Este é um estudo experimental onde foram utilizados tecido ovariano de camundongos C57BL/6. Três protocolos de vitrificação foram testados simultaneamente: protocolo murino (PrM); protocolo humano (PrH); protocolo OTC (PrOTC) em comparação ao grupo frescos (GF). As amostras foram analisadas imediatamente após o descongelamento (Etapa 1) ou após 15 ou 30 dias de reimplante retroauricular (Etapa 2). Para análise da viabilidade utilizou-se imunohistoquímica para proliferação celular (Ki-67), dano celular (NF-kB) e dano oxidativo (4-HNE e Nitrotirosina). Os resultados foram obtidos utilizando-se o teste Q-quadrado para verificar a distribuição entre os grupos e a imunomarcagem (% de folículos marcados), sendo que o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. **Resultados:** **Etapa 1:** Os grupos PrOTC e PrM apresentaram melhor desempenho em relação à proliferação celular. Entretanto, estes mesmos protocolos apresentaram graus variados de dano oxidativo quando analisados pela imunomarcagem de nitrotirosina, aonde o PrOTC teve maior marcação do que o GF, portanto maior dano, e o PrM teve maior marcação em relação ao HNE em comparação com os demais protocolos. Não houve nenhuma diferença na marcação do NF-kB entre os grupos descongelados. **Etapa 2:** O reimplante em si não pareceu comprometer significativamente o tecido, uma vez que as amostras GF e GF reimplantado com 15 e 30 dias tiveram desempenho semelhante em relação à todos os marcadores, com exceção do GF 30 dias que mostrou algum grau de dano oxidativo pela nitrotirosina ($p < 0,05$). E ao se avaliar a somatória de efeitos entre congelamento e reimplante entre os diferentes protocolos apenas o PrH evidenciou dano tecidual imediatamente após o descongelamento e dano progressivo após o reimplante. **Conclusão:** Os PrM e PrOTC foram semelhantes ao GF na conservação da amostra durante o processo de criopreservação, sendo que o PrOTC causou algum grau de dano oxidativo. O reimplante retroauricular do tecido não impactou sobre a sua viabilidade do mesmo nem no GF e nem nos PrM e PrOTC. O PrH mostrou-se inadequado para a conservação de tecido ovariano murino.

Palavras-chave: Tecido ovariano, Vitrificação, Transplante tecido ovariano, *Ovarian Tissue Cryosystem*.

Abstract

GERVÁSIO, CG. "**Regeneration of the gonadal function after reimplantation of ovarian tissue vitrified by the *Ovarian Tissue Cryosystem System (OTC)* and two other protocols in the murine specie**". Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: The Cryopreservation of fragments of ovarian tissue prior to initiation of oncotherapy and subsequent reimplantation of ovarian tissue has been suggested as promising alternative for fertility preservation. In this sense, a new system of vitrification called *Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)*, has been developed in order to improve the frozen ovarian tissue conservation. **Objective:** To compare the viability of murine ovarian tissue vitrified by three different vitrification protocols and to verify the efficiency of the *Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)*. **Methods:** This is an experimental study using ovarian tissue of C57BL/6 mice. Three vitrification protocols were tested simultaneously: Murine protocol (PrM); Human Protocol (PrH) and Protocol OTC (PrOTC); in comparison to Fresh Tissue (GF). Samples were analyzed immediately after thawing (Step 1) or after 15 or 30 days of retroauricular reimplantation (Step 2). For viability analysis immunohistochemistry for cell proliferation (Ki-67), cell damage (NF-kB) and oxidative damage (4-HNE and Nitrotyrosine) was used. The results were obtained using the Q-square test to analyze immunostaining counted as % of labeled follicles and the level of significance was set at $p < 0.05$. **Results: Step 1:** The PrOTC and PrM presented the best performance in relation to cell proliferation. However, these same protocols presented varying degrees of oxidative damage when analyzed by the nitrotyrosine immunolabeling, where PrOTC had higher marking than GF, thus greater damage, and PrM had a greater marking in relation to HNE compared to the other protocols. There was no difference in the labeling of NF-kB between the thawed groups. **Step 2:** The reimplantation procedure did not appear to significantly impair the ovarian tissue quality once day 15 and 30 after fresh tissue engraftment of was similar for all markers except for nitrotyrosine after 30 days ($p < 0,05$). And when assessing the sum of effects of freezing and reimplantation among the 3 different protocols only PrH showed tissue damage immediately after thawing and progressive damage after reimplantation. **Conclusion:** The PrM and PrOTC were similar to the GF in the preservation of the sample during the cryopreservation process, and PrOTC caused some degree of oxidative damage. Retroauricular reimplantation of the tissue did not impact on its viability in either the GF or PrM and PrOTC. PrH was found to be unsuitable for the cryopreservation of murine ovarian tissue.

Key-words: *Ovarian Tissue Cryosystem*, Vitrification, Ovarian tissue cryopreservation.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento folicular, desde o folículo primordial até o estágio antral, mostrando o desenvolvimento das células da granulosa, teca e oócito (Modificado de Gervásio et al., 2014) . a) Folículo primordial, o oócito é envolto por uma camada de células da granulosa pavimentosa. (b) Folículo transitório ou intermediário, o oócito é envolto por células da granulosa pavimentosas de um lado e do outro lado células cubóides (c) Folículo primário, o oócito é envolto por uma camada única de células da granulosa cubóides. (d) Folículo secundário, o oócito é envolto por duas ou mais camadas completas de células da granulosa cubóides. (e) Folículo antral é caracterizado pela presença de uma cavidade antral com várias camadas de células da granulosa cubóides.

Figura 2. Delineamento experimental.

Figura 3. Retirada do ovário do reimplantado após 30 dias. (A) Camundongos fêmea, da raça C57BL/6 com reimplante após 30 dias. (B, C e D) Corte realizado na parte retroauricular, para exposição do ovário. (E) Ovário reimplantado foi visualizado. (F) Ovário foi retirado e fixado em formol para realização da imunohistoquímica.

Figura 4. *Ovarian Tissue Cryosystem*: Novo dispositivo em aço inoxidável para procedimento de vitrificação de tecido ovariano caprino. (A) OTC aberto, permitindo a visualização das três partes constituintes: base (a), insert (b) tampa (c). Notar as perfurações na parte superior do insert para facilitar a colocação e remoção de soluções. (B) Exposição do ovário à solução de vitrificação na base do OTC. (C) A inclusão do insert na base do OTC permite a manipulação asséptica do insert. (D) Fechamento da base com a tampa do OTC. (E) Crioestocagem do OTC contendo a amostra (CARVALHO et al., 2013).

Figura 5. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano após criopreservação entre os diferentes grupos.

Figura 6. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano em relação ao grupo fresco no tempo 0, 15 e 30 dias do reimplante.

Figura 7. Proliferação celular (Ki-67) e dano tecidual (nitrotirosina, HNE e NF-kB) nos três protocolos (PrM, PrOTC e PrH) analisados à fresco, após o descongelamento e após o reimplante retroauricular.

Figura 8. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano entre os diferentes grupos após criopreservação e 15 dias reimplante.

Figura 9. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano entre os diferentes grupos após criopreservação e 30 dias de reimplante.

Lista de tabelas

Tabela 1. Marcadores e suas respectivas diluições, marca do kit e controle utilizados na imunohistoquímica.

Lista de Abreviaturas

4-HNE =4-Hidroxinonenal

μL = MicroLitros

BSA= Albumina Sérica Bovina

CETEA- FMRP = Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

CGP= Células Germinativas Primordiais

Cm= Centímetros

DAB= Diaminobenzidina

DAP= Dimetilsulfóxido, + Acetamida + Propilenoglicol

DMSO = Dimetilsulfóxido

EG= Etilenoglicol

F15= Grupo fresco após 15 dias de reimplante;

F30= Grupo fresco após 30 dias de reimplante;

g= gramas

GF= Grupo Fresco

GLY= Glicerol

HE = Hematoxilina-Eosina

HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

Kg= Quilograma

M = Molar

MEM= Meio essencial mínimo

mg= Miligrama

mL= Mililitro

mm = Milímetro

NFκB =Factor Nuclear Kappa B

OTC = *Ovarian Tissue Cryosystem*

PVP= Polivinilpirrolidona

PrH15= Protocolo humano após 15 dias de reimplante

PrH30= Protocolo humano após 30 dias de reimplante

PrH= Protocolo Humano

PrM= Protocolo Murino

PrM15= Protocolo murino após 15 dias de reimplante

PrM30= Protocolo murino após 30 dias de reimplante

PrOTC= Protocolo OTC

PrOTC15= Protocolo OTC após 15 dias de reimplante

PrOTC30= Protocolo OTC após 15 dias de reimplante

PROH= 1,2 Propanodiol

SAC= Sacarose

SSS= Serum Substitute Supplement (Soro Sintético Substituto)

USP = Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

ZP = Zona Pelúcida

Sumário

1. Introdução.....	30
1. A Preservação de Fertilidade em pacientes com Câncer:	31
2. A Unidade folicular	33
2.1. A atresia folicular	35
3. Protocolos de Criopreservação de tecido ovariano	37
3.1. Lento	38
3.2. Vitrificação.....	39
3.3. Crioprotetores	40
4. A avaliação do tecido criopreservado:	42
4.1. Histologia clássica:	42
4.2. Imunomarcadores para avaliação do tecido ovariano:	43
4.2.1. NF –kB (factor nuclear kappa B)	43
4.2.2. 4-HNE (4-hidroxinonenal)	43
4.2.3. Nitrotirosina	44
4.2.4. Ki 67.....	44
5. Reimplante do tecido ovariano	45
2. Justificativa.....	47
3. Objetivos.....	49
3.1 Objetivo Geral.....	50
3.2 Objetivos específicos	50
4. Materiais e Métodos.....	51
4.1 Aspectos Éticos	52
4.2 Desenho do Estudo.....	52
4.2.1 Delineamento experimental	52
4.3 Preparo das amostras de tecido ovariano	53
4.4 Vitrificação /desvitrificação do tecido ovariano.....	54
4.4.1 Protocolo murino	54
4.4.2 Protocolo humano	55
4.4.3 Sistema OTC.....	55
4.4. Ovariectomia total bilateral e reimplante do tecido ovariano	56
4.5. Análise dos protocolos de criopreservação e do tecido ovariano transplantado	57
4.5.1 Técnica de imunohistoquímica	57
4.6 Análise Estatística	58
5. Resultados	59
5.1. ETAPA 1- Efeito dos diferentes protocolos de vitrificação:	60
5.2. ETAPA 2- Efeito do reimplante associado ou não à criopreservação:	61
6. Discussão	66

6. Conclusão.....	75
Referências.....	77
<i>Artigo Científico</i>	<i>92</i>

1. Introdução

1. A Preservação de Fertilidade em pacientes com Câncer:

Nas últimas décadas, segundo a Agência Internacional de Pesquisa contra o Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, o que representa aproximadamente 12% de todas as causas de morte no mundo (JEMAL et al., 2011; INCA, 2015). Embora as estatísticas apontem uma estimativa cada vez maior no número de novos casos de câncer, progressos na área da oncologia têm permitido a cura de mais de 90% dos casos (DONNEZ et al., 2013), muitos deles em mulheres jovens, em idade reprodutiva. (BLEYER, 2002). As pacientes que necessitam de radioterapia e/ou quimioterapia para o tratamento oncológico estão propensas a terem comprometida a sua função ovariana (MEIROW et al., 2008), uma vez que os feixes de radiação ionizante e a gonadotoxicidade das drogas afetam as células da linhagem germinativa feminina acelerando o processo de apoptose celular, levando desde um dano gonadal leve até a falência ovariana prematura (FOP) (MEIROW, NUGENT, 2001; MEIROW et al., 2008). A intensidade deste dano varia na dependência da idade da paciente, da dose e do tipo de droga quimioterápica usada e, nos casos de radioterapia, da intensidade e localização da radiação. Por isso há grande preocupação com relação à fertilidade futura destas pacientes.

Deste modo o desenvolvimento de técnicas alternativas para a preservação e restauração da fertilidade, tem apresentado uma importante relevância clínico-científica. Atualmente, existem várias técnicas para preservar a fertilidade nestas mulheres. Dentre elas a criopreservação de tecido ovariano (DOLMANS et al., 2013a; SMITZ et al., 2010, KIM et al., 2018) associada ou não a outras técnicas que possibilitam a utilização deste tecido após a criopreservação para fins reprodutivos.

A maioria dos relatos de nascimentos após criopreservação e transplante de tecido ovariano foram feitos utilizando-se o processo de congelamento lento (DOLMANS, MANVELLA, 2018). Apesar dos resultados positivos alcançados, sabe-se que durante o congelamento lento pode ocorrer à formação de cristais de gelo intracelular, o que leva a danos celulares durante o processo de criopreservação e compromete a qualidade do tecido (CAMPOS et al, 2011). Por outro lado, a vitrificação propõe evitar a formação de cristais de gelo no espaço intracelular, uma vez que tem como princípio básico o aumento da viscosidade da solução de criopreservação e o

resfriamento ultra-rápido que fazem com que haja a formação de um estado vítreo (HORVATH, SEIDEL, 2006). Recentemente, alguns autores têm sugerido uma superioridade da vitrificação sobre o congelamento lento para a criopreservação de tecido ovariano (AMORIM et al., 2011), tendo sido descrito o primeiro caso de nascimento humano a partir de tecido ovariano vitrificado em agosto de 2013 (KAWAMURA et al., 2013), atualmente com 3 nascimentos reportados no mundo (DOLMANS, MANVELLA, 2018). Porém, é conhecido que as técnicas de vitrificação disponíveis na literatura, inclusive a utilizada por Kawamura, apresentam resultados bastante variáveis, e não têm uma reprodutibilidade satisfatória. Resultados mais consistentes já são observados na utilização das técnicas de vitrificação para a criopreservação de tecido ovariano na espécie murina, havendo inclusive resultados de nascimentos de prole saudável e fértil (XU et al., 2006; CHEN et al., 2006; HASEGAWA et al., 2006).

Outro sistema, o OTC (*Ovarian Tissue Cryosystem*), vem sendo desenvolvido por pesquisadores brasileiros e parece oferecer inúmeras vantagens em relação a outros sistemas já descritos na literatura (CARVALHO et al., 2013). Trata-se de um sistema fechado, que não permite o contato direto com o nitrogênio líquido, evitando assim possíveis contaminações da amostra; além disso, permite a vitrificação de vários fragmentos de ovário simultaneamente, ou mesmo de ovário inteiro, devido ao tamanho da cápsula. Inúmeros resultados positivos tem sido descritos até o momento para o sistema OTC, Bandeira e colaboradores (2015) descreveram que após 7 dias de cultivo o tecido de cabra vitrificado de pelo sistema OTC revelou maior porcentagem de folículos morfológicamente normais (30,66%) e viáveis (60,00%), quando comparados aos vitrificados pela técnica de sistema aberto (21,33% e 23,00%). Neste mesmo estudo foi descrito que a sobrevivência folicular após a vitrificação seguida de cultura folicular foi maior quando o tecido foi congelado em fragmentos ovarianos (36,1%) do que em hemi-ovário (22,3%) ou ovário completo (18,4%) (CARVALHO et al., 2013).

A avaliação do tecido ovariano criopreservado após o descongelamento pode ser feito de diferentes maneiras, desde avaliações funcionais verificando-se a produção hormonal e a proliferações de células após o cultivo, quanto através de testes de qualidade dos óvulos recuperados através de embriogênese e gravidez (com sérias limitações éticas na espécie humana). Em qualquer uma destas propostas o objetivo é analisar a integridade morfológica e a manutenção da capacidade funcional da amostra

tanto para esteroidogênese quanto para foliculogênese, ou seja, produção de gametas maduros que sejam capazes de gerar prole saudável.

Uma vez congelado e descongelado o tecido ovariano poderá ser utilizado para reimplante ortotópico (no próprio sítio de onde foi removido) ou heterotópico (em lugares diversos da fossa ovárica), ou pode ser utilizado para o isolamento de folículos imaturos para cultivo *in vitro*. Em humanos os nascimentos já descritos são todos oriundos do reimplante do tecido, na maioria dos ortotópico (DOLMANS, MANVELLA, 2018). Porém a algumas situações especiais em que a doença neoplásica é sistêmica, com as leucemias, ou em que o risco de metástases ovarianas é muito elevado, como nos tumores de mama, linfomas e de estômago, é possível que micrometástases não detectadas tenham sido albergadas no tecido a ser criopreservado e possam levar à recidiva da doença quando do reimplante (DOLMANS et al, 2013b). Neste sentido, o isolamento de folículos imaturos em seus diferentes estágios de desenvolvimento para cultivo *in vitro* torna-se uma técnica alternativa para o aproveitamento deste tecido criopreservado sem trazer riscos de recidiva da doença oncológica para a paciente.

2. A Unidade folicular

Percebe-se que apesar de fenômenos diferentes, o desenvolvimento e maturação do oócito (oogênese) e o desenvolvimento folicular (foliculogênese) são processos interligados, no qual substâncias secretadas pelo oócito e por células somáticas foliculares se comunicam, num processo conhecido como “crosstalk”, para a formação de um gameta maduro fertilizável.

A foliculogênese também se inicia na vida pré-natal na maioria das espécies, podendo ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; SAUMANDE, 1981; SONGSASEN et al, 2009). Esse processo ocorre simultaneamente à oogênese quando o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies, ou seja, a foliculogênese inicia-se após e termina antes da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). As oogônias, formadas a partir das células germinativas primordiais (CGP), uma vez na crista gonadal serão circundadas por uma camada de células somáticas que se

diferenciarão para formar os folículos primordiais, os quais estão inativos e constituem 90% da população de folículos ovarianos, é o chamado “*pool* de reserva folicular”. A manutenção desta quiescência folicular se dá por estímulos inibitórios advindos do próprio estroma e de outros folículos do pool (SAWYER et al., 2002); uma vez cessados estes estímulos o folículo entra automaticamente em processo de ativação e crescimento (FIGUEIREDO et al., 2008).). Fisiologicamente a ativação destes folículos ocorrerá gradualmente, conforme a demanda, por mecanismos ainda desconhecidos.

O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário mamífero, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o desenvolvimento e maturação do oócito (CORTVRINDT e SMITZ, 2001). Estes podem ser classificados em primordiais, primários e secundários, antrais iniciais, pré-ovulatórios e atresicos (HULSHOF et al., 1994) (Figura 1).

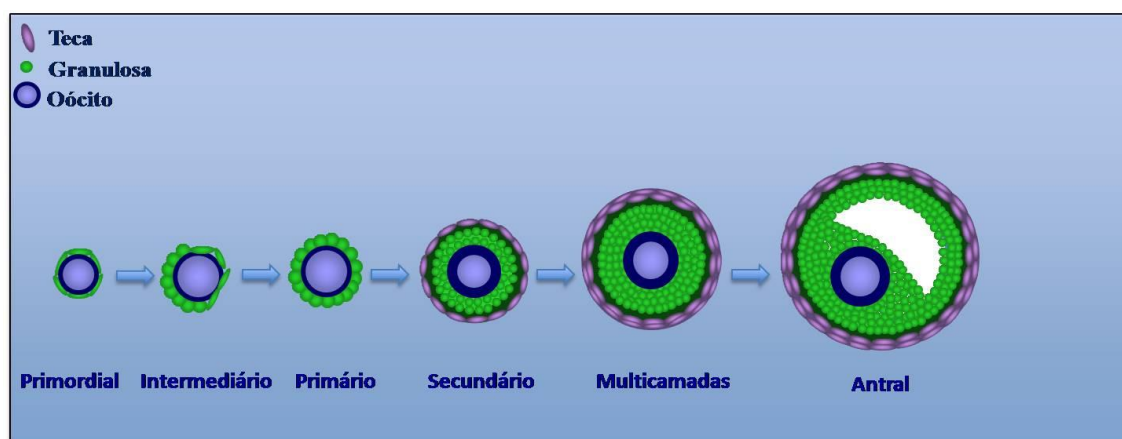


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento folicular, desde o folículo primordial até o estágio antral, mostrando o desenvolvimento das células da granulosa, teca e oócito (Modificado de Gervásio et al., 2014). a) Folículo primordial, o oócito é envolto por uma camada de células da granulosa pavimentosa. (b) Folículo transitório ou intermediário, o oócito é envolto por células da granulosa pavimentosas de um lado e do outro lado células cubóides (c) Folículo primário, o oócito é envolto por uma camada única de células da granulosa cubóides. (d) Folículo secundário, o oócito é envolto por duas ou mais camadas completas de células da granulosa cubóides. (e) Folículo antral é caracterizado pela presença de uma cavidade antral com várias camadas de células da granulosa cubóides.

Os folículos primordiais são os primeiros desenvolvidos no ovário (EPPIG e O'BRIEN, 1996) e são circundados por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa, delimitados por uma camada basal que os separa do estroma ovariano (GORDON, 1994). O oócito do folículo primordial apresenta uma forma que varia de esférica a ovóide e ocupa uma posição central com organelas citoplasmáticas localizadas na região perinuclear em bovinos (FAIR et al., 1997; HYTTEL et al., 1997), caprinos (LUCCI et al., 2001) e suínos (HERTIG e ADAMS, 1967).

Uma vez ativado, o folículo primordial inicia seu processo de maturação e evolui para folículo primário, caracterizados pela presença de uma única camada de células da granulosa apresentando formato cubóide (HULSHOF et al., 1994), em torno do oócito, sendo uma característica marcante dessa fase o surgimento da zona pelúcida, estrutura mantida por todo o desenvolvimento folicular (VAN DEN HURK et al., 2000; CORTVRINDT e SMITZ, 2001; FAIR et al., 1997).

Este folículo ativado multiplica suas camadas de células granulosa dando origem ao folículo secundário (HULSHOF et al., 1994). Neste estágio ocorre um aumento do diâmetro do oócito, no qual a zona pelúcida se torna evidente em bovinos (FAIR et al., 1997) e caprinos (LUCCI et al., 2001), além da formação das primeiras células da teca (VAN DEN HURK, BEVERS e BECKER 1997; SCARAMUZZI et al., 1993). No final deste estágio, a ação gonadotrófica já pode ser detectada (VAN DEN HURK et al., 2000). A etapa seguinte do desenvolvimento se caracteriza pela multiplicação das camadas da granulosa, com produção e acúmulo de fluido folicular por estas células, formando a cavidade antral com a presença do complexo cumulus-oócito (FIGUEIREDO et al., 2008; GORDON, 1994). A formação da cavidade antral é um evento importante no crescimento folicular, pois é precursor dos processos de desvio e dominância folicular (SILVA et al., 2002). O folículo selecionado para ovulação no ciclo em que se desenvolve completará o crescimento, com expansão da cavidade antral a qual aproxima o oócito da superfície ovariana e facilita a extrusão do mesmo após a ruptura do epitélio do cótex ovariano. Os demais folículos, não dominantes sofrerão processo de atresia.

2.1. A atresia folicular

O processo de atresia folicular pode ser fisiológico ou pode ocorrer em decorrência de dano ao tecido ovariano. Durante o desenvolvimento folicular nem todos os folículos ativados chegarão aos estágios finais de desenvolvimento, variando de espécie para espécie o número de folículos que atingirão a maturidade para a ovulação, os demais sofrerão um processo conhecido como atresia. A atresia folicular é um processo fisiológico, responsável pela perda de quase a totalidade (99,9%) dos folículos de um ovário (FIGUEIREDO et al., 1995), fazendo com que o desenvolvimento folicular completo seja um evento biológico extremamente raro (IRELAND, 1987). Este

processo é caracterizado por interrupção da mitose nas células da granulosa, separação das células da granulosa da membrana basal e morte do oócito, podendo ocorrer pelas vias degenerativas e/ou apoptóticas quando o ambiente parácrino ou endócrino não é adequado para suportar o crescimento folicular, juntamente com a diferenciação das células da granulosa (MARKSTROM et al., 2002).

As alterações sugestivas de atresia em folículos pré-antrais, foram observadas em análise histológica que ocorrem primeiramente no oócito, sendo o primeiro sinal de atresia a picnose nuclear (JORIO, MARIANA e LAHLOU-KASSI, 1991; MORITA e TILLY, 1999), caracterizada atresia por via degenerativa. Porém em folículos antrais, a picnose nuclear e a vascularização citoplasmática acontecem primeiramente nas células da granulosa (HAY, CRAN, MOOR, 1976), em seguida ocorre o aparecimento das alterações degenerativas nas células tecais (O'SHEA, HAY, CRAN, 1978) e finalmente no oócito (HAY, CRAN, MOOR, 1976), mostrando uma maior sensibilidade das células somáticas foliculares do que do próprio oócito. Os folículos antrais têm a capacidade de recuperar-se da atresia e prosseguir até a ovulação, os quais são sugeridos pelo estudo da viabilidade de células da granulosa de folículos atrésicos, onde foi observado ausência de sinais de degeneração dos oócitos em início de atresia (HIRSHFIELD, 1989). O desenvolvimento folicular pode ser influenciado por vários fatores estimulatórios e inibitórios que regulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células da granulosa (MONNIAUX et al., 1997). Para compreender como um folículo se torna atrésico, é importante lembrar que em cada fase do seu desenvolvimento, um folículo requer quantidades diferenciadas de hormônios e fatores de crescimento (MONNIAUX et al., 1997), conseqüentemente, quando as concentrações destes fatores estão abaixo das necessárias, a atresia é iniciada (MONNIAUX et al., 1997). Entretanto, independentemente da fase na qual ocorre, a atresia diminui de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida fértil, fazendo com que o potencial ovariano seja subaproveitado (MONNIAUX et al., 1997).

3. Protocolos de Criopreservação de tecido ovariano

A criobiologia (estudo das técnicas de congelamento de células e tecidos) tem permitido a preservação de células por tempos prolongados, na maioria das vezes com a manutenção de suas propriedades biológicas uma vez descongeladas (PEGG, 2007; TAO; DEL VALLE, 2008). Todas as células dos mamíferos funcionam com uma pequena variação de temperatura, que vai de 37°C a 39°C, e todas contêm água, tornando possível a criopreservação se forem resfriadas em nitrogênio líquido a - 196°C. Os danos sofridos pelas células dos mamíferos durante a criopreservação estão diretamente ligados à velocidade de resfriamento e ao aquecimento das células (RUBINSKY, 2003).

A criopreservação do tecido ovariano apresenta diversas vantagens, pois independe da idade e fase do ciclo (SHAW, ORANRATNACHAI, TROUNSON, 2000), além de envolver menos questões éticas e sociais comparada à criopreservação de oócitos e embriões, sobretudo quando esse processo é realizado na espécie humana (ZHANG et al., 2009). Essas características são extremamente interessantes para a reprodução assistida, principalmente para mulheres que necessitam iniciar de imediato o tratamento contra o câncer, não necessitando de indução de ovulação (ZHOU et al., 2010). A criopreservação de tecido ovariano também é uma alternativa para meninas que ainda não tenham atingido a puberdade aonde a indução da ovulação ainda não seria possível. (SUGIMOTO et al., 2000).

Entretanto, esse tecido é submetido a condições extremas, podendo danificar a integridade do folículo e resultar em crioinjúrias após a criopreservação (VARGHESE et al., 2008). Esses danos podem ser ocasionados em decorrência de temperaturas não fisiológicas e a exposição a agentes crioprotetores. Nesse contexto, algumas limitações da criopreservação, devem ser aprimoradas para obtenção de resultados satisfatórios em diferentes espécies, já havendo relatos de nascimento após criopreservação de tecido ovariano em diversas espécies animais (LIU et al., 2001; LIU, HE, ROSENWAKS, 2003; BORDES et al., 2005; IMHOF et al., 2006) e em humanos (SONMEZER, SHAMONKI E OKTAY, 2005; XU et al. 2006; DONNEZ et al., 2013; DOLMANS, MANVELLA, 2018). Até o momento, a maioria das pesquisas animais e em humanos concentra-se em métodos de congelamento e transplante de fragmentos do córtex avascular, sendo que essa técnica foi a única que possibilitou a ocorrência de nascimentos em humanos até o momento (DONNEZ et al., 2006).

O primeiro estudo relacionado à criopreservação de tecido ovariano na espécie ovina empregando o congelamento lento foi em 1994 (GOSDEN et al., 1994). No entanto, pesquisas envolvendo a vitrificação são bem mais recentes e resultados animadores já foram relatados. Em 2005 Bordes e colaboradores obtiveram o nascimento de três crias saudáveis após criopreservação de ovários de ovelhas pela técnica de vitrificação seguida de autotransplante ortotópico. Nesta técnica o material biológico, que neste caso foram metades de ovários, foi imediatamente transferido para criotubos após a etapa de equilíbrio ou exposição aos crioprotetores, e em seguida imerso em nitrogênio líquido para a vitrificação e estocagem.

A sobrevivência das células e tecidos vivos criopreservados depende em grande parte do meio crioprotetor. Os protocolos utilizados hoje em dia envolvem, basicamente, técnicas que permitem a desidratação da célula, prevenindo a formação de gelo intracelular, que pode causar danos pelo arrebentamento e dispersão das organelas celulares, ou por provocar quebras da membrana citoplasmática. (RODRIGUES et al., 2004). Vários crioprotetores estão disponíveis no mercado, entretanto, apesar de imprescindíveis para a realização do congelamento são tóxicos e seu uso isolado ou em associação com outros crioprotetores têm sido exaustivamente estudados nos diferentes protocolos de congelamento descritos, seja o congelamento lento ou a vitrificação, sempre com o objetivo de minimizar o dano sofrido pela amostra criopreservada.

3.1. Lento

A quase totalidade dos nascimentos em humanos após reimplante de tecido ovariano criopreservado até o momento advém de tecidos congelados por esta técnica (N=130 nascimentos, em comparação com 3 nascimentos dos tecidos vitrificados) (DOLMANS, MANVELLA, 2018). Por isso esta técnica é ainda considerada padrão ouro. O congelamento lento é caracterizado por uma redução gradual da temperatura, com o objetivo de reduzir o estresse térmico na fase de transição das soluções do estado líquido para o estado sólido (SANCHES, 2009) e pelo uso de baixas concentrações de agente crioprotetor (PAYNTER, 2000). Além disso, é caracterizado também por uma desidratação celular gradual para evitar a formação de cristais de gelo (SHAW et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004).

A interação das amostras com a substância crioprotetora é seguida de uma fase de equilíbrio após a qual a amostra é transferida para um recipiente apropriado e

colocado na máquina de congelamento computadorizada. Esta é programada para o congelamento em rampa que prevê o decréscimo lento da temperatura até -30 ou -40°C . Nesta técnica é necessária a realização do "Seeding", etapa que tem como finalidade minimizar a formação dos cristais de gelo no meio. Somente após atingir esta temperatura é que se faz a transferência para o nitrogênio líquido (-196°C) onde serão armazenados (PAYNTER, 2000).

Uma das suas desvantagens desta técnica é que necessita de equipamento específico e de alto custo, além de causar: desequilíbrio osmótico; formação de cristais de gelo intracelular com maior frequência, que interfere na estrutura dos fusos meióticos; enrijecimento da zona pelúcida (ZP), que pode afetar o processo de fertilização devido ao bloqueio da penetração do espermatozóide (TAO; DEL VALLE, 2008).

3.2. Vitrificação

A técnica que revolucionou a história da criopreservação de oócitos e que vem sendo mais recentemente defendida é a vitrificação (KUWAYAMA et al., 2005; COBO et al., 2008), que é definida como a elevação extrema da viscosidade do meio, levando a solidificação da solução líquida em uma solução vítrea em fração de segundos, caracterizando um congelamento ultrarrápido ($-1.500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) em nitrogênio líquido. A vitrificação de tecido ovariano surge como alternativa ao congelamento lento, por envolver rápidas taxas de resfriamento (15.000 a $30.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (LIEBERMANN, TUCKER, 2004) e aquecimento em presença de concentrações muito altas de crioprotetores, prevenindo assim a formação de cristais de gelo, e diminuindo os danos causados a célula (VAJTA et al., 1998; KASAI, 2004; LIEBERMANN, TUCKER, 2004).

A vitrificação por ser um método simples, não necessita de equipamentos caros para sua execução e o tempo de equilíbrio e congelamento é reduzido (DOBRINSKY, 2002; KUWAYAMA et al., 2005). Por outro lado, utiliza-se altas concentrações de crioprotetor, o que pode favorecer danos tóxicos e osmóticos na célula (VAJTA et al., 1998). Uma alternativa para reduzir a toxicidade e os efeitos osmóticos dos crioprotetores é o aumento da velocidade de congelamento, reduzindo o tempo de exposição da célula ao agente crioprotetor (KUWAYAMA, 2007).

Kuwayama e colaboradores (2005), um dos pioneiros do emprego da vitrificação, afirmam que as principais vantagens da vitrificação são a taxa de

resfriamento extremamente rápida ($23.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) o qual previne lesão no oócito, pelo fato do volume de meio de vitrificação ser muito baixo. Assim, altas taxas de aquecimento ($42.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) são alcançadas evitando a formação de cristais de gelo no processo de descongelamento e a concentração de crioprotetores permeáveis é reduzida em 30%, minimizando os efeitos potencialmente tóxicos (KUWAYAMA et al., 2005).

3.3. Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são substâncias que protegem as células contra desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. A utilização de crioprotetores reduz o dano celular durante a preservação do tecido (KIM, BATTAGLIA, SOULES, 2001). Os crioprotetores são utilizados para estabilizar as proteínas intracelulares, reduzem a formação de gelo intracelular e moderam o impacto da concentração de eletrólitos intra e extracelulares, por serem hidrossolúveis, apresentarem baixa toxicidade mesmo em concentrações elevadas e por serem facilmente permeáveis às membranas da célula (RALL, REID E POLGE, 1984). Apesar destas substâncias serem indispensáveis para o sucesso deste processo pode haver citotoxicidade em casos de exposição prolongada a estes agentes, sendo que a perda de folículos primordiais com o uso de crioprotetores pode variar de 15 a 90% dependendo do crioprotetor utilizado (NEWTON et al., 1996).

Dimetilsulfóxido (DMSO), Propanodiol (PROH), Etilenoglicol (EG) e Glicerol (GLY) são os crioprotetores mais utilizados para os protocolos de criopreservação, podendo ser utilizados isoladamente ou associados (ARNON et al., 2001; HOVATTA, 2003; OEHNINGER, 2005). A eficiência destes agentes crioprotetores podem variar em função da estrutura da célula ou tecido a ser criopreservado (FULLER, PAYNTER, 2004), da concentração e do tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação. Além disso, as diferenças estruturais entre as espécies animais é também um fator que pode influenciar na eficácia de um agente crioprotetor (FAUSTINO et al., 2010; GANDOLFI et al., 2006).

O etilenoglicol devido às suas características de baixo peso molecular ($62,07\text{ g/mol}$) e baixo ponto de fusão ($-15,6^{\circ}\text{C}$) tem sido amplamente empregado como agente crioprotetor intracelular (NEWTON et al., 1998). Todavia, ele apresenta como desvantagem a geração de subprodutos potencialmente tóxicos durante sua metabolização (CORLEY et al., 2005). Um estudo realizado na espécie bovina,

utilizando diferentes crioprotetores (EG, 1,2-propanodiol, DMSO e glicerol) para a criopreservação lenta de tecido ovariano mostrou que o EG nas concentrações de 1,5 e 3,0 M, reduziu significativamente o percentual de folículos morfológicamente normais (52,5% e 32,8%, respectivamente). Segundo os autores (LUCCI, et al. 2004), esse resultado se deve à ação tóxica desse crioprotetor. Por outro lado em 2008, Celestino e colaboradores obtiveram um alto percentual de folículos viáveis, semelhante ao controle fresco, tanto após a exposição quanto após a vitrificação do tecido ovariano bovino, utilizando 1,5 M de EG. O uso do DMSO tem sido bastante criticado por alguns autores; quando utilizado na concentração de 1,5 M para criopreservação de fragmentos de tecido ovariano produziu uma baixa taxa de recuperação de oócitos e de maturação oocitária, com oócitos apresentando grande desorganização da cromatina e 50% de degeneração folicular no primeiro dia de cultivo em amostras humanas e de ovinos (KIM et al., 2006; CECCONI et al., 2004). Já Demeestere e colaboradores (2006) obtiveram sucesso após transplantes ortotópico e heterotópico (subcutâneo) de tecido ovariano criopreservado com DMSO, constatando a retomada da ciclicidade hormonal e da fertilidade com obtenção de gestação natural após o reimplante.

Dentre os crioprotetores extracelulares, a sacarose, carboidrato composto por uma frutose e uma glicose, é utilizada com bastante frequência nas soluções de criopreservação, pois além de sua capacidade crioprotetora, essa substância age como um tampão osmótico contra o estresse celular causado durante a adição e remoção do crioprotetor intracelular (MANDELBAUM et al., 1988). A sacarose já foi utilizada com sucesso na crioproteção de oócitos caprinos (SHARMA et al., 2006) e humanos (COTICCHIO et al., 2006); tecido ovariano de diferentes espécies (caprino: SANTOS et al., 2006a; ovino: CECCONI et al., 2004; ONIONS et al., 2008; bovinos: LUCCI et al., 2004; humanos: KEROS et al., 2009). A adição de sacarose à solução de criopreservação aplicada a oócitos humanos tem demonstrado ser eficiente, resultando em altas taxas de sobrevivência, e obtenção de embriões de alta qualidade (BARRITT et al., 2007; PARMEGIANI, et al., 2008). Do mesmo modo, Santos e colaboradores (2006b) observaram que a adição de sacarose ao meio de criopreservação contendo EG é benéfica para manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano caprino.

Deste modo, percebe-se que a escolha de qual o melhor protocolo de criopreservação a ser empregado ainda está longe de ser alcançado e há espaço para o desenvolvimento de novas propostas de protocolo, com combinações diversas de

crioprotetores. Além disso, há também uma grande diversidade de sistemas de congelamento disponíveis no mercado, podendo ser aberto ou fechado (com ou sem contato direto com nitrogênio líquido), cada qual com vantagens e desvantagens, com resultados variáveis na dependência da espécie animal em que é empregado.

4. A avaliação do tecido criopreservado:

4.1. Histologia clássica:

A histologia é uma técnica que avalia a morfologia do citoplasma e do núcleo, sendo um método importante para avaliação do tecido ovariano, pois permite verificar a mudança na morfologia das células da granulosa, por ocasião da ativação folicular, além de permitir analisar a integridade morfológica do oócito, das células da granulosa e da unidade folicular como um todo. No entanto, essa técnica não permite avaliar a integridade das organelas citoplasmáticas (GOSDEN, et al. 2000). Gosden e colaboradores (2000) também observaram que a histologia clássica é pouco precisa se realizada imediatamente após o descongelamento do tecido ovariano, pois algumas alterações das organelas podem se manifestar somente algumas horas após este processo. Por outro lado, ela apresenta uma grande vantagem, que é a de possibilitar que um grande número de folículos seja avaliado, o que a torna uma técnica importante quando se deseja realizar uma análise quantitativa, considerada de baixo custo e de fácil execução. Com isso vários trabalhos têm utilizado essa técnica para avaliação do tecido após a criopreservação.

Alguns autores recomendaram que, na análise histológica, as alterações referentes a atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (JORIO, MARIANA, LAHLOU-KASSI, 1991; WOOD, MONTALI, WILDT, 1997). A técnica de histologia envolve as seguintes etapas: fixação, desidratação, clarificação, infiltração, inclusão, microtomia e coloração das lâminas. Em geral, os fixadores mais empregados são: paraformaldeído a 4% (SILVA et al., 2004a, SILVA et al., 2004b), bouin (CUSHMAN et al., 2001; NILSSON, SKINNER, 2002) e carnoy (MATOS et al., 2004). As colorações mais empregadas são: hematoxilina-eosina (HE) (VENDOLA et al., 1999; NILSSON e SKINNER, 2002) e Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina) (CUSHMAN et al., 2001; SILVA et al., 2004a, SILVA et al., 2004b). Além disso, existem diversos trabalhos em que os folículos foram inclusos em resina e, por fim,

corados com azul de toluidina (ABIR et al., 1997, WANDJI et al., 1996; YU e ROY, 1999) ou Giemsa (HEMAMALINI et al., 2003; MATOS et al., 2007).

4.2. Imunomarcadores para avaliação do tecido ovariano:

4.2.1. NF –kB (factor nuclear kappa B)

NF-kB é um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição, ele pode ser encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvida na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos. (GILMORE, 1999). NF-kB desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção. A regulação incorreta de NF-kB tem sido ligada a doenças inflamatórias e auto-imunes, choque séptico, infecção viral e também a desenvolvimento imunitário impróprio (ALBENSI, MATTSON, 2000; MERCURIO et al. 1999). NF-kB também atua na sobrevivência e proliferação celular, apoptose e funcionamento do SNC (XIAO, 2004; MERCURIO et al., 1999).

O fator de transcrição NF-kB foi originalmente descrito em linfócitos B maduros como sendo responsável pela transcrição do gene da cadeia leve kappa da imunoglobulina, de onde advêm seu nome (SEN, BALTIMORE, 1986). Durante algum tempo, acreditou-se que ele fosse exclusivo de linfócitos B maduros e presente no núcleo destas células. Mais tarde, observou-se que o NF-kB, está presente na grande maioria das células, no citoplasma, associado a uma proteína inibitória, a I κ -B, dessa forma, permanecia inativo a maior parte do tempo (SEN, BALTIMORE, 1986). E, portanto é um marcador de dano tecidual, sem especificar a origem ou o mecanismo do dano.

4.2.2. 4-HNE (4-hidroxinonal)

O 4-HNE é um importante marcador biológico que tem sido utilizado em diversas pesquisas, pois está associado a mecanismos fisiológicos e patológicos do nosso organismo, tais como o câncer, a doenças neurodegenerativas e autoimunes, além da inflamação (CHEN et al., 2011; WEBER et al., 2013), sendo um dos indicadores mais importantes do processo da peroxidação lipídica, sendo considerado o mais estável (UCHIDA, 2003), e por isso sendo usado para a caracterização do dano oxidativo.

O 4-HNE é um metabólito que possui capacidade para se difundir para os tecidos circundantes, sendo considerado um mensageiro do processo inflamatório (CHEN et al., 2011; KEEBLE et al., 2000; SETA et al., 2013; TYMOFIYEVA et al., 2007; VENCOVSKY et al., 2003; RAHMAN et al., 2002). O 4-HNE é produzido durante o processo inflamatório e pouco se conhece sobre a sua atuação nos elementos celulares articulares, mas já se verificou sua atividade quimiotática para células inflamatórias que produzem formas reativas de oxigênio e aumentam a concentração no líquido sinovial deste metabólito, que conseqüentemente induzem alterações patológicas articulares (TYMOFIYEVA et al., 2007).

4.2.3. Nitrotirosina

A nitrotirosina é um biomarcador de dano protéico utilizado também para a caracterização do dano oxidativo (KARIHTALA, 2011).

Em vários estudos encontramos referências sobre a expressão da Nitrotirosina, como elemento presente em diversos tecidos neoplásicos, associados a alto grau de malignidade celular, neoangiogênese, isquemia, inflamação, e invasão tecidual (KLOTZ et al. 1998; VERHAGEN et al. 2002).

4.2.4. Ki 67

O Ki-67 é um marcador localizado no núcleo celular e é bastante utilizado para identificar células em proliferação celular, sendo este um anticorpo monoclonal (WHITE, SMITH, SMITH, 1994).

No início da década passada, uma análise detalhada do ciclo celular revelou que o antígeno para a proteína Ki67 estava presente no núcleo das células em todas as fases do ciclo (G1, S, e G2), inclusive na mitose, entretanto, células quiescentes ou em repouso na fase G0 não expressam o Ki67. Devido ao fato do Ki67 estar presente em todas as células em proliferação (células normais ou tumorais), após esse estudo, essa proteína rapidamente se tornou um excelente marcador para determinar a proliferação de uma determinada população celular (SCHOLZEN, GERDES 2000). Atualmente, vários autores têm utilizado a expressão do Ki67 para avaliação de proliferação celular em tecidos ovarianos (VANACKER et al., 2013).

5. Reimplante do tecido ovariano

Após um período indeterminado de congelamento, o tecido ovariano pode ser removido do nitrogênio líquido e reimplantado com o objetivo de recuperar sua atividade. De acordo com o tecido e com o organismo que o recebe, o transplante pode ser classificado em xenotransplante (quando realizados em espécies diferentes), alotransplante (quando ocorre em animais da mesma espécie) e autotransplante (quando o doador é o mesmo receptor). O transplante também pode ser classificado de acordo com o local anatômico do implante, ortotópico quando se implanta o tecido no mesmo sítio de origem, ou heterotópico, quando se implanta o tecido em uma região distinta da original (AKAR, OKTAY, 2005).

Nos anos 50, surgiram diversas pesquisas a respeito da criopreservação e transplante de ovários. Em 1956, Parkes mostrou a restauração da função endócrina após transplante autólogo de ovário em ratas. Devido à falta de aplicabilidade clínica, esse método de preservação da fertilidade ficou somente no campo das pesquisas por aproximadamente 30 anos, até que em 1994, Gosden e colaboradores obtiveram sucesso restaurando a fertilidade em ovelhas após transplante autólogo de tecido ovariano congelado/descongelado e mostrou novas perspectivas, especialmente como estratégia para preservar a função ovariana em mulheres com câncer.

O transplante de tecido ovariano já é uma realidade em clínicas de reprodução assistida (OKTAY, TURKCUOGLU, RODRIGUEZ-WALLBERG 2011). Essa técnica de reimplante oferece como principais vantagens a restauração da função reprodutiva e esteroidogênica da paciente submetida à tratamentos potencialmente esterilizantes por motivos diversos. A associação entre a criopreservação e o reimplante tem sido realizada em várias espécies. Muitos estudos evidenciaram que as funções dos ovários podem ser restabelecidas, incluindo crescimento folicular (DEMEESTERE et al., 2006), produção hormonal esteroidal (ANDERSEN et al., 2008; CAMPOS et al., 2011), bem como gestações a termo (SALLE et al., 2003) e nascimentos de filhos vivos tanto em animais (GOSDEN et al., 1994) como em humanos (DONNEZ et al., 2004; JENSEN et al., 2016). Alguns autores já conseguiram com os reimplantes ortotópico e heterotópico a restauração da função esteroidogênica, ciclos menstruais normais com gravidez espontânea, embriões viáveis por procedimentos de reprodução assistida e nascidos vivos (DONNEZ et al., 2004; OKTAY, KARLIKAYA, 2000; CALLEJO et al., 2001; RADFORD et al., 2001; DEMEESTERE et al., 2006; SÁNCHEZ-SERRANO et al.,

2010; ERNST et al., 2010). Aparentemente os principais obstáculos para o sucesso da restauração da fertilidade a partir do córtex ovariano congelado/descongelado são: a realização de um novo procedimento cirúrgico para o reimplante, o não reimplante de células malignas presentes no tecido criopreservado e as aderências e dano isquêmico maciço aos folículos até o desenvolvimento da neovascularização (TAO, DEL VALLE, 2008; LIU et al., 2002).

A maioria dos folículos que sobrevivem à criopreservação sofre isquemia durante o tempo necessário para neovascularização (KUWAYAMA et al., 2005). Desde então, o congelamento de tecido ovariano por técnicas de criopreservação têm sido motivo de inúmeras pesquisas e existem dados recentes mostrando recuperação completa da função gonadal após transplantes de isoenxertos em camundongos, ratos, ovelhas, primatas (OEHNINGER, 2005) e humanos (DONNEZ et al., 2004; JENSEN et al., 2016), inclusive com nascimento de prole sadia. O reimplante em si, independente do congelamento prévio do tecido, parece ser bastante promissor com relação ao restabelecimento da função gonadal global, embora os relatos tenham um tempo curto de seguimento (SÁNCHEZ et al., 2007).

O reimplante do tecido criopreservado permite avaliar a neovascularização que se desenvolve após o enxerto, bem como características de viabilidade do tecido através da identificação de atividade folicular (proliferação celular), outras avaliações relacionadas ao metabolismo celular e até mesmo a avaliação de desfechos reprodutivos em mamíferos não humanos.

2. Justificativa

Os tratamentos utilizados contra o câncer têm resultado em altas taxas de cura e sobrevivência, contudo esses tratamentos são extremamente gonadotóxicos levando à infertilidade em muitos dos casos (DONNEZ et al., 2013a). Neste sentido, a associação entre o reimplante e a criopreservação de tecido ovariano para a geração de óvulos viáveis à fertilização *in vitro* tem sido fortemente sugerida na prática de preservação de fertilidade feminina (DONNEZ et al., 2004), neste sentido a identificação de um protocolo eficiente de criopreservação, seja de gametas ou tecido ovariano, torna-se imprescindível. O sistema OTC tem sido descrito com bons resultados em caprinos (CARVALHO et al., 2013), é prático e de fácil manejo.

Dessa forma, os experimentos propostos neste projeto visam avaliar a eficiência deste protocolo de congelamento em tecido ovariano murino em comparação a outros dois protocolos já utilizados, com objetivo translacional para a criopreservação de tecido ovariano humano.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da criopreservação sobre a viabilidade do tecido ovariano murino vitrificado por três diferentes protocolos, dentre eles o sistema OTC (*Ovarian Tissue Cryosystem*). E avaliar o impacto do reimplante heterotópico do tecido ovariano murino fresco e descongelado pelos mesmos protocolos sobre a sua viabilidade.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o tecido ovariano murino fresco e criopreservado, antes e após o reimplante heterotópico retroauricular, quanto a:

- Morfologia histológica através da análise por coloração de HE.
- Dano oxidativo analisando-se a imunomarcação pelo 4-HNE e nitrotirosina.
- Proliferação celular pela imunomarcação do Ki67 e
- Dano tecidual pela imunomarcação de NFκB.

4. Materiais e Métodos

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (CETEA, FMRP), sob o PROTOCOLO: 222/2014 e à Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP.

4.2 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo experimental em modelo animal, com amostras de tecido ovariano murino obtido de camundongos fêmea, da raça C57BL/6, do biotério central. O estudo foi realizado no laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no laboratório de patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.2.1 Delineamento experimental

Neste estudo foram incluídas 48 camundongos fêmea, com idade entre 6 e 8 semanas, às quais foram subdivididas em 4 grupos experimentais sendo eles: protocolo murino (PrM); protocolo humano (PrH); sistema OTC (PrOTC) e ao mesmo tempo o grupo frescos (GF) utilizado como controle, sendo que na etapa 1 foi realizada a avaliação da criopreservação sobre a viabilidade do tecido ovariano murino, pelos três protocolos de vitrificação. E na etapa 2 foi realizado a avaliação do impacto do reimplante sobre a viabilidade no tecido ovariano murino fresco e descongelado, após 15 e 30 dias, pelos mesmos protocolos de vitrificação (Figura 2).

4.2.1.1 Variáveis analisadas

Verificou-se a morfologia e a viabilidade do tecido ovariano de camundongos nos grupos controle, protocolo murino, protocolo humano e o sistema OTC, quanto ao dano oxidativo (nitrotirosina e HNE), dano tecidual em geral (NF-kB) e proliferação celular (Ki-67) nos tempos 0 e após 15 e 30 dias da realização do transplante.

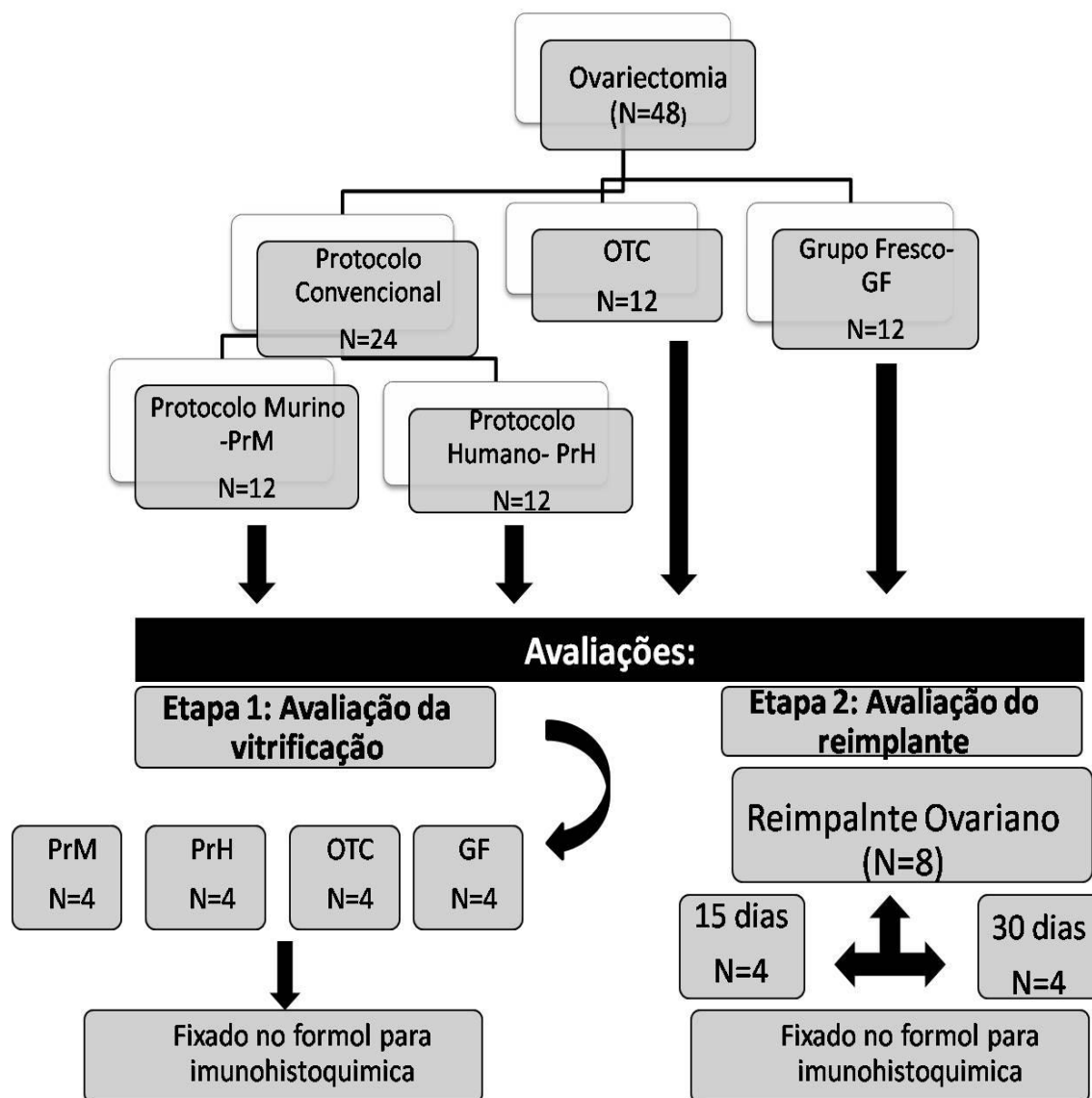


Figura 2. Delineamento experimental.

4.3 Preparo das amostras de tecido ovariano

Os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral conforme será descrito mais adiante. Os ovários coletados foram lavados em solução de KSOM tamponado com HEPES (SUMMERS et al., 1995) suplementado com BSA (0,5%). Os animais foram posteriormente mantidos em gaiolas em número de 4 a 6 animais, com alimentação e água *ad Libitum* para receber o enxerto do tecido criopreservado.

Em seguida, os fragmentos ovarianos foram criopreservados ou transplantados frescos, no mesmo animal (grupo fresco).

Na etapa 1, imediatamente após a ovariectomia completa, alguns dos fragmentos de tecido ovariano foram destinados para as análises de histologia clássica (grupo fresco) (Figura 3).

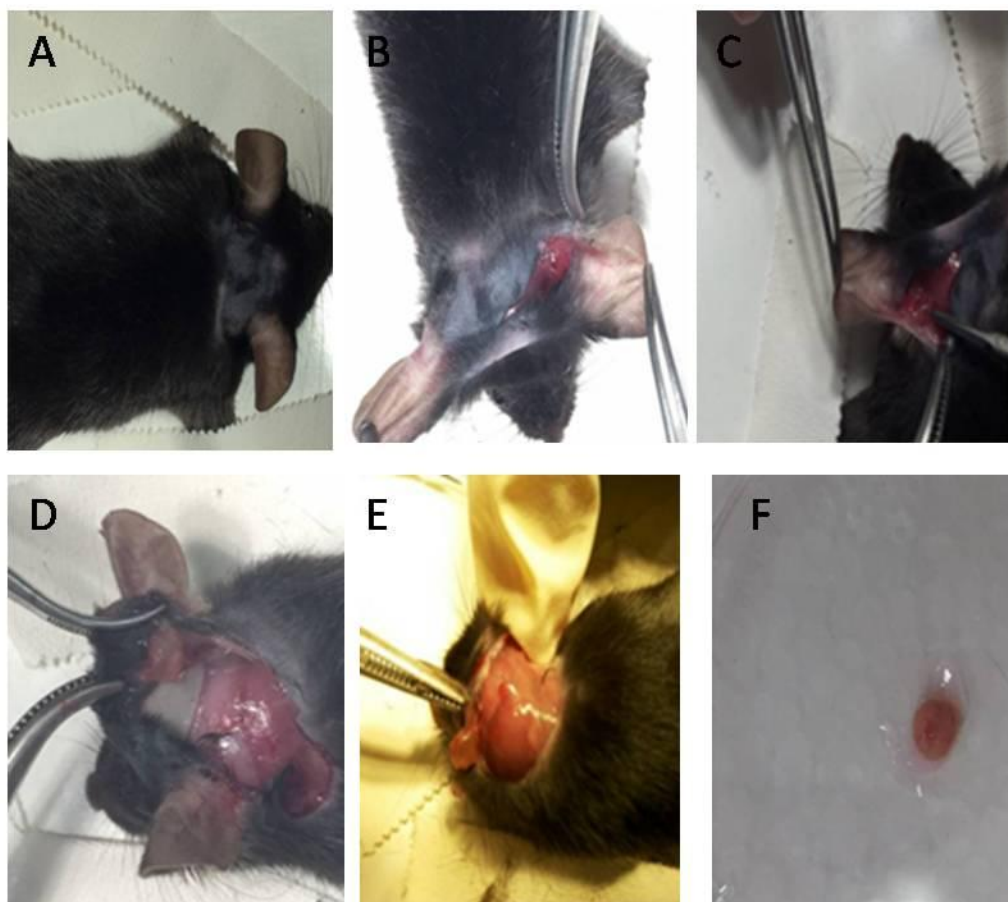


Figura 3. Retirada do ovário do reimplantado após 30 dias. (A) Camundongos fêmea, da raça C57BL/6 com reimplante após 30 dias. (B, C e D) Corte realizado na parte retroauricular, para exposição do ovário. (E) Ovário reimplantado foi visualizado. (F) Ovário foi retirado e fixado em formol para realização da imunohistoquímica.

4.4 Vitrificação /desvitrificação do tecido ovariano

Foram realizados três protocolos de vitrificação simultaneamente. Sendo que o primeiro descrito por Migishima e colaboradores (2003), utilizado para criopreservação de tecido ovariano murino. O segundo protocolo foi descrito para vitrificação de tecido ovariano humano descrito por Suzuki e colaboradores (2012), cuja utilização por Kawamura e colaboradores (2013) permitiu o nascimento de uma criança saudável após transplante. E o terceiro protocolo o tecido ovariano murino será vitrificado pelo sistema OTC, inclusive com a utilização deste recipiente específico conforme descrito por Carvalho e colaboradores (2013). (Figura 4).

4.4.1 Protocolo murino

Para a vitrificação de acordo com o protocolo descrito por Migishima e colaboradores (2003), os ovários foram expostos inicialmente a uma solução de equilíbrio constituída de meio MEM contendo DMSO (1M) à temperatura ambiente. Em seguida, 5 μ L de meio contendo os ovários foram transferidos para criotubos de

1mL em gelo a 0°C por 5 minutos. Então, 95µl de DAP (adaptado) foram adicionados em cada criotubo e, em seguida, estocados em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados à temperatura ambiente (37°C) por 30 segundos. Foram colocados 900µL de meio MEM contendo 0,25M de sacarose para a solução de descongelamento, perfazendo um total de 1mL no criotubo.

4.4.2 Protocolo humano

Para a vitrificação de acordo com o protocolo descrito por Suzuki e colaboradores (2012) os fragmentos ovarianos foram expostos inicialmente por 10 minutos em meio H199 suplementado com 20% de soro sintético substituto (SSS) e 1,61M de EG, transferido para o mesmo meio contendo 20% de SSS e 3,22M de EG por 10 minutos e, em seguida, exposto por 5 minutos ao meio H199 contendo 20% de SSS, 5,64M de EG, 5% de polivinilpirrolidona (PVP) e 0,5M de sacarose. Por fim, os fragmentos foram colocados em palhetas e imersos em nitrogênio líquido.

Após a crioestocagem, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 10 segundos e os tecidos transferidos para 1mL de meio H199 contendo 20% de SSS e 0,8M sacarose pré-aquecido a 37°C. Em seguida, foi realizada uma lavagem neste mesmo meio contendo 0,4M de sacarose e duas lavagens de 5 minutos cada em meio sem sacarose.

4.4.3 Sistema OTC

Na vitrificação por OTC (CARVALHO et al., 2013) (Figura 4) os fragmentos de tecido ovariano foram expostos às soluções de vitrificação dentro da própria cápsula, sendo inicialmente expostos por 4 minutos à uma solução de Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,25M de sacarose (SAC), 10% de etilenoglicol (EG – Dinâmica Química, Diadema-SP, Brasil) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Dinâmica Química, Diadema-SP, Brasil). Em seguida, a solução foi substituída por outra, cuja composição foi semelhante, com alteração apenas na concentração dos agentes crioprotetores (20% EG e 20% DMSO). Após 1 minuto a solução de vitrificação foi removida e o OTC contendo o tecido ovariano foi fechado e imerso em nitrogênio líquido.

Após a crioestocagem, os OTCs foram aquecidos à temperatura ambiente (~25°C) por 1 minuto e, em seguida, imersos em banho-maria (37°C) por 30 segundos. Posteriormente, os crioprotetores foram removidos utilizando três lavagens sucessivas,

com duração de 5 minutos cada, em meio MEM contendo BSA (10mg/mL) e concentrações decrescentes de sacarose (0,5; 0,25 e 0M).



Figura 4: *Ovarian Tissue Cryosystem*: Novo dispositivo em aço inoxidável para procedimento de vitrificação de tecido ovariano caprino. (A) OTC aberto, permitindo a visualização das três partes constituintes: base (a), inserto (b) tampa (c). Notar as perfurações na parte superior do inserto para facilitar a colocação e remoção de soluções. (B) Exposição do ovário à solução de vitrificação na base do OTC. (C) A inclusão do inserto na base do OTC permite a manipulação asséptica do inserto. (D) Fechamento da base com a tampa do OTC. (E) Crioestocagem do OTC contendo a amostra (CARVALHO et al., 2013).

4.4. Ovariectomia total bilateral e reimplante do tecido ovariano

Os animais foram anestesiadas utilizando Quetamina e Xilasina (50mg/mL), 0,4mg/g por peso corporal, i.p). Em seguida foi realizada uma incisão de 0,5cm através da parede abdominal para identificação dos cornos uterinos e permitir a identificação do tecido ovariano, sendo realizada então a ovariectomia bilateral. Os ovários inteiros, à fresco ou após congelamento e descongelamento, de cada animal foram reimplantados; com exceção do grupo OTC em que os fragmentos eram congelados vários no mesmo recipiente, cada animal recebeu enxerto autólogo, ou seja, o próprio ovário de volta.

O reimplante foi realizado na região retroauricular, bilateral (um ovário de cada lado), com uma incisão semi-circular de cerca de 3-5mm, com a colocação do tecido sem fixação. Para facilitar a identificação no tecido enxertado no momento da remoção

o local foi marcado com ponto de nylon 6-0. A sutura local foi feita em um único plano também como monocryl 4-0. Após 15 ou 30 dias do transplante os camundongos foram eutanasiado, para retirada dos fragmentos enxertados. O mesmo foi realizado para os tecidos vitrificados, pelos três protocolos distintos, sendo que após 3 a 7 dias do congelamento as amostras foram aquecidas e fixadas para a análise na Etapa 1 ou foram reimplantadas (Etapa 2) (Figura 2).

As paredes das incisões foram fechadas utilizando fio 5/0 (Ethicon, Somerville, NJ, USA) e a incisão da pele fechada utilizando fio de nylon. Antes dos animais regressarem à consciência foi realizada a analgesia utilizando carprofeno (5mg/kg, ip, Rimadyl, Dundee, RU) para fornecer alívio da dor pós-cirurgia.

4.5. Análise dos protocolos de criopreservação e do tecido ovariano transplantado

4.5.1 Técnica de imunohistoquímica

- As amostras de tecido ovariano foram fixadas em formol 10% (para prevenir autólise e manter a estrutura celular) e incluídas em parafina. Em seguida foram realizados cortes seriados com espessura de 4µm, uma lâmina foi corada com HE (hematoxilina e eosina) e as outras utilizadas para a imunohistoquímica.
- Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro do tipo silanizadas, para aumentar da aderência entre o corte tecidual e a lâmina.
- Para detecção dos marcadores foram utilizados os anticorpos primários da *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, USA) NF-kB, 4HNE, Ki67 e Nitrotirosina, conforme descrito na tabela 1
- As lâminas contendo os cortes dos tecidos foram desparafinizadas na estufa overnight e imersas em xilol I e xilol II por 10 minutos cada, e em seguida, foram submetidas a duas imersões em cada álcool 95%, 90%, 80%, e 70% simultaneamente e lavados em água corrente.
- Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica, em que as laminas foram incubadas em tampão citrato pH 6,0, pré aquecido de 95 a 99°C, por 40 minutos em uma panela de vapor. Logo após as lâminas foram resfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente e lavadas em solução salina tamponada (PBS) por duas vezes.
- A partir dessa etapa todos os procedimentos foram realizados em câmara úmida e foram utilizados os reagentes do kit *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection*

System, da Spring Bioscience (Pleasanton, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram, então, delimitadas com caneta hidrofóbica, e em seguida os cortes foram incubados com solução bloqueadora de peroxidase endógena por 15 minutos.

- Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente, contra corados com hematoxilina e lavados em água amoniacal.
- Por fim os cortes foram desidratados em uma serie de concentrações graduais de álcool e xilol.
- A montagem das lâminas foi feita com a utilização de *Permount* (Fisher Scientific, Pitsburgh, PA, USA) e lamínulas.

Tabela 1. Marcadores e suas respectivas diluições, marca do kit e controle utilizados na imunohistoquímica.

Marcador	Diluição	Marca kit	Produzido	Número catálogo	Controle
NF-kB	1:50	Cell signaling	Coelho	D14E12	Estômago
4HNE	1:50	Cell signaling	Coelho	ab46545	Estômago
Ki67	1:100	Cell signaling	Rato	D3B5	Mama
Nitrotirosina	1:50	Cell signaling	Rato	ab7048	Estômago

4.6 Análise Estatística

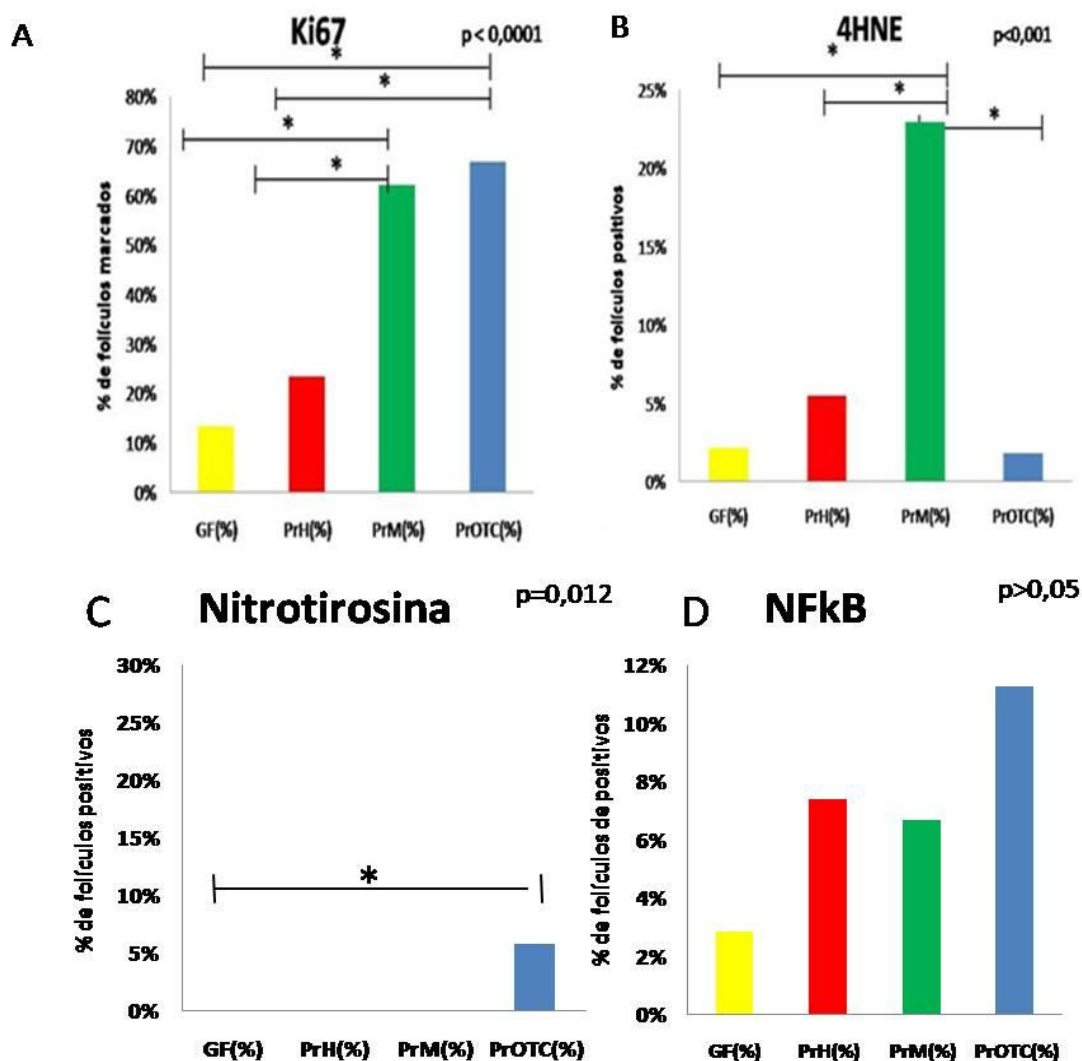
Os resultados foram obtidos com o auxílio do software SAS® 9.4, onde foram utilizados o teste qui-quadrado para verificar a distribuição entre os grupos, tempos ou imunomarcadores, sendo que o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. ETAPA 1- Efeito dos diferentes protocolos de vitrificação:

Os grupos dos protocolos OTC e murino foram os que apresentaram melhor desempenho em relação à proliferação celular (Ki-67) (Figura 5A). Não houve diferença entre os grupos em relação à quantidade de folículo degenerados entre os grupos de tecido descongelado e o tecido fresco. Entretanto, estes mesmos protocolos apresentaram graus variados de dano oxidativo quando analisados pela imunomarcagem de nitrotirosina, aonde o protocolo OTC teve maior marcação do que o tecido fresco (Figura 5C), portanto maior dano, e o protocolo murino teve maior marcação em relação ao HNE em comparação com os demais protocolos (Figura 5B). Não houve nenhuma diferença na marcação do NF-kB entre os grupos descongelados (Figura 5D).

Figura 5. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano após criopreservação entre os diferentes grupos.

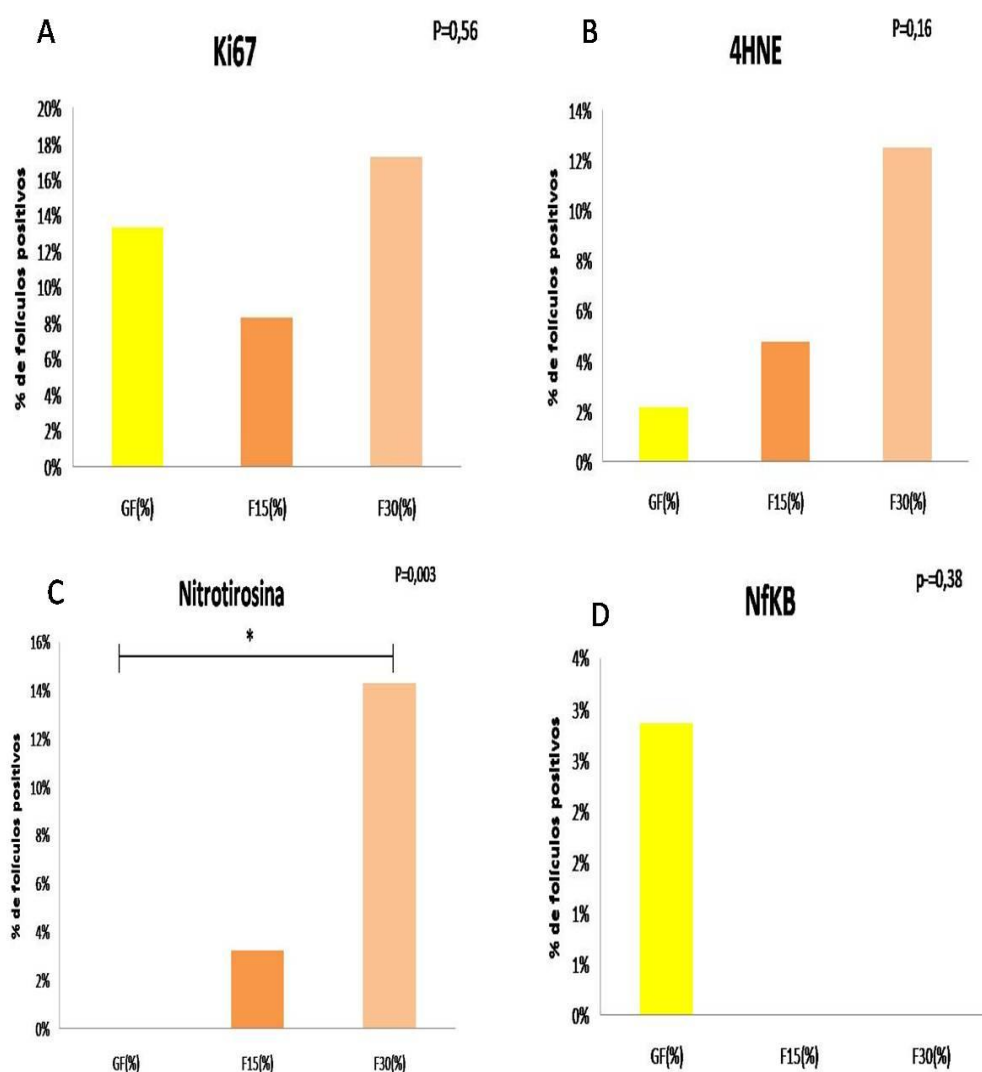


Legenda: GF= grupo fresco; PrH= protocolo humano; PrM=protocolo murino; PrOTC= protocolo OTC. (A) GF=PrH; GF<(PrOTC=PrM); PrH<(PrOTC=PrM) p<0,001; (B) (GF=PrH=PrOTC)<PrM p<0,01; (C) GF<PrOTC p=0,04 (D) Não houve diferença significativa p>0,05; (*) p<0,05.

5.2. ETAPA 2- Efeito do reimplante associado ou não à criopreservação:

Ao se avaliar a viabilidade, com base na proliferação celular, e o dano tecidual pelos marcadores HNE, nitrotirosina e NF-kB, comparando-se o tecido ovariano imediatamente após a ooforectomia com as amostras frescas após 15 e 30 dias do reimplante, verificou-se que não houve diferença do tecido reimplantado fresco em relação aos reimplantados, com exceção da nitrotirosina que apresentou-se mais expressa após 30 dias de reimplante ($p=0,0013$) (Figura 6).

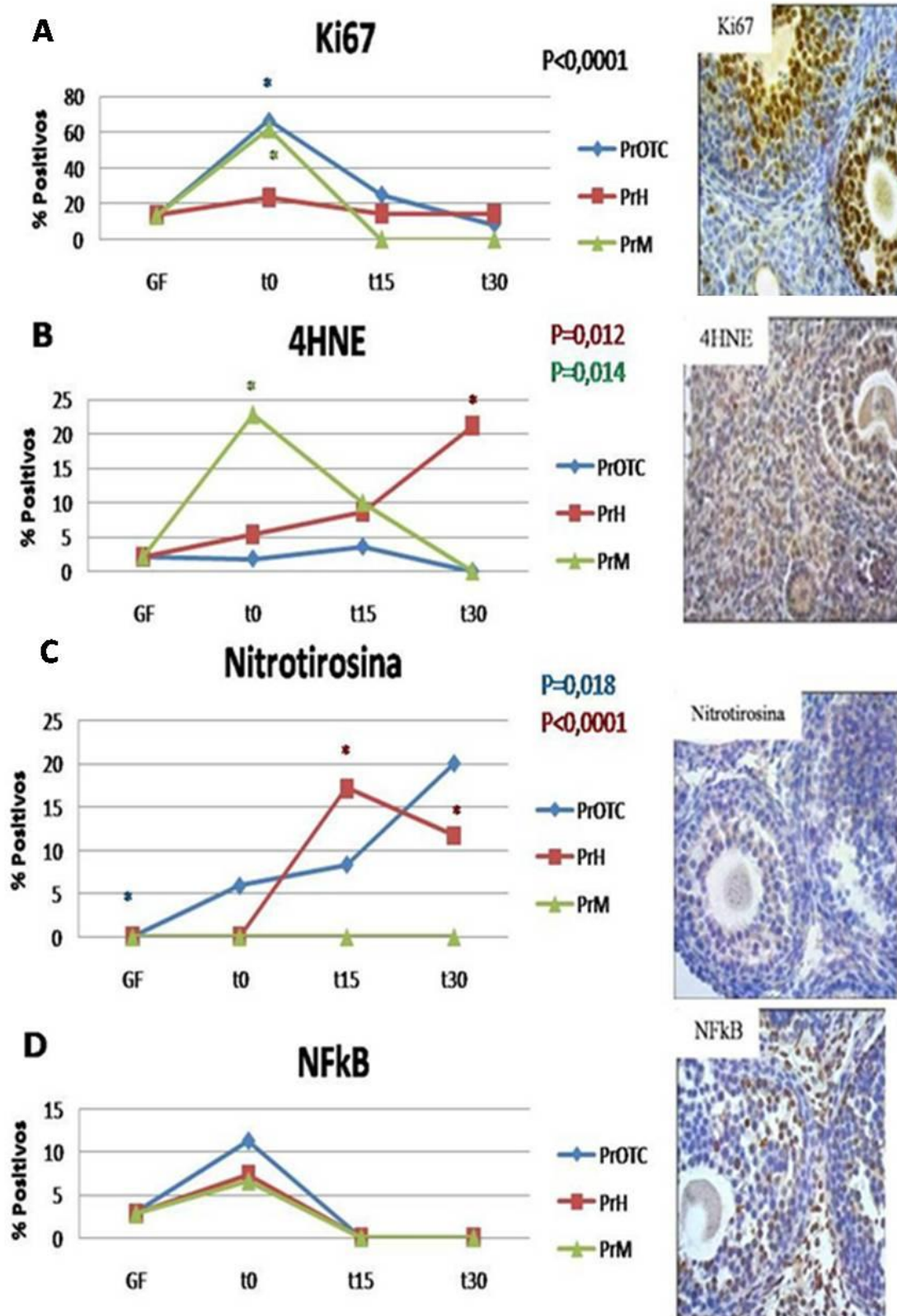
Figura 6. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano em relação ao grupo fresco no tempo 0, 15 e 30 dias do reimplante.



Legenda: GF= Grupo fresco; F15= Grupo fresco após 15 dias de reimplante; F30=Grupo fresco após 30 dias de reimplante. (A) Não houve diferença significativa $p<0,05$; (B) Não houve diferença significativa $p<0,05$; (C) $GF<F30$ $p=0,001$ (D) Não houve diferença significativa $p>0,05$; (*) $p<0,05$.

Resultados semelhantes foram observados para o protocolo OTC, embora o tecido após descongelamento sem reimplante (PrOTC t0) tenha apresentado taxas de proliferação celular maior que o controle fresco (Ki-67; $p < 0,0001$), e também maior dano oxidativo (nitrotirosina; $p = 0,018$). Esta menor marcação do tecido fresco para o Ki-67 e maior marcação para o HNE do tecido fresco também foi observada com relação ao tempo zero após descongelamento do tecido murino ($p < 0,0001$ e $p = 0,0026$, respectivamente); neste, entretanto, houve menor proliferação celular e maior dano tecidual após 15 ($p = 0,0012$) e 30 ($p = 0,0078$) dias de reimplante em relação ao pós-descongelamento imediato, sendo semelhantes entre estes dois últimos (PrM t15 = PrM t30). O protocolo humano, quando analisado pela imunomarcação do HNE e da nitrotirosina, apresentou dano progressivo do tecido após o reimplante em relação ao fresco e ao descongelamento imediato, porém sem progressão do dano entre 15 e 30 dias (Figura 7). Não houve diferença na marcação do Ki-67 e do NF-kB entre os tempos do protocolo humano.

Figura 7. Proliferação celular (Ki-67) e dano tecidual (nitrotirosina, HNE e NF-kB) nos três protocolos (PrM, PrOTC e PrH) analisados à fresco, após o descongelamento e após o reimplante retroauricular.

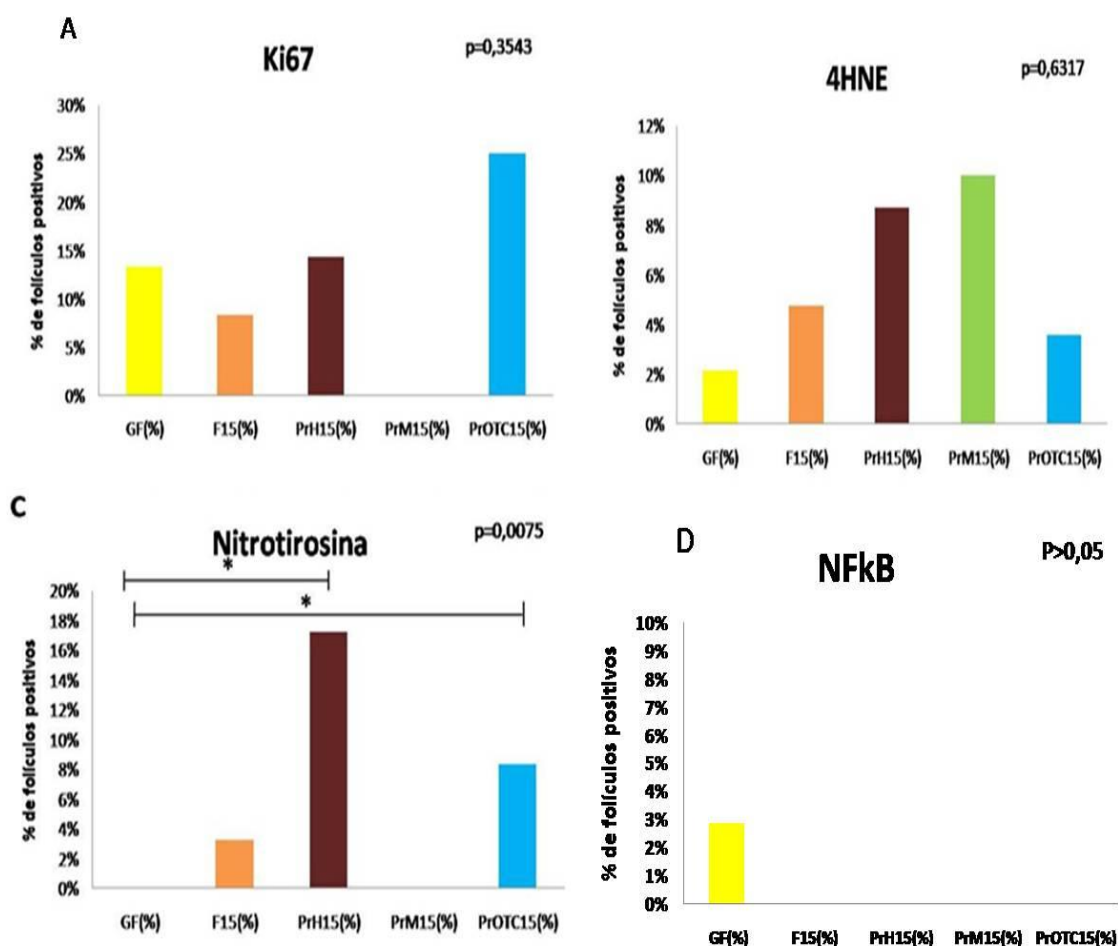


Legenda: GF= grupo fresco; t0= Protocolo criopreservado; t15= Protocolo após 15 dias de reimplante; t30= Protocolo após 30 dias de reimplante; (A) PrM e PrOTC= GF<t0 p<0,0001 e t0>t15 e t30 p<0,0001; (B) PrM= GF>t0 p=0,002; PrH= (GF=t0)<t30 p<0,005; (C) PrOTC= (t0=t15=t30)<GF p<0,01; (GF=t0)<t15 e t30 p<0,003; (D) Não houve diferença significativa p>0,05; (*) p<0,05.

Na comparação entre os protocolos nos diferentes tempos verificou-se que após 15 dias de reimplante a proliferação celular era igual entre os grupos, inclusive o fresco sem reimplante, indicando boa viabilidade tecidual (Ki-67; $p=0,35$) (Figura 8A). Esse dado é corroborado pelo número de folículos degenerados que também foi semelhante entre os grupos ($p=0,31$).

Já com relação ao dano tecidual sofrido pelo tecido após 15 dias do reimplante, verificamos que o HNE e o NF-kB não foram diferentes entre os grupos ($p=0,63$ e $p=0,67$ respectivamente) (Figura 8B e D). Já nitrotirosina foi mais sensível ao detectar alterações de dano tecidual, sendo que o protocolo humano e PrOTC tiveram maior marcação em relação ao tecido fresco, embora esta diferença não ocorra com relação ao tecido fresco reimplantado após 15 dias (Figura 8C).

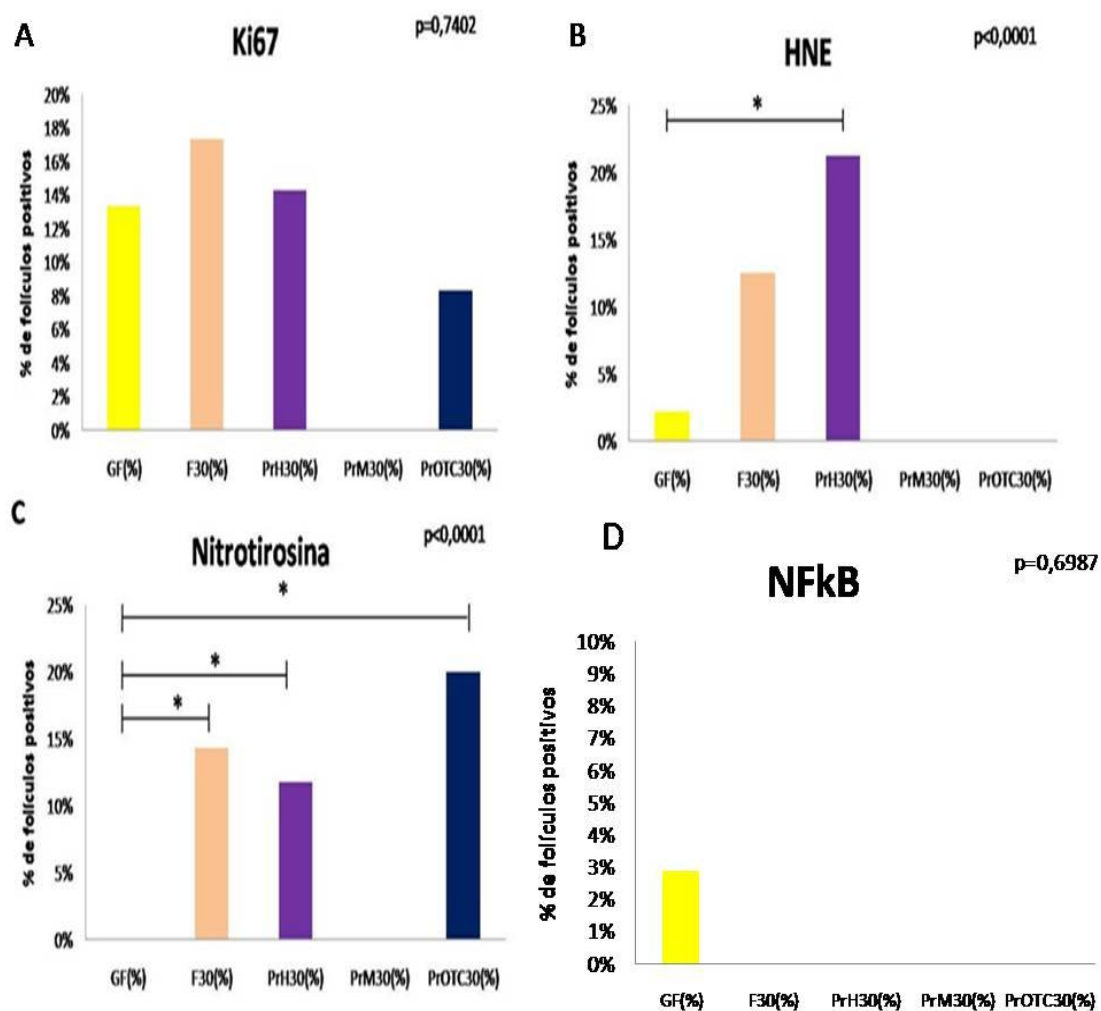
Figura 8. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano entre os diferentes grupos após criopreservação e 15 dias de reimplante.



Legenda: GF= grupo fresco; F15= Grupo fresco após 15 dias de reimplante; PrH15= Protocolo humano após 15 dias de reimplante; PrM15= Protocolo murino após 15 dias de reimplante; PrOTC15= Protocolo OTC após 15 dias de reimplante. (A) Não houve diferença significativa $p>0,05$; (B) Não houve diferença significativa $p>0,05$; (C) $GF < (PrOTC15 = PrH15)$ $p < 0,01$; (D) Não houve diferença significativa $p > 0,05$; (*) $p < 0,05$.

Entretanto, esta diferença não se refletiu no grau de proliferação celular, uma vez que a imunomarcação do Ki-67 foi semelhante entre os grupos e em comparação com o controle fresco (Figura 9A). Nesta mesma avaliação, houve diferenç a na intensidade do dano tecidual entre os diferentes protocolos, sendo que o protocolo humano apresentou a maior marcação de HNE e nitrotirosin, j a os grupos murino e OTC manifestaram maior dano oxidativo apenas pela intensidade de nitrotirosina e de HNE superior   do tecido fresco (Figura 9C e B). Não houve diferenç a na imunomarcação do NF-kB entre os grupos (Figura 9D).

Figura 9. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano entre os diferentes grupos após criopreservação e 30 dias reimplante.



Legenda: GF= grupo fresco; F30= Grupo fresco após 30 dias de reimplante; PrH30= Protocolo humano após 30 dias de reimplante; PrM30= Protocolo murino após 30 dias de reimplante; PrOTC30= Protocolo OTC após 30 dias de reimplante. (A) Não houve diferenç a significativa $p>0,05$; (B); $GF<PrH30$ $p=0,005$; (C) $GF<(F30=PrH30=PrOTC30)$ $p<0,001$; (D) Não houve diferenç a significativa $p>0,05$; (*) $p<0,05$.

6. Discussão

Este estudo avaliou o impacto de diferentes protocolos de vitrificação sobre a vitalidade do tecido ovariano criopreservado. Para esta finalidade em um primeiro momento analisou-se marcadores de proliferação celular e ao mesmo tempo de dano tecidual imediatamente após o descongelamento do tecido, com objetivo de identificar qual protocolo melhor mantém a vitalidade das células com o mínimo dano possível. E num segundo momento buscou se avaliar a manutenção da capacidade funcional do tecido ovariano descongelado e reimplantando nos animais de origem, observando-se a manutenção ou não da capacidade do folículo em proliferar e se desenvolver e no grau de dano tecidual após o reimplante. Desta maneira procurou-se diferenciar o dano secundário ao congelamento, do dano secundário ao próprio enxerto.

Ao se avaliar exclusivamente o congelamento, através da marcação pelo Ki-67, que representa a capacidade de proliferação celular do tecido, verificamos que o PrOTC e o PrM foram os que apresentaram maior marcação, sendo esta inclusive maior que do próprio tecido fresco. A primeira ideia foi a de que haveria alguma inadequação com relação às amostras frescas, sendo que estas deveriam ser as com maior atividade proliferativa por encontrarem-se “in natura”, sem intervenção que causasse injúria. Entretanto, dados de Tanaka e colaboradores (2018) mostraram uma taxa média de proliferação do tecido ovariano avaliado pela marcação do Ki-67 de cerca de 1,55 a 3,04% dos folículos totais, ou seja, baixa atividade proliferativa dos folículos, semelhante ao que identificamos no grupo fresco, sem intervenção, neste estudo. A baixa marcação do Ki-67 no tecido fresco pode ser explicada pelo fato de que o antígeno da proteína Ki67 está presente no núcleo das células em todas as fases do ciclo (G1, S, e G2), inclusive na mitose, porém nas células quiescentes ou em repouso (fase G0) não expressam esta proteína (SCHOLZEN, GERDES 2000); sendo assim os folículos do protocolo fresco poderiam estar em repouso e não necessariamente com viabilidade comprometida, até porque os resultados dos marcadores de dano oxidativo (HNE e nitrotirosina) e de dano celular em geral (NF-kB) apresentam-se semelhantes entre os grupos fresco e criopreservados no tempo zero pós-descongelamento.

A marcação folicular com Ki-67 neste estudo foi identificada tanto em oócitos quanto em células da granulosa. As células da granulosa folicular têm sido apontadas como um dos principais marcadores de vitalidade folicular, uma vez que são muito mais sensíveis do que o próprio oócito quando submetidas a condições de estresse. Acredita-se que o dano aos folículos quiescentes no ovário em situações de quimioterapia ocorreria muito mais por agressão e dano às células somáticas foliculares do que ao

próprio oócito, o que indiretamente inviabilizariam a sobrevivência do folículo (MEIROW et al., 2008). Neste sentido, outra explicação para uma maior proliferação nos grupos PrOTC e PrM seria o aumento acentuado de folículos em atividade proliferativa por um efeito conhecido como “Burn Out”, o qual supõe que a retirada do tecido ovariano de seu ambiente nativo, aonde ele está sob efeito de substâncias inibitórias para manutenção do pool de reserva folicular quiescente, promoveria o recrutamento e ativação maciça dos mesmos e secundariamente a queima precoce da população folicular (ABIR et al., 2017). Este processo poderia ser justificado neste caso por uma ineficiência da vitrificação em manter o estado “latente” do tecido durante a criopreservação. Corroborando esta teoria, estes dois protocolos, murino e PrOTC, foram os que apresentaram indícios de maior dano tecidual pelos marcadores HNE, no caso do protocolo murino, e nitrotirosina no caso do PrOTC, quando comparados ao tecido fresco pré-reimplante.

O efeito do reimplante em si, pôde ser testado pelo enxerto heterotópico de amostra ovariana fresca, imediatamente após a ooforectomia, reavaliada após os mesmos 15 e 30 dias do reimplante. Verificou-se que a proliferação celular foi semelhante entre os tempos, quando avaliada pelo Ki-67, bem como a marcação para o dano tecidual pelos três marcadores utilizados (HNE, nitrotirosina e NF- κ B), exceto pela amostra à fresco com 30 dias de reimplante que apresentou elevação da marcação pela nitrotirosina, sem aumento do número de folículos degenerados. Estes resultados sugerem uma boa resposta do tecido em curto prazo após o reimplante e algum dano no tecido após 30 dias, podendo demonstrar a dificuldade na manutenção da funcionalidade do tecido após um enxerto.

Vários fatores influenciam no funcionamento de um tecido enxertado, seja este transplante autólogo ou heterólogo. Todas as amostras deste estudo, tanto tecido fresco quanto criopreservado, teve o reimplante realizado no próprio animal, exceto no PrOTC (autotransplante), o que minimiza o risco de reação e agressão ao tecido. E o tipo de reimplante realizado foi o heterotópico, quando se implanta um tecido em uma região distinta àquela da região doadora. Entretanto, para uma “pega” adequada do enxerto há demanda de boa vascularização, sendo este um grande obstáculo no transplante de tecido ovariano, pois gera perda folicular imediatamente após o enxerto, possivelmente devido à lenta neovascularização que leva à isquemia (ABRIR et al., 2017).

Em 2011 Abrir e colaboradores transplantaram fragmentos ovarianos humanos para o músculo das costas de camundongos imunossuprimidos, porém o número de

folículos recuperados após o enxerto foi limitado e o número de folículos atrésicos aumentou. (ABRIR et al., 2017; ABRIR et al., 2011). Já Yang e colaboradores (2006) mostraram sinais de desenvolvimento folicular em 100% dos ovários criopreservados e transplantados para a cápsula renal de camundongos. Neste estudo optamos pelo reimplante retroauricular pela facilidade técnica no procedimento de reimplante e também baseado em resultados prévios descritos por (WIETCOVSKY, et al., 2018) que evidenciaram boa vitalidade do tecido enxertado, resultados estes reproduzidos em nosso estudo no grupo de tecido fresco.

Ao se avaliar o impacto do reimplante sobre as amostras de tecido após o descongelamento ao longo do tempo verificou-se que a proliferação celular foi semelhante entre os protocolos após 15 dias, sendo inclusive igual ao tecido fresco cultivado, indicando boa viabilidade celular em todos; resultado semelhante foi observado em relação ao reimplante após 30 dias. Estes dados estão de acordo com os reportados por Candy, Wood e Whittingham (1995) em que foi observada a sobrevivência de todos os fragmentos de tecido ovariano reimplantados após o emprego de protocolo de criopreservação lento em camundongos.

Scalercio (2015) e por Luyckx (2015) e seus colaboradores demonstram que a expressão de Ki67 em folículos em crescimento (primário, secundário e antral) refletiu a habilidade desses folículos em continuarem seu desenvolvimento e poderem assumir um estado folicular saudável. Scalercio (2015), que também avaliou tecido ovariano após a criopreservação, demonstrou que a análise com Ki67 mostrou marcação nas células da granulosa indicando que a capacidade proliferativa permaneceu ativa, independente da criopreservação (tecido fresco ou vitrificado).

Em outro estudo publicado por Luyckx e colaboradores (2013), a porcentagem de proliferação celular positiva em tecido ovariano criopreservado após o descongelamento imediato foi de 1,03%, ou seja, baixo, como reportado neste estudo para os tecidos frescos e de protocolo humano, com aumento das taxas de proliferação para 17,30% após o enxerto (LUYCKX et al., 2013). Estes dados sugerem uma retomada da proliferação celular após o reimplante do tecido, que parece ser iniciada de maneira intensa, novamente aqui poderíamos atribuir a um efeito “burn out” sobre este tecido. Em estudo anterior de nosso grupo verificou-se o aumento da proporção de folículos secundários e redução do número de folículos primários após sete dias de cultivo do tecido ovariano fresco ou após a vitrificação, sem que o congelamento prejudicasse este desenvolvimento (CAMPOS, 2012. Dados não publicados). Esse

efeito “Burn out” seria muito mais um produto do reenxerto do que do congelamento em si, uma vez que não houve diferença na taxa de proliferação celular entre os grupos fresco e todos os reimplantados após 15 dias e tampouco após 30 dias, exceto pelo protocolo humano que teve uma redução do Ki-67 após 30 dias de reimplante.

Também Ao se avaliar longitudinalmente a proliferação celular dentro de um mesmo grupo, ou seja, o tecido fresco e descongelado em cada protocolo ao longo do tempo (t0, t15 e t30), verifica-se que os PrOTC e murino fazem um pico da atividade proliferativa no pós descongelamento imediato (t0) a qual se reduz ao longo do tempo, mas sem diferença com o tecido fresco cultivado nos mesmos tempos, sugerindo que o estado proliferativo intermediário é que seria o mais próximo do fisiológico. Desta maneira, verifica-se que há adequada preservação dos tecidos, com os diferentes protocolos, com boa viabilidade após criopreservação e reimplante, principalmente dos tecidos vitrificados com protocolo murino e PrOTC em relação aos reimplantes. Por mais que haja um eventual efeito “Burn out” nos primeiros momentos pós descongelamento, este processo é recuperado e a viabilidade se mantém após 15 e 30 dias do reimplante. Estes resultados se assemelham ao encontrado por Lee e colaboradores (2005) que obtiveram sucesso no transplante de tecido ovariano fresco (73%) e criopreservado (62%) de ratas estudadas

A manutenção da capacidade proliferativa verificada após a vitrificação não garante ausência de dano destes procedimentos sobre a amostra preservada, e de fato, apesar da aparente conservação adequada do tecido pôde-se medir algum grau de dano oxidativo após o reimplante nos tecidos criopreservados. O protocolo murino manteve marcação igual à do grupo fresco para todos os marcadores de dano tecidual, sugerindo ser este o protocolo com menor impacto sobre o tecido, tanto após 15 como após 30 dias do reimplante. O PrOTC apresentou marcação maior que o tecido fresco após 15 dias e 30 dias de reimplante na avaliação pela nitrotirosina, porém sem alteração dos demais marcadores. Já o protocolo humano apresentou sinais de dano tecidual após 15 (de acordo com a marcação pela nitrotirosina) e após 30 dias (pela marcação da nitrotirosina e HNE), além de menor Ki-67 como já descrito acima. Sendo assim, neste estudo, apesar do reimplante de tecido fresco não sugerir impacto significativo deste procedimento sobre a vitalidade do tecido, quando este é realizado após a criopreservação há uma somatória de efeitos nocivos sobre a amostra que impacta no produto final.

Os marcadores escolhidos para a identificação de dano celular foram utilizados por outros autores (KLOTZ et al. 1998; VERHAGEN et al. 2002). Neste estudo a nitrotirosina mostrou-se um marcador mais sensível para a identificação de dano celular, mesmo que sem grande impacto sobre a sobrevivência dos folículos. Na avaliação das amostras após 15 dias do reimplante verificamos que somente a nitrotirosina foi capaz de identificar algum impacto negativo da vitrificação sobre as amostras, sendo este marcador mais expresso nos tecidos dos protocolos humano e PrOTC em relação ao fresco pré-reimplante; entretanto, tratou-se, provavelmente de dano leve, uma vez que não houve diferença nesta marcação ao se comparar o tecido fresco também reimplantado após 15 dias. A nitrotirosina é um biomarcador de dano protéico utilizado também para a caracterização do dano oxidativo (KARIHTALA, 2011), inclusive em um outro estudo deste o mesmo autor observou-se uma correlação entre o 4-HNE e a nitrotirosina com a progressão do dano oxidativo (KARIHTALA, 2006). Já o NF- κ B tem sido reportado mais como um marcador de dano oxidativo menos específico e tem sido associado em vários estudos à carcinogênese tecidual (HAI PING et al., 2016; ZHAO et al., 2015).

Segundo Isachenko e colaboradores (2006) a vitrificação pode causar alterações na morfologia dos folículos, resultando na sua incapacidade de manter uma taxa adequada de crescimento durante a cultura *in vitro*. Recentemente, um estudo mostrou que a vitrificação de folículos murinos levou à interrupção das comunicações intercelulares entre as células da granulosa e oócitos e retração oocitária (NASRABADI et al., 2015), o que pode interferir negativamente no crescimento folicular. O próprio processo de vitrificação pode ser uma das principais razões para a insuficiência na preservação de tecido ovariano, a contaminação com nitrogênio líquido com microorganismos e formação de cristais de gelo no interior das células podem trazer dano direto sobre a estrutura celular dos oócitos e células somáticas foliculares. Além de todos estes fatores as altas concentrações de crioprotetores, empregadas nesta técnica para a minimização do dano durante o processo de resfriamento na criopreservação, pode ser um problema. Neste estudo foram testados três protocolos de vitrificação distintos que se diferenciam basicamente pelo tipo e/ou concentração de crioprotetores utilizados, além do sistema OTC de armazenamento das amostras.

Os crioprotetores impactam de maneira distinta sobre o tecido a ser congelado. Um estudo realizado na espécie bovina, utilizando diferentes crioprotetores (EG, 1,2-propanodiol, DMSO e glicerol) mostrou que o EG nas concentrações de 1,5 e 3,0 M,

reduziu o percentual de folículos normais (LUCCI, et al. 2004). Neste estudo foi utilizado EG no PrH e no PrOTC, sendo que no PrOTC foram utilizadas doses baixas e no PrH doses sequencialmente altas. O PrH apresentou piores taxas de proliferação celular e maior dano oxidativo em comparação aos outros grupos, acreditamos que esse resultado se deva à ação tóxica desse crioprotetor em altas doses. Já o uso de DMSO tem resultados bastante contraditórios, enquanto alguns autores relatam baixa taxa de recuperação oocitária e degeneração folicular (KIM et al., 2006; CECCONI et al., 2004), outros relatam retomada da ciclicidade hormonal e da fertilidade com obtenção de gestação natural após o reimplante independente da dose utilizada (DEMEESTERE et al., 2006). Ele foi utilizado nos PrM e nos PrOTC, sendo que o protocolo murino foi o que apresentou menor impacto sobre a vitalidade do tecido, seguido pelo PrOTC. A sacarose, por sua vez, é utilizada com frequência na criopreservação por agir como um tampão osmótico e ajudar na remoção do crioprotetor intracelular (MANDELBAUM et al., 1988), esta foi utilizada apenas no PrOTC nesse trabalho, o qual apresentou melhores taxas de proliferação celular no folículo em relação aos outros grupos; fica, entretanto, a dúvida, se esta proliferação acelerada no t0 pós descongelamento no PrOTC foi consequente ao “Burn out”, e neste caso o protocolo não foi adequado para manter o repouso do tecido durante a criopreservação, ou se a alta atividade do tecido traduziu boa vitalidade.

Neste estudo objetivou-se testar o OTC como sistema para a criopreservação de tecido ovariano murino, dado sua praticidade. Embora observássemos um aumento da proliferação celular, podemos observar também um aumento de dano oxidativo nos folículos do PrOTC após criopreservação, resultado semelhante a vários trabalhos onde foi relatada uma diminuição nas taxas de folículos pré-antrais após a vitrificação (OSKAM, ASADI, SANTOS, 2010), esses resultados também foram encontrados por outros autores independente do protocolo de criopreservação aplicado (ISACHENKO et al., 2007; HUANG et al., 2008; ZHOU et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Tal diminuição pode ser causada pelo estresse osmótico ao qual as células são expostas durante a vitrificação (VAJTA et al., 1998), toxicidade de crioprotetores (AYE et al., 2010), comprometimento da membrana basal (GHETLER et al., 2006), outras alterações no nível iônico (GUALTIERI et al., 2011) ou molecular (DAVID et al., 2011) e vacuolização da ooplasma (OSKAM, ASADI, SANTOS, 2010). Porém em 2013 Oliveira e colaboradores observaram que a técnica OTC foi mais eficiente que as técnicas convencionais quando avaliaram a morfologia folicular após 7 dias de cultivo

in vitro e puderam avaliar também que vitrificação convencional reduz o número de folículos morfológicamente normais.

A vitrificação é uma técnica extremamente importante para a criopreservação porque a formação de cristal de gelo intracelular é evitada (KEROS et al., 2009), e pode ser realizada sem equipamento específico. Vários estudos mostraram que a vitrificação resultou em morfologia, viabilidade folicular (SANTOS et al., 2007) e densidade estromal (KEROS et al., 2009; TING et al., 2011) preservados. Os três protocolos comparados neste trabalho foram feitos por protocolos de vitrificação, porém há também diversos trabalhos que mostram resultados semelhantes utilizando-se congelamento lento em relação à preservação da morfologia folicular (ISACHENKO et al., 2009; KIM et al., 2011), ultraestrutura (KIM et al., 2011), porcentagens de células necróticas (RAHIMI et al., 2004) e revascularização tecidual após o transplante (RAHIMI et al., 2010). É válido reforçar que a maioria dos nascimentos após reimplante de tecido ovariano criopreservado em humanos hoje são advindos de protocolos de congelamento lento (DOLMANS, MANVELLA, 2018). Entretanto, estudos mais recentes demonstram que os protocolos de vitrificação, mais recentemente testados, preservam melhor a integridade do estroma ovariano (CAMPOS, 2012. Dados não publicados). Existe uma tendência na literatura a se preferir a vitrificação ao congelamento lento para conservação de gametas e tecido ovariano, uma vez que os cristais de gelo mais comumente formados nos protocolos de congelamento lento parecem trazer maior impacto sobre as células (AMORIM et al., 2011).

A criopreservação do tecido ovariano vem sendo realizada por mais de 20 anos e hoje é executado em todo mundo por vários autores (DONNEZ e DOLMANS, 2015; JENSEN et al., 2015; MEIROW et al., 2016; VAN DER VEN et al., 2016). Já foram descritos 130 nascidos vivos informados até o momento (DOLMANS, MANVELLA, 2018) e taxas de sucesso no reestabelecimento da função gonadal que variam de 30 a 70% após o autotransplante de córtex ovariano congelado-descongelado (DONNEZ et al., 2013, 2015; DITTRICH et al., 2015; JENSEN et al., 2015; MEIROW et al., 2016; VAN DER VEN et al., 2016). Muitos são os estudos comparando diferentes técnicas e protocolos, com diferenças de desempenho entre eles, porém, de maneira geral os resultados são bastante satisfatórios, sendo assim acreditamos que esse procedimento não deve mais ser considerado experimental. Pouco são os trabalhos que descrevem o seguimento em longo prazo das pacientes reimplantadas. O tempo de duração do enxerto e desfechos reprodutivos acumulados, bem como o impacto sobre a prole de

nascidos vivos foi ainda pouco explorada e merece atenção nas próximas décadas que se segue.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- Com relação ao impacto da vitrificação sobre tecido ovariano o protocolo murino foi o que apresentou menor impacto sobre a vitalidade do tecido, seguido pelo PrOTC.
- O reimplante retroauricular isoladamente não comprometeu a qualidade do tecido ovariano enxertado, o que pôde ser verificado pelo implante do tecido fresco e seu comportamento ao longo do tempo, com algum grau de comprometimento da amostra após 30 dias, sem aumentar o número de folículos degenerados.
- A criopreservação pré-reimplante sensibiliza o tecido a ser enxertado, deixando-o mais susceptível ao dano em graus variados de acordo com o protocolo. Os tecidos dos PrOTC e humano apresentaram aumento nos marcadores de dano após 15 e 30 dias de reimplante.
- O marcador mais sensível na identificação de dano tecidual foi a nitrotirosina.

Referências

ABIR R, et al. Attempts to improve human ovarian transplantation outcomes of needle-immersed vitrification and slow-freezing by host and graft treatments. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 5, pg. 633-644, 2017.

ABIR R, et al. Improving post transplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, pg. 1205-1210, 2011.

ABIR R, et al. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. **Fertility and Sterility**, v. 68, pg. 682-688, 1997.

ALBENSI BC, MATTSON MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. **Synapse**, n. 35, v. 2, pg. 151-9, 2000.

AKAR M, OKTAY K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 16, n. 8, pg. 374-380, 2005.

AMORIM CA, et al. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproduction Biomedicine Online**, v. 23, pg. 160-186, 2011.

ANDERSEN CY, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 23, pg. 2266-72, 2008.

ARNON J. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction Update*, v. 7, n.4, pg. 394-403, 2001.

AYE M, et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte, **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, pg. 1905-1912, 2010.

BANDEIRA FT, et al. Two methods of vitrification followed by in vitro culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, n. 2, pg. 177-185, 2015.

BARRITT J, et al. Report of four donor-recipient oocyte cryopreservation cycles resulting in high pregnancy and implantation rates. **Fertility and Sterility**, v. 87, n.1, 2007.

BLEYER WA. Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 38, n.1, pg. 1-10, 2002.

BORDES A, et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v. 20, n. 10, pg. 2745-2748, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

CALLEJO J, et al. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, pg. 4489-94, 2001.

CAMPOS JR. Avaliação da capacidade de desenvolvimento folicular do tecido ovariano criopreservado sob a influência do tempo de congelamento, 2012. Dados não publicados.

CAMPOS JR, et al. Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. **Clinics**, v. 66, n.12, pg. 2093-2097, 2011.

CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v. 10, pg. 2334-2338, 1995.

CARVALHO AA, et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 76, pg. 933-941, 2011.

CARVALHO AA, et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, v. 138, pg. 220-227, 2013.

CECCONI S, et al. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, pg. 12-17, 2004.

CELESTINO JJH, et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 108, pg. 309-318, 2008.

CHEN J, et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. **Pain**, n. 152, pg. 1165-72, 2011.

CHEN SU, et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**, v. 21, n. 9, pg. 2794-800, 2006.

COBO A, et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. **Clinical and Translation Oncology**, v.10, n.5, May, p.268-73. 2008.

CORLEY RA, et al. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for ethylene glycol and its metabolite, glycolic acid, in rats and humans. **Toxicological Science**, v. 85, pg. 476-490, 2005.

CORTVRINDT R, SMITZ J. *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 1, pg. 3-9, 2001.

COTICCHIO G, et al. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 21, pg. 1771 -1776, 2006.

CUSHMAN RA, et al. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. **Biology of Reproduction**, v. 65, pg. 581-586, 2001.

DAVID A, et al. Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks' xenotransplantation of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 95, pg. 1241–1246, 2011.

DEMEESTERE I, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, pg. 2010-14, 2006.

DITTRICH R, et al. Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryopreserved ovarian tissue in a single center. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, pg. 462-468, 2015.

DOBRINSKY J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animalembryos. **Theriogenology**, v. 57, pg. 285-302, 2002.

DOLMANS MM, et al. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, pg. 305-314, 2013a.

DOLMANS MM, MANAVELLA DD. Recent advances in fertility preservation. **The journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, 2018.

DOLMANS MM, et al. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 99, n.6, pg. 1514- 1522, 2013b.

DONNEZ J, DOLMANS MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, pg. 1167-1170, 2015.

DONNEZ J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, pg. 1405-1410, 2004.

DONNEZ J, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, pg. 519-535, 2006.

DONNEZ J, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v. 99, pg. 1503-1513, 2013.

EPPIG JJ, O'BRIEN MJ. Development *In Vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, pg. 197-207, 1996.

ERNST E, et al. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, pg. 1280-1, 2010.

FAIR T, et al. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, pg.817-832, 1997.

FAUSTINO LR, et al. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Animal Reproduction Science*, v. 122, pg. 90-97, 2010.

FIGUEIREDO JR, et al. Extracellular-matrix proteins and basement-membrane - their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. *Theriogenology*, v. 43, pg. 845-858, 1995.

FIGUEIREDO JR, et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, São Paulo: Livraria Roca, pg. 303-327, 2008.

FULLER B, PAYNTER S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*. v. 9, pg. 680-869, 2004.

GANDOLFI F, et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertility and Sterility*, v.85, pg. 1150-1156, 2006.

GERVÁSIO CG, et al. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2014.

GHETLER Y, et al. Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertility and Sterility*, v. 86, pg. 210-216, 2006.

GILMORE TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*, n. 18, v. 49, pg. 6842-4, 1999.

GORDON I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge: CAB International: Raven Press**, p.4349, 1994.

GOSDEN RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, pg. 125- 129, 2000.

GOSDEN RG, et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196° C. *Human Reproduction*, v. 9, pg. 597-603, 1994.

GUALTIERI R, 2011. Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. *Human Reproduction*, v. 26, pg. 2452-2460, 2011.

HAI PING P, et al. A sinalização IL-1 β / NF-kb promove o crescimento de células cancerígenas colorrectais através do eixo miR-181a / PTEN. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016.

HASEGAWA A, et al. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4, pg. 1182-1192, 2006.

HAY MR, CRAN DG, MOOR RM. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. **Cell and Tissue Research**, v. 169, n. 4, pg. 515-529, 1976.

HEMAMALINI NC, et al. Influence of transforming growth factor- α , insulin like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 50, pg. 11-22, 2003.

HERTING AT, ADAMS EC. Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. **The Journal of Cell Biology**, v. 34, pg. 647-675, 1967.

HIRSHFIELD AN. Rescue of atretic follicles *in vitro* and *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 1, pg. 181-190, 1989.

HORVATH G, SEIDEL JUNIOR GE. Vitrification of bovine oocytes chemically defined media after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v. 66, pg. 1026-33, 2006.

HOVATTA O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 2, pg. 331-342, 2003.

HUANG L, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. **European Journal Of Obstetrics Gynecology And Reproductive Biology**, v.139, n.2, pg.193- 198, 2008.

HULSHOF SCJ, et al. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, pg.78-80, 1994.

HYTTEL P, et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, pg. 23-32, 1997.

IRELAND JJ. Control of follicular growth and development. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v. 34, pg. 39-54, 1987.

ISACHENKO V, et al. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 3, pg. 741-747, 2006.

ISACHENKO V, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. **Cryobiology**, v. 55, n. 3, pg. 261-268, 2007.

ISACHENKO V. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, v.138, p. 319-327, 2009.

JEMAL A, et al. Global Cancer Statistics. **Cancer Journal Clinicians**, v. 61, n. 2, pg. 69-90, 2011.

JENSEN AK, et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2016.

JENSEN AK, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. **Human Reproduction**, v. 30, n. 12, pg. 2838-2845, 2015.

JORIO A, MARIANA JC, LAHLOU-KASSI A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 26, pg. 239-250, 1991.

KARIHTALA P, et al. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. **Histopathology**, v. 58, n. 6, pg. 854-62, 2011.

KARIHTALA P, et al. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 42, n.15, pg. 2653-2659, 2006.

KASAI M. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, pg.164-170, 2004.

KAWAMURA KK, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **PNAS**, pg. 1-10, 2013.

KEEBLE JE, et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. **Pain**, 2000.

KEROS V, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, pg. 1670-1683, 2009.

KIM S, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 61, n. 4, pg. 431-442, 2018.

KIM SS, BATTAGLIA DE, SOULES MR. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 6, pg. 1049-1056, 2001.

KIM SS, et al. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, pg. 1045-51, 2011.

KIM SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, pg.1-11, 2006.

KLOTZ T, et al. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**, v. 82, pg.1897-903, 1998.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v.67, n.1, pg.73-80, 2007.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v.11, n.3, pg.300-8, 2005.

IMHOF M, et al. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. **Fertility and Sterility**, v. 85, n, 1, pg. 1208-1215, 2006.

LEE RK, et al. Blastocyst development after cryopreservation, and subcutaneous transplantation of mouse ovarian tissue. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, n. 2, pg. 95-101, 2005.

LIEBERMANN, J, TUCKER MJ. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation. **Methods in Molecular Biology**, v. 254, pg. 345-64. 2004.

LIU HC, HE Z, ROSENWAKS Z. Mouse ovarian tissue cryopreservation has only a minor effect on in vitro follicular maturation and gene expression. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 20, n. 10, pg. 421-431, 2003.

LIU J, et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 17, pg. 605-11, 2002.

LIU J, et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vitro transplantation and in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, pg. 171-178, 2001.

LUCCI CM, et al. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, pg. 1101-1114, 2004.

LUCCI CM, et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, pg. 61-69, 2001.

LUYCKX V, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. **Fertility and Sterility**, v. 101, pg. 1149- 1156, 2015.

LUYCKX V, et al. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, n. 1, pg. 83, 2013.

MANDELBAUM J, et al. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. **Human Reproduction**, v. 2, pg. 709-715, 1988.

- MARKSTROM E, et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v. 123, pg. 23-30, 2002.
- MATOS MHT, et al. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v. 62, pg. 65-80, 2004.
- MATOS et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.4, pg. 433-442, 2007.
- Meirow D, et al. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. **Fertility and Sterility**, v. 106, pg. 467–474, 2016.
- MEIROW D, et al. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. **Human Reproduction**, v. 23, pg.1007–1013, 2008.
- MEIROW D, NUGENT D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 6, pg. 535-543, 2001.
- MERCURIO, F, et al. IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. **Molecular Cell Biology**, v. 19, pg. 1526–1538, 1999.
- MIGISHIMA F, et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, pg. 881-887, 2003.
- MONNIAUX D, et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, pg: 3-23, 1997.
- MORITA Y, TILLY JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, n. 1, pg. 1-17, 1999.
- NASRABADI HT, et al. Preservation of mouse ovarian tissue follicle morphology and ultra-structure after vitrifying in biotechnological protocols. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, pg.8-7, 2015.
- NEWTON H, et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.11, pg. 487-491, 1996.
- NEWTON, H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer, patients. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 237- 247, 1998.
- NILSSON EE, SKINNER MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 67, pg. 1018-1024, 2002.

OEHNINGER S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. **Journal of the Society for Gynecology Investigation**, v. 12, pg. 222–31, 2005.

OKTAY K, TURKCUOGLU I, RODRIGUEZ-WALLBERG KA. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: What is the explanation? **Fertility and Sterility**, v. 95, 2011.

OKTAY K, KARLIKAYA G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, pg. 1919, 2000.

OLIVEIRA FTB. Análise do desenvolvimento de folículos pré-antrais e da matriz extracelular ovariana após vitrificação de tecido ovariano ovino. 2013. Dados não publicados.

ONIONS VJ, et al. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. **Human reproduction**, v. 23, n. 3, pg. 606-618, 2008.

O'SHEA JD, HAY MF, CRAN DG. Ultrastructural changes in the theca interne during follicular atresia in sheep. **Journal of Reproduction**, v. 54, n.1, pg. 183-187, 1978.

OSKAM IC, ASADI BA, SANTOS RR. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing procedures. **Fertility and Sterility**, v. 93, pg. 2764–2766, 2010.

PARKES A.S. Survival time of ovarian homografts in two strains of rats. **Journal of Endocrinology**; v. 13, pg. 201-210, 1956.

PARMEGIANI L, et al. Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. **Human Reproduction**, v. 23, pg. 1771–1777, 2008.

PAYNTER S.J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction**, n. 5, pg. 449-456, 2000.

PEGG DE. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods. In: **Molecular Biology**, pg. 348, 2007.

RADFORD JA, et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. **Lancet**, v. 357, pg. 1172–1175, 2001.

RAHIMI G, et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, pg. 187- 193, 2004.

RAHIMI, G, et al. Revascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 149, n. 1, pg. 63- 67, 2010.

RAHMAN I, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 19, pg. 490–495, 2002.

RALL WF, REID DS, POLGE C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. **Cryobiology**, v. 21, pg. 106-121, 1984.

RODRIGUES APR, et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.1-2, Aug, p.211-27. 2004.

RUBINSKY B. Principles of low temperature cell preservation. **Heart Failure Reviews**,v. 8, pg. 277-284, 2003.

SALLE, B. et al. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 1, pg. 172-177, 2003.

SÁNCHEZ M, et al. Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results. **Human Reproduction**, v. 22, n. 3, pg. 786–791, 2007.

SANCHES, B.V. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, cultivados ou não na presença de Forskolin, 2009. (Dissertação Mestrado em ciência veterinária). Dados não publicados.

SÁNCHEZ-SERRANO M, et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, pg. 268, 2010.

SANTOS RR, et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 91, pg. 249–263, 2006a.

SANTOS RR, et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v. 325, pg. 523-531, 2006b.

SANTOS RR, et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, pg. 167-176, 2007.

SAUMANDE J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 157, pg. 29-38, 1981.

SAWYER HT, et al. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 66, pg. 1134-1150, 2002.

SCALERCIO SRRA, et al. Immunolocalization of Growth, Inhibitory, and Proliferative Factors Involved in Initial Ovarian Folliculogenesis From Adult Common Squirrel Monkey (*Saimiri collinsi*). **Reproductive Sciences**, v. 22, pg. 68-74, 2015.

SCARAMUZZI RJ, et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, pg. 459-478, 1993.

SCHOLZEN T, GERDES J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. **Journal of Cellular Physiology**, n. 182, pg. 311–322, 2000.

SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancerbinding protein NF-kB by a post-translational mechanism. **Cell**, v.47, pg. 921-928, 1986.

SETA N, et al. Platelet-Derived Stromal Cell-Derived Factor-1 Is Required for the Transformation of Circulating Monocytes into Multipotential Cells. **PloS One**, 2013.

SHARMA GT, et al. Vitrification of in vitro matured goat oocytes and the effect on in vitro fertilization. **Small Ruminant Research**, v. 64, pg. 82-86, 2006.

SHAW JM, ORANRATNACHAI A, TROUNSON AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, pg. 59-72, 2000.

SHAW JM, et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**.N. 161, pg. 103-110, 2000.

SILVA JRV, et al. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v.81, pg.273-286, 2004a.

SILVA JRV, et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, pg.1691-1704, 2004b.

SMITZ J, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 4, pg. 395–414, 2010.

SILVA JRV, et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, pg. 203-209, 2002.

SONGSASEN N, et al. Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, pg. 65-70, 2009.

SONMEZER M, SHAMONKI MI and OKTAY K. Ovarian tissue cryopreservation: Benefits and risks. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, pg. 125-132, 2005.

SUGIMOTO M, et al. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. **Theriogenology**, v. 53, pg. 1093-1103, 2000.

SUMMERS MC, et al. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biology of Reproduction*, v. 53, pg. 431–437, 1995.

SUZUKI N, et al. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. **Human Reproduction**, v. 27, pg. 2420–2429, 2012.

TANAKA A, et al. Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 44, n. 10, pg. 1947–1955, 2018.

TAO T, DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v. 25, n. 7, pg. 287–96. 2008.

TING AY, et al. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, pg. 2461–2472, 2011.

TYMOFIYEVA O, et al. Correlation of MRT imaging with real-time axiography of TMJ clicks. **Ann Anatomy**, pg. 356–61, 2007.

UCHIDA K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, n. 42, pg. 318–343, 2003.

VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, pg. 53–8, 1998.

VAN DEN HURK R, BEVERS MM, BECKER JF. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, pg. 73–82, 1997.

VAN DEN HURK R, ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, pg. 1717–1751, 2005.

VAN DEN HURK R, et al. Primate and bovine immature oocytes and follicles sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 5, pg. 457–474, 2000.

VAN DER VEN H, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. **Human Reproduction**, v. 31, pg. 2031–2041, 2016.

VANACKER, J et al. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 99, 2013.

VARGHESE AC, et al. Cryopreservation/ transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, pg. 47, 2008.

VENDOLA K, et al. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expresión and initiation of follicle development in the primate ovary. **Biology of Reproduction**, v. 61, pg. 353- 357, 1999.

VENCOVSKY J, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, n. 62, pg. 427-30, 2003.

VERHAGEN PCMS, et al. Prognostic factors in localized prostate cancer with emphasis on the application of molecular techniques. **European Urology**, v. 41, pg. 363-71, 2002.

WANDJI SA, et al. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, pg. 942-948, 1996.

WEBER D, et al. Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA-comparison of two primary antibodies. **Redox Biologia**, n. 1, pg. 226-33, 2013.

WIETCOVSKY L, et al. Ovarian tissue vitrification and heterotopic autologous transplantation in prepubertal Wistar rats. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 22, n. 2, pg. 116-122, 2018.

WHITE DM, SMITH AG, SMITH JL. Assessment of proliferative activity in leukaemic bone marrow using the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 3, pg. 209- 23, 1994.

WOOD TC, MONTALI RJ, WILDT DE. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, pg. 190-200, 1997.

YANG HY, et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**, v. 131, n. 5, pg. 851-859, 2006.

YU N, ROY SK. Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary in vitro: effect of insulin. **Biology of Reproduction**, v. 61, pg. 1558-1567, 1999.

XIAO, W. Advances in NF- κ B signaling transduction and transcription. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 1, pg. 425-433, 2004.

XU M, et al. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. **Tissue Engineering**, v. 12, pg. 2739-2746, 2006.

ZHANG JM, et al. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, pg. 137-142, 2009.

ZHAO S et al. O LDOC1 inibe a proliferação e promove a apoptose reprimindo a ativação do NF- κ B no carcinoma papilífero da tireoide. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, pg. 1-12, 2015.

ZHOU XH, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, v. 60, pg. 101- 105, 2010.

Artigo Científico

“Regeneração da função gonadal após reimplante de tecido ovariano vitrificado pelo Sistema *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) e outros dois protocolos na espécie murina”

Regeneration of the gonadal function after reimplantation of ovarian tissue vitrified by the *Ovarian Tissue Cryosystem System* (OTC) and two other protocols in the murine species

GERVASIO, CG¹; VASCONCELOS, MAC²; RODRIGUES, APR³; ROSA-E-SILVA, JC⁴. ROSA-E-SILVA, ACJS⁵.

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo – USP 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

¹ Pós-graduando(a) do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

² Técnica do Setor de Reprodução Humana FMRP-USP.

³ Professor Doutor da Universidade Estadual do Ceará- UECE

⁴ Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

⁵ Professor Doutor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

*Correspondência: anasars@fmrp.usp.br / catiele_garcia@hotmail.com

RESUMO

Introdução: A criopreservação de fragmentos de tecido ovariano previamente ao início da terapia oncológica e posterior reimplante do tecido ovariano tem sido sugerido como promissora alternativa para preservação de fertilidade. Neste sentido, um novo sistema de vitrificação denominado *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC), vem sendo desenvolvido visando aperfeiçoar a conservação do tecido congelado. **Objetivo:** Avaliar o impacto da criopreservação sobre a viabilidade do tecido ovariano murino vitrificado por três diferentes protocolos, dentre eles o sistema OTC. E avaliar o impacto do reimplante heterotópico do tecido ovariano murino fresco e descongelado pelos mesmos protocolos, sobre a sua viabilidade. **Metodologia:** Este é um estudo experimental onde foram utilizados tecido ovariano de camundongos C57BL/6. Três protocolos de vitrificação foram testados simultaneamente: protocolo murino (PrM); protocolo humano (PrH); protocolo OTC (PrOTC) em comparação ao grupo frescos (GF). As amostras foram analisadas imediatamente após o descongelamento (Etapa 1) ou após 15 ou 30 dias de reimplante retroauricular (Etapa 2). Para análise da viabilidade utilizou-se imunohistoquímica para proliferação celular (Ki-67), dano celular (NF-kB) e dano oxidativo (4-HNE e Nitrotirosina). Os resultados foram obtidos utilizando-se o teste Q-quadrado para verificar a distribuição entre os grupos e a imunomarcagem (% de folículos marcados), sendo que o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. **Resultados:** **Etapa 1:** Os grupos PrOTC e PrM apresentaram melhor desempenho em relação à proliferação celular. Entretanto, estes mesmos protocolos apresentaram graus variados de dano oxidativo quando analisados pela imunomarcagem de nitrotirosina, aonde o PrOTC teve maior marcação do que o GF, portanto maior dano, e o PrM teve maior marcação em relação ao HNE em comparação com os demais protocolos. Não houve nenhuma diferença na marcação do NF-kB entre os grupos descongelados. **Etapa 2:** O reimplante em si não pareceu comprometer significativamente o tecido, uma vez que as amostras GF e GF reimplantado com 15 e 30 dias tiveram desempenho semelhante em relação à todos os marcadores, com exceção do GF 30 dias que mostrou algum grau de dano oxidativo pela nitrotirosina ($p < 0,05$). E ao se avaliar a somatória de efeitos entre congelamento e reimplante entre os diferentes protocolos apenas o PrH evidenciou dano tecidual imediatamente após o descongelamento e dano progressivo após o reimplante. **Conclusão:** Os PrM e PrOTC foram semelhantes ao GF na conservação da amostra durante o processo de criopreservação, sendo que o PrOTC causou algum grau de dano

oxidativo. O reimplante retroauricular do tecido não impactou sobre a sua viabilidade do mesmo nem no GF e nem nos PrM e PrOTC. O PrH mostrou-se inadequado para a conservação de tecido ovariano murino.

Palavras-chave: Tecido ovariano, Vitrificação, Transplante tecido ovariano, *Ovarian Tissue Cryosystem*.

ABSTRACT

Introduction: The Cryopreservation of fragments of ovarian tissue prior to initiation of oncotherapy and subsequent reimplantation of ovarian tissue has been suggested as promising alternative for fertility preservation. In this sense, a new system of vitrification called *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC), has been developed in order to improve the frozen ovarian tissue conservation. **Objective:** To compare the viability of murine ovarian tissue vitrified by three different vitrification protocols and to verify the efficiency of the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Methods:** This is an experimental study using ovarian tissue of C57BL/6 mice. Three vitrification protocols were tested simultaneously: Murine protocol (PrM); Human Protocol (PrH) and Protocol OTC (PrOTC); in comparison to Fresh Tissue (GF). Samples were analyzed immediately after thawing (Step 1) or after 15 or 30 days of retroauricular reimplantation (Step 2). For viability analysis immunohistochemistry for cell proliferation (Ki-67), cell damage (NF-kB) and oxidative damage (4-HNE and Nitrotyrosine) was used. The results were obtained using the Q-square test to analyze immunostaining counted as % of labeled follicles and the level of significance was set at $p < 0.05$. **Results: Step 1:** The PrOTC and PrM presented the best performance in relation to cell proliferation. However, these same protocols presented varying degrees of oxidative damage when analyzed by the nitrotyrosine immunolabeling, where PrOTC had higher marking than GF, thus greater damage, and PrM had a greater marking in relation to HNE compared to the other protocols. There was no difference in the labeling of NF-kB between the thawed groups. **Step 2:** The reimplantation procedure did not appear to significantly impair the ovarian tissue quality once day 15 and 30 after fresh tissue engraftment of was similar for all markers except for nitrotyrosine after 30 days ($p < 0,05$). And when assessing the sum of effects of freezing and reimplantation among the 3 different protocols only PrH showed tissue damage immediately after thawing and progressive damage after reimplantation. **Conclusion:** The PrM and PrOTC were similar to the GF in the preservation of the sample during the cryopreservation process, and PrOTC caused some degree of oxidative damage. Retroauricular reimplantation of the tissue did not impact on its viability in either the GF or PrM and PrOTC. PrH was found to be unsuitable for the cryopreservation of murine ovarian tissue.

Key-words: *Ovarian Tissue Cryosystem*, Vitrification, Ovarian tissue cryopreservation.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, segundo a Agencia Internacional de Pesquisa contra o Câncer (Iarc), da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial (JEMAL et al., 2011; INCA, 2015). Deste modo o desenvolvimento de técnicas alternativas para a preservação e restauração da fertilidade, tem apresentado uma importante relevância clínico-científica. Atualmente, existem várias técnicas para preservar a fertilidade, dentre elas a criopreservação de tecido ovariano (DOLMANS et al., 2013a; SMITZ et al., 2010; KIM et al., 2018) associada ou não a outras técnicas que possibilitam a utilização deste tecido após a criopreservação para fins reprodutivos. Outro sistema vem sendo desenvolvido por pesquisadores brasileiros e oferecer inúmeras vantagens em relação a outros sistemas já descritos na literatura, o OTC (*Ovarian Tissue Cryosystem*), (CARVALHO et al., 2013), por se tratar de um sistema fechado, que não permite o contato direto com o nitrogênio líquido, evitando assim possíveis contaminações da amostra; além disso, permite a vitrificação de vários fragmentos de ovário simultaneamente, ou mesmo de ovário inteiro, devido ao tamanho da cápsula.

Após um período indeterminado de congelamento, o tecido ovariano pode ser removido do nitrogênio líquido e reimplantado com o objetivo de recuperar sua atividade. Nos anos 50, surgiram diversas pesquisas a respeito da criopreservação e transplante de ovários. Em 1956, Parkes mostrou a restauração da função endócrina após transplante autólogo de ovário em ratas. Devido à falta de aplicabilidade clínica, esse método de preservação da fertilidade ficou somente no campo das pesquisas por aproximadamente 30 anos, até que em 1994, Gosden e colaboradores obtiveram sucesso restaurando a fertilidade em ovelhas após transplante autólogo de tecido ovariano congelado/descongelado e mostrou novas perspectivas, especialmente como estratégia para preservar a função ovariana em mulheres com câncer.

O transplante de tecido ovariano já é uma realidade em clínicas de reprodução assistida (OKTAY, TURKCUOGLU, RODRIGUEZ-WALLBERG 2011). Essa técnica de reimplante oferece como principais vantagens a restauração da função reprodutiva e esteroidogênica da paciente submetida à tratamentos potencialmente esterilizantes por motivos diversos. A associação entre a criopreservação e o reimplante tem sido realizada em várias espécies. Muitos estudos evidenciaram que as funções dos ovários podem ser restabelecidas, incluindo crescimento folicular (DEMEESTERE et al., 2006), produção hormonal esteroidal (ANDERSEN et al., 2008; CAMPOS et al., 2011), bem

como gestações a termo (SALLE et al., 2003) e nascimentos de filhos vivos tanto em animais (GOSDEN et al., 1994) como em humanos (DONNEZ et al., 2004; JENSEN et al., 2016). Aparentemente os principais obstáculos para o sucesso da restauração da fertilidade a partir do córtex ovariano congelado/descongelado são: a realização de um novo procedimento cirúrgico para o reimplante, o não reimplante de células malignas presentes no tecido criopreservado e as aderências e dano isquêmico maciço aos folículos até o desenvolvimento da neovascularização (TAO, DEL VALLE, 2008; LIU et al., 2002).

Desta forma este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da criopreservação sobre a viabilidade do tecido ovariano murino vitrificado por três diferentes protocolos, dentre eles o sistema OTC (*Ovarian Tissue Cryosystem*). E avaliar o impacto do reimplante heterotópico do tecido ovariano murino fresco e descongelado pelos mesmos protocolos, sobre a sua viabilidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (CETEA, FMRP), sob o PROTOCOLO: 222/2014 e à Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP.

2.2 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo experimental em modelo animal, com amostras de tecido ovariano murino obtido de camundongos fêmea, da raça C57BL/6, do biotério central. O estudo foi realizado no laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no laboratório de patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

2.2.1 Delineamento experimental

Neste estudo foram incluídas 48 camundongos fêmea, com idade entre 6 e 8 semanas, às quais foram subdivididas em 4 grupos experimentais sendo eles: protocolo murino (PrM); protocolo humano (PrH); sistema OTC (PrOTC) e ao mesmo tempo o

grupo frescos (GF) utilizado como controle, sendo que na etapa 1 foi realizada a avaliação da criopreservação sobre a viabilidade do tecido ovariano murino, pelos três protocolos de vitrificação. E na etapa 2 foi realizado a avaliação do impacto do reimplante sobre a viabilidade no tecido ovariano murino fresco e descongelado, após 15 e 30 dias, pelos mesmos protocolos de vitrificação (Figura 1).

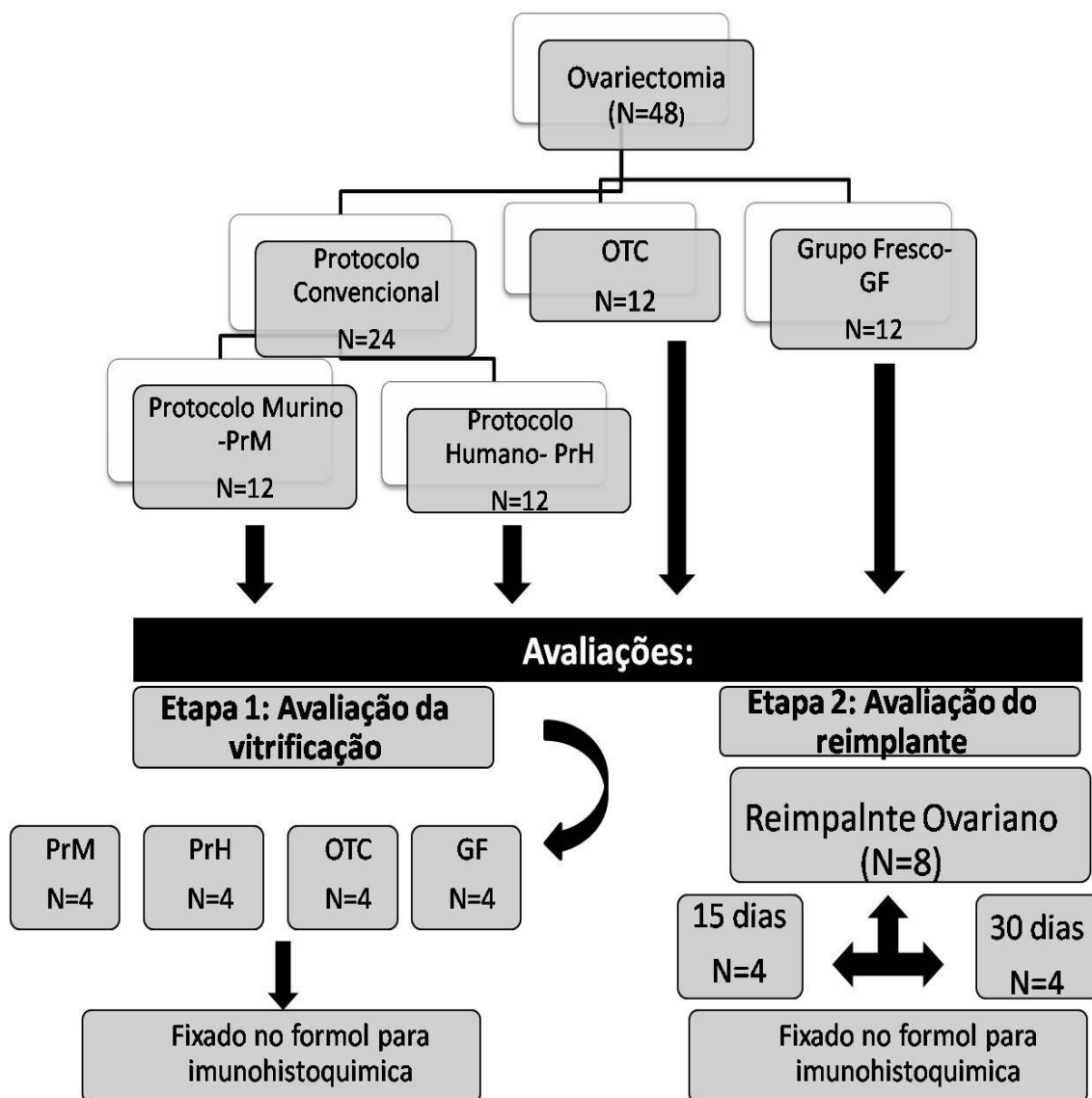


Figura 1. Delineamento experimental.

2.3 Preparo das amostras de tecido ovariano

Os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral conforme será descrito mais adiante. Os ovários coletados foram lavados em solução de KSOM tamponado com HEPES (SUMMERS et al., 1995) suplementado com BSA (0,5%). Os animais foram posteriormente mantidos em gaiolas em número de 4 a 6 animais, com alimentação e água *ad Libitum* para receber o enxerto do tecido criopreservado.

Em seguida, os fragmentos ovarianos foram criopreservados ou transplantados frescos, no mesmo animal (grupo fresco).

Na etapa 1, imediatamente após a ovariectomia completa, alguns dos fragmentos de tecido ovariano foram destinados para as análises de histologia clássica (grupo fresco).

2.4 Vitrificação /desvitrificação do tecido ovariano

Foram realizados três protocolos de vitrificação simultaneamente. Sendo que o primeiro descrito por Migishima e colaboradores (2003), utilizado para criopreservação de tecido ovariano murino. O segundo protocolo foi descrito para vitrificação de tecido ovariano humano descrito por Suzuki e colaboradores (2012), cuja utilização por Kawamura e colaboradores (2013) permitiu o nascimento de uma criança saudável após transplante. E o terceiro protocolo o tecido ovariano murino será vitrificado pelo sistema OTC, inclusive com a utilização deste recipiente específico conforme descrito por Carvalho e colaboradores (2013). (Figura 2).

2.4.1 Protocolo murino

Para a vitrificação de acordo com o protocolo descrito por Migishima e colaboradores (2003), os ovários foram expostos inicialmente a uma solução de equilíbrio constituída de meio MEM contendo DMSO (1M) à temperatura ambiente. Em seguida, 5µL de meio contendo os ovários foram transferidos para criotubos de 1mL em gelo a 0°C por 5 minutos. Então, 95µL de DAP (adaptado) foram adicionados em cada criotubo e, em seguida, estocados em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados à temperatura ambiente (37°C) por 30 segundos. Foram colocados 900µL de meio MEM contendo 0,25M de sacarose para a solução de descongelamento, perfazendo um total de 1mL no criotubo.

2.4.2 Protocolo humano

Para a vitrificação de acordo com o protocolo descrito por Suzuki e colaboradores (2012) os fragmentos ovarianos foram expostos inicialmente por 10 minutos em meio H199 suplementado com 20% de soro sintético substituto (SSS) e 1,61M de EG, transferido para o mesmo meio contendo 20% de SSS e 3,22M de EG por 10 minutos e, em seguida, exposto por 5 minutos ao meio H199 contendo 20% de SSS,

5,64M de EG, 5% de polivinilpirrolidona (PVP) e 0,5M de sacarose. Por fim, os fragmentos foram colocados em palhetas e imersos em nitrogênio líquido.

Após a crioestocagem, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 10 segundos e os tecidos transferidos para 1mL de meio H199 contendo 20% de SSS e 0,8M sacarose pré-aquecido a 37°C. Em seguida, foi realizada uma lavagem neste mesmo meio contendo 0,4M de sacarose e duas lavagens de 5 minutos cada em meio sem sacarose.

2.4.3 Sistema OTC

Na vitrificação por OTC (CARVALHO et al., 2013) (Figura 2) os fragmentos de tecido ovariano foram expostos às soluções de vitrificação dentro da própria cápsula, sendo inicialmente expostos por 4 minutos à uma solução de Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,25M de sacarose (SAC), 10% de etilenoglicol (EG – Dinâmica Química, Diadema-SP, Brasil) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Dinâmica Química, Diadema-SP, Brasil). Em seguida, a solução foi substituída por outra, cuja composição foi semelhante, com alteração apenas na concentração dos agentes crioprotetores (20% EG e 20% DMSO). Após 1 minuto a solução de vitrificação foi removida e o OTC contendo o tecido ovariano foi fechado e imerso em nitrogênio líquido.

Após a crioestocagem, os OTCs foram aquecidos à temperatura ambiente (~25°C) por 1 minuto e, em seguida, imersos em banho-maria (37°C) por 30 segundos. Posteriormente, os crioprotetores foram removidos utilizando três lavagens sucessivas, com duração de 5 minutos cada, em meio MEM contendo BSA (10mg/mL) e concentrações decrescentes de sacarose (0,5; 0,25 e 0M).



Figura 2: *Ovarian Tissue Cryosystem*: Novo dispositivo em aço inoxidável para procedimento de vitrificação de tecido ovariano caprino. (A) OTC aberto, permitindo a visualização das três partes constituintes: base (a), insert (b) tampa (c). Notar as perfurações na parte superior do insert para facilitar a colocação e remoção de soluções. (B) Exposição do ovário à solução de vitrificação na base do OTC. (C) A inclusão do insert na base do OTC permite a manipulação asséptica do insert. (D) Fechamento da base com a tampa do OTC. (E) Crioestocagem do OTC contendo a amostra (CARVALHO et al., 2013).

2.4. Ovariectomia total bilateral e reimplante do tecido ovariano

Os animais foram anestesiadas utilizando Quetamina e Xilasina (50mg/mL), 0,4mg/g por peso corporal, i.p). Em seguida foi realizada uma incisão de 0,5cm através da parede abdominal para identificação dos cornos uterinos e permitir a identificação do tecido ovariano, sendo realizada então a ovariectomia bilateral. Os ovários inteiros, à fresco ou após congelamento e descongelamento, de cada animal foram reimplantados; com exceção do grupo OTC em que os fragmentos eram congelados vários no mesmo recipiente, cada animal recebeu enxerto autólogo, ou seja, o próprio ovário de volta.

O reimplante foi realizado na região retroauricular, bilateral (um ovário de cada lado), com uma incisão semi-circular de cerca de 3-5mm, com a colocação do tecido

sem fixação. Para facilitar a identificação no tecido enxertado no momento da remoção o local foi marcado com ponto de nylon 6-0. A sutura local foi feita em um único plano também como monocryl4-0. Após 15 ou 30 dias do transplante os camundongos foram eutanasiado, para retirada dos fragmentos enxertados. O mesmo foi realizado para os tecidos vitrificados, pelos três protocolos distintos, sendo que após 3 a 7 dias do congelamento as amostras foram aquecidas e fixadas para a análise na Etapa 1 ou foram reimplantadas (Etapa 2).

As paredes das incisões foram fechadas utilizando fio 5/0 (Ethicon, Somerville, NJ, USA) e a incisão da pele fechada utilizando fio de nylon. Antes dos animais regressarem à consciência foi realizada a analgesia utilizando carprofeno (5mg/kg, ip, Rimadyl, Dundee, RU) para fornecer alívio da dor pós-cirurgia.

2.5. Análise dos protocolos de criopreservação e do tecido ovariano transplantado

2.5.1 Técnica de imunohistoquímica

As amostras de tecido ovariano incluídas em parafina foram submetidas a cortes e montadas as lâminas silanizadas. Para detecção dos marcadores foram utilizados os anticorpos primários da *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, USA) NF-kB (D14E12), 4HNE (ab46545), Ki67 (D3B5) e Nitrotirosina (ab7048). Todos os anticorpos foram utilizados na concentração 1:50, exceto o Ki67 que foi utilizado na concentração 1:100. O kit de revelação utilizado foi *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System, da Spring Bioscience* (Pleasanton, CA, USA). Como controle positivo foram utilizadas amostras de carcinoma de mama para os marcadores, exceto para o Ki67 que foi utilizado carcinoma de estômago.

As reações imunohistoquímica iniciaram-se com a desparafinização das lâminas em dois banhos de xilol por 5 minutos cada. A seguir, os cortes foram reidratados em uma série decrescente de álcool e imersos em água corrente. Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica, em que as lâminas foram incubadas em tampão citrato pH 6,0, pré aquecido de 95 a 99°C, por 40 minutos em uma panela de vapor. Logo após as lâminas foram resfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente e lavadas em solução salina tamponada (PBS).

A partir dessa etapa, todos os procedimentos foram realizados em câmara úmida e foram utilizados os reagentes do kit *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System* de acordo com as recomendações do fabricante. Após a revelação, os cortes

foram lavados em água corrente, contra corados com hematoxilina e lavados em água amoniacal. Por fim os cortes foram desidratados em uma serie de concentrações graduais de álcool e xilol. E as lâminas foram montadas, cobertas por lamínula com auxilio do *Permount* (Fisher Scientific, Pitisburgh, PA, USA).

2.6 Análise Estatística

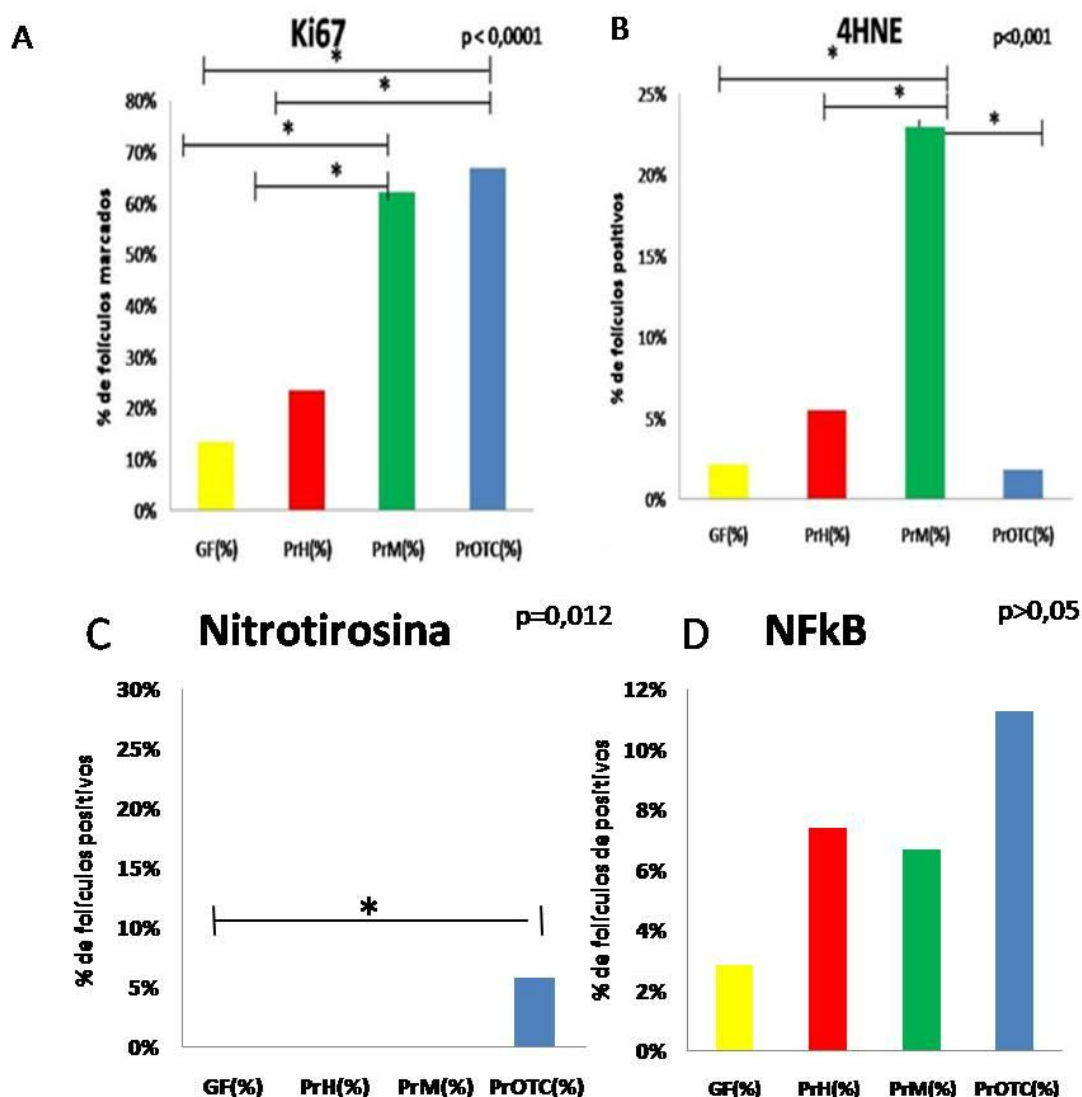
Os resultados foram obtidos com o auxilio do software SAS® 9.4, onde foram utilizados o teste qui-quadrado para verificar a distribuição entre os grupos, tempos ou imunomarcadores, sendo que o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

5.1. ETAPA 1- Efeito dos diferentes protocolos de vitrificação:

Os grupos dos protocolos OTC e murino foram os que apresentaram melhor desempenho em relação à proliferação celular (Ki-67) (Figura 3A). Não houve diferença entre os grupos em relação à quantidade de folículo degenerados entre os grupos de tecido descongelado e o tecido fresco. Entretanto, estes mesmos protocolos apresentaram graus variados de dano oxidativo quando analisados pela imunomarcção de nitrotirosina, aonde o protocolo OTC teve maior marcação do que o tecido fresco (Figura 3C), portanto maior dano, e o protocolo murino teve maior marcação em relação ao HNE em comparação com os demais protocolos (Figura 3B). Não houve nenhuma diferença na marcação do NF-kB entre os grupos descongelados (Figura 3D).

Figura 3. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano após criopreservação entre os diferentes grupos.

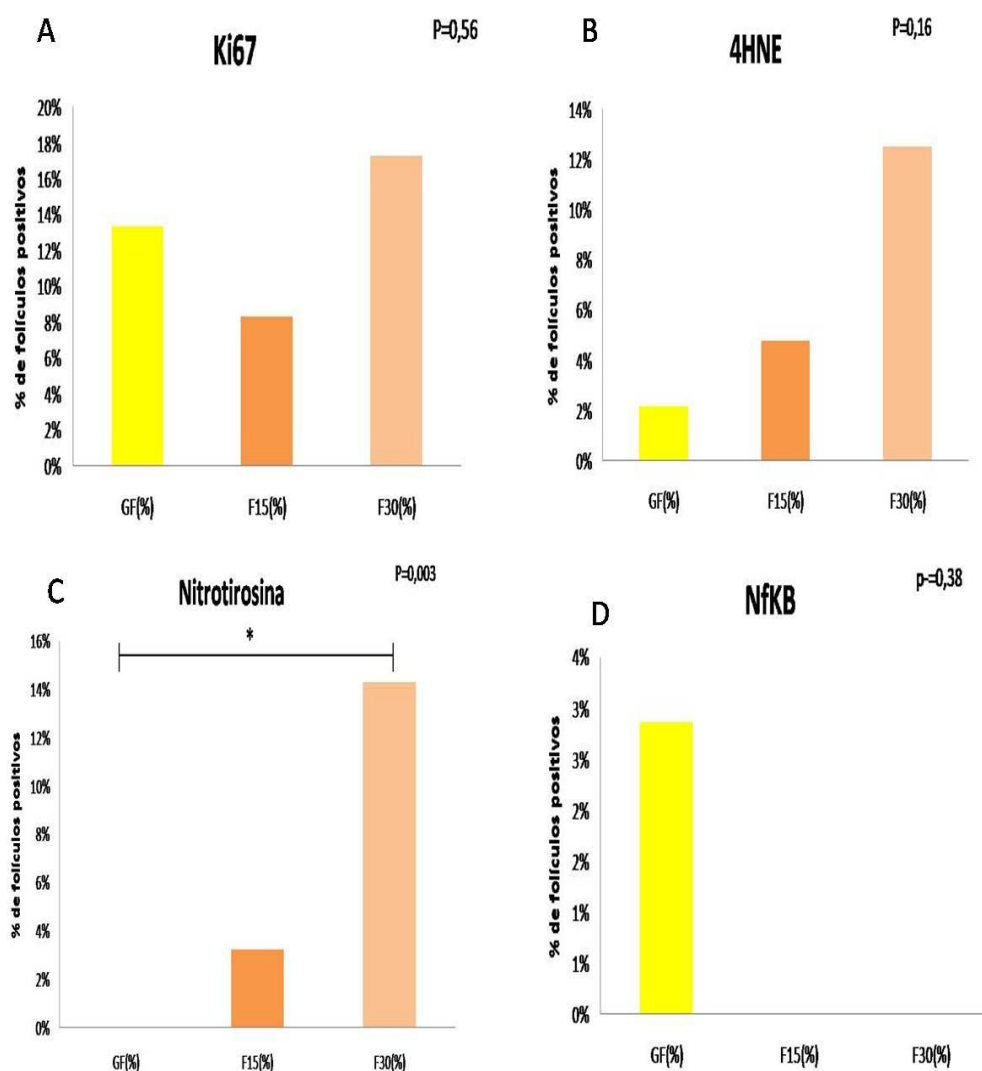


Legenda: GF= grupo fresco; PrH= protocolo humano; PrM= protocolo murino; PrOTC= protocolo OTC. (A) GF=PrH; GF<(PrOTC=PrM); PrH<(PrOTC=PrM) $p < 0,001$; (B) (GF=PrH=PrOTC)<PrM $p < 0,01$; (C) GF<PrOTC $p = 0,04$ (D) Não houve diferença significativa $p > 0,05$; (*) $p < 0,05$.

5.2. ETAPA 2- Efeito do reimplante associado ou não à criopreservação:

Ao se avaliar a viabilidade, com base na proliferação celular, e o dano tecidual pelos marcadores HNE, nitrotirosina e NF-kB, comparando-se o tecido ovariano imediatamente após a ooforectomia com as amostras frescas após 15 e 30 dias do reimplante, verificou-se que não houve diferença do tecido reimplantado fresco em relação aos reimplantados, com exceção da nitrotirosina que apresentou-se mais expressa após 30 dias de reimplante ($p = 0,0013$) (Figura 4).

Figura 4. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano em relação ao grupo fresco no tempo 0, 15 e 30 dias do reimplante.

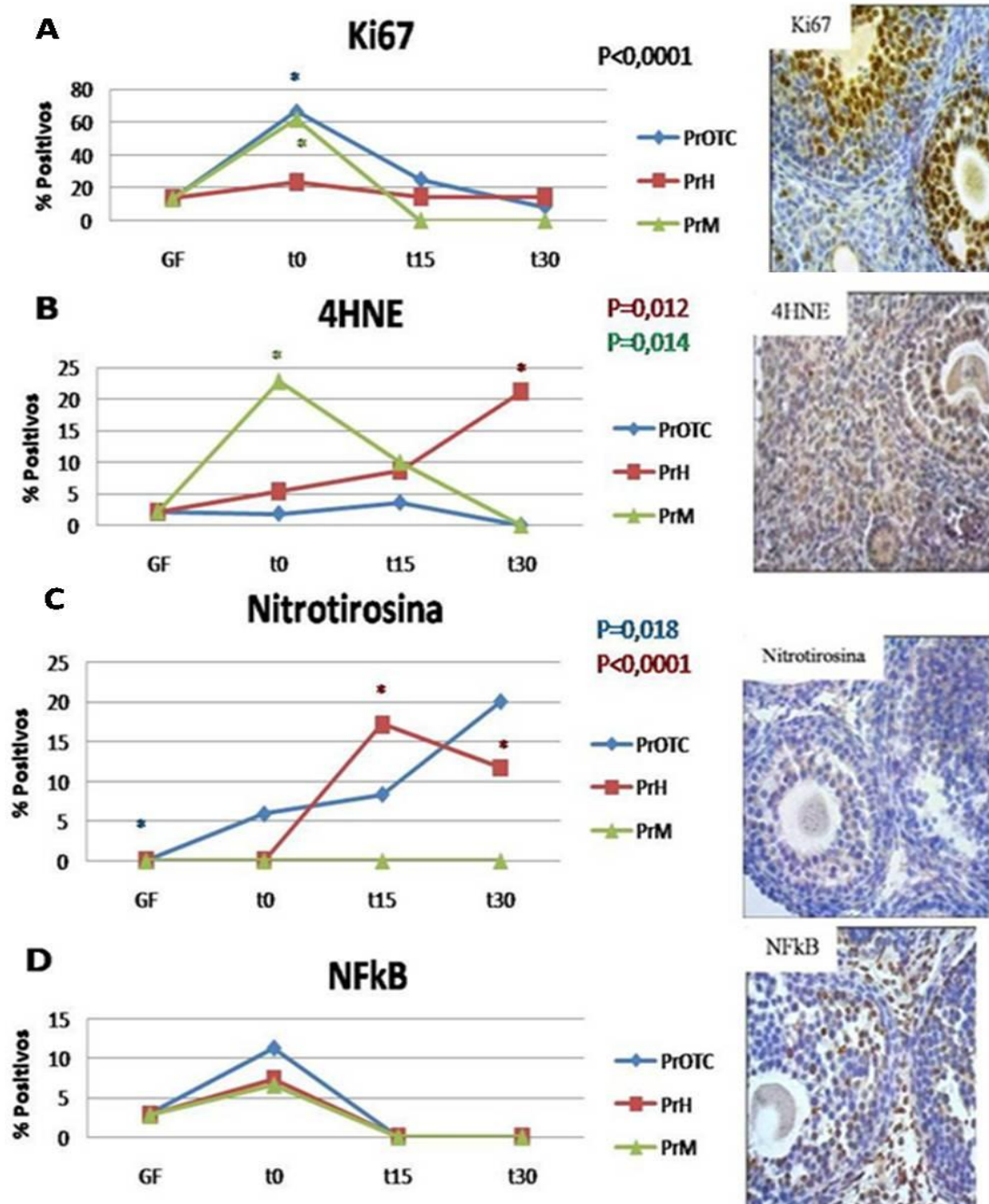


Legenda: GF= Grupo fresco; F15= Grupo fresco após 15 dias de reimplante; F30=Grupo fresco após 30 dias de reimplante. (A) Não houve diferença significativa $p < 0,05$; (B) Não houve diferença significativa $p < 0,05$; (C) $GF < F30$ $p = 0,001$ (D) Não houve diferença significativa $p > 0,05$; (*) $p < 0,05$.

Resultados semelhantes foram observados para o protocolo OTC, embora o tecido após descongelamento sem reimplante (PrOTC t0) tenha apresentado taxas de proliferação celular maior que o controle fresco (Ki-67; $p < 0,0001$), e também maior dano oxidativo (nitrotirosina; $p = 0,018$). Esta menor marcação do tecido fresco para o Ki-67 e maior marcação para o HNE do tecido fresco também foi observada com relação ao tempo zero após descongelamento do tecido murino ($p < 0,0001$ e $p = 0,0026$, respectivamente); neste, entretanto, houve menor proliferação celular e maior dano tecidual após 15 ($p = 0,0012$) e 30 ($p = 0,0078$) dias de reimplante em relação ao pós-descongelamento imediato, sendo semelhantes entre estes dois últimos (PrM t15= PrM t30). O protocolo humano, quando analisado pela imunomarcagem do HNE e da

nitrotirosina, apresentou dano progressivo do tecido após o reimplante em relação ao fresco e ao descongelamento imediato, porém sem progressão do dano entre 15 e 30 dias (Figura 5). Não houve diferença na marcação do Ki-67 e do NF-kB entre os tempos do protocolo humano.

Figura 5. Proliferação celular (Ki-67) e dano tecidual (nitrotirosina, HNE e NF-kB) nos três protocolos (PrM, PrOTC e PrH) analisados à fresco, após o descongelamento e após o reimplante retroauricular.

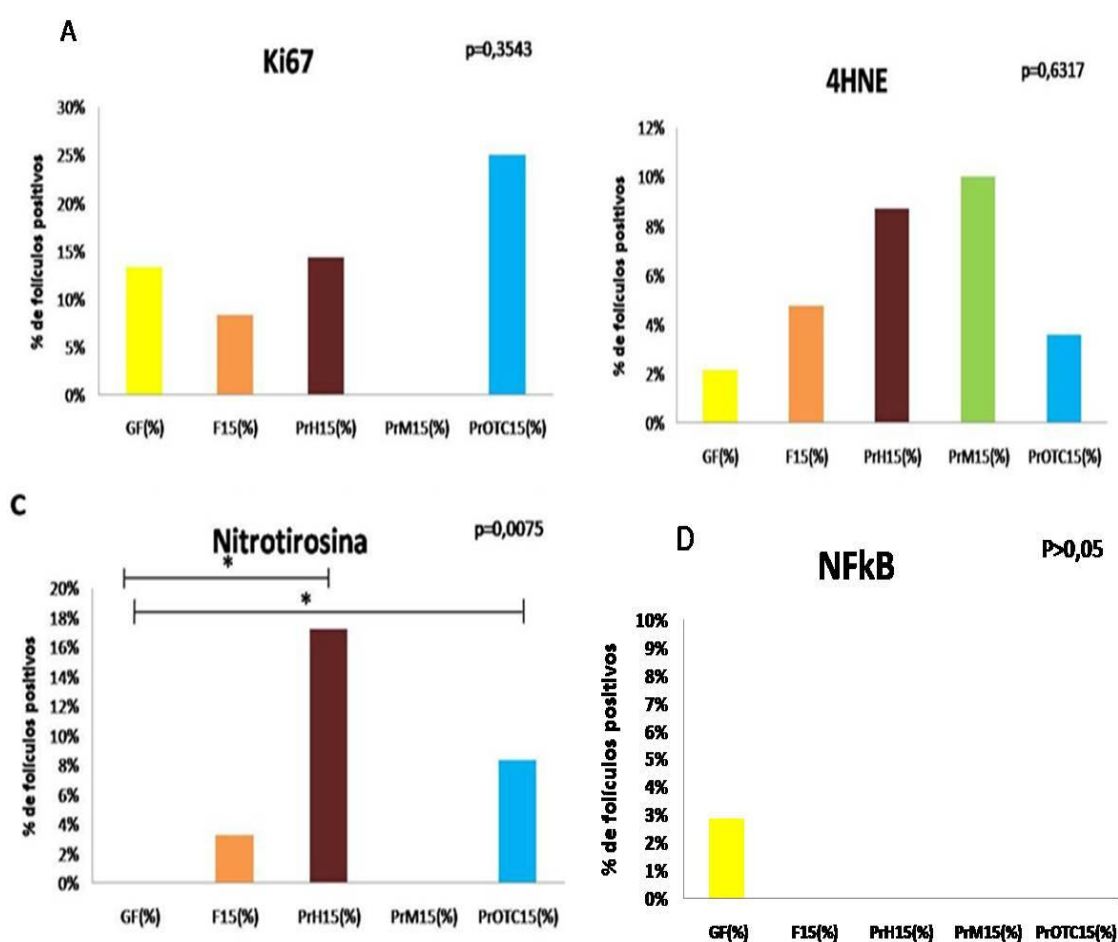


Legenda: GF= grupo fresco; t0= Protocolo criopreservado; t15= Protocolo após 15 dias de reimplante; t30= Protocolo após 30 dias de reimplante; (A) PrM e PrOTC= GF<t0 p<0,0001 e t0>t15 e t30 p<0,0001; (B) PrM= GF>t0 p=0,002; PrH= (GF=t0)<t30 p<0,005; (C) PrOTC= (t0=t15=t30)<GF p<0,01; (GF=t0)<t15 e t30 p<0,003; (D) Não houve diferença significativa p>0,05; (*) p<0,05.

Na comparação entre os protocolos nos diferentes tempos verificou-se que após 15 dias de reimplante a proliferação celular era igual entre os grupos, inclusive o fresco sem reimplante, indicando boa viabilidade tecidual (Ki-67; $p=0,35$) (Figura 6A). Esse dado é corroborado pelo número de folículos degenerados que também foi semelhante entre os grupos ($p=0,31$).

Já com relação ao dano tecidual sofrido pelo tecido após 15 dias do reimplante, verificamos que o HNE e o NF- κ B não foram diferentes entre os grupos ($p=0,63$ e $p=0,67$ respectivamente) (Figura 6B e D). Já nitrotirosina foi mais sensível ao detectar alterações de dano tecidual, sendo que o protocolo humano e PrOTC tiveram maior marcação em relação ao tecido fresco, embora esta diferença não ocorra com relação ao tecido fresco reimplantado após 15 dias (Figura 6C).

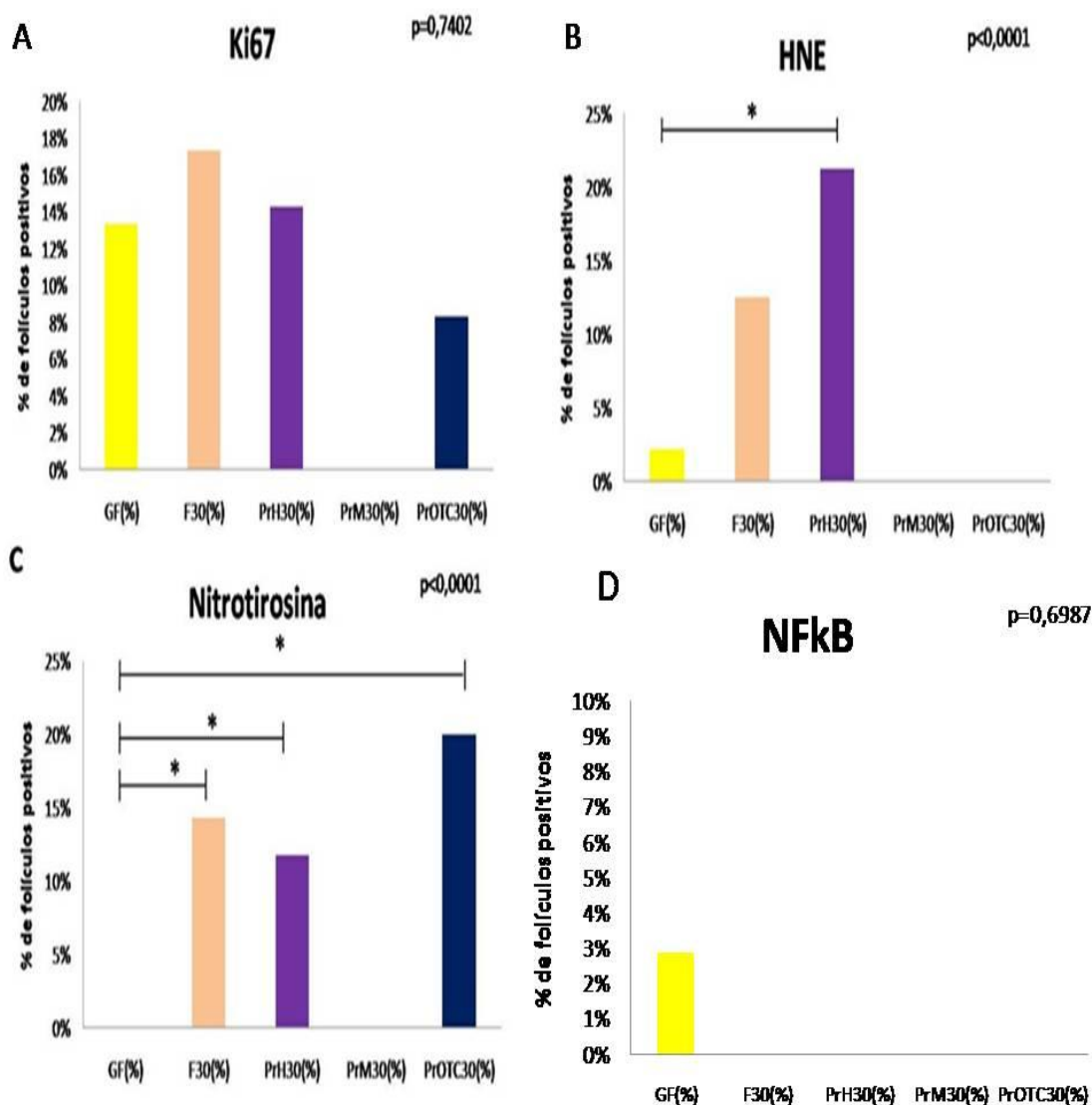
Figura 6. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano entre os diferentes grupos após criopreservação e 15 dias de reimplante.



Legenda: GF= grupo fresco; F15= Grupo fresco após 15 dias de reimplante; PrH15= Protocolo humano após 15 dias de reimplante; PrM15= Protocolo murino após 15 dias de reimplante; PrOTC15= Protocolo OTC após 15 dias de reimplante. (A) Não houve diferença significativa $p>0,05$; (B) Não houve diferença significativa $p>0,05$; (C) $GF < (PrOTC15 = PrH15)$ $p < 0,01$; (D) Não houve diferença significativa $p > 0,05$; (*) $p < 0,05$.

Entretanto, esta diferença não se refletiu no grau de proliferação celular, uma vez que a imunomarcação do Ki-67 foi semelhante entre os grupos e em comparação com o controle fresco (Figura 7A). Nesta mesma avaliação, houve diferenç a na intensidade do dano tecidual entre os diferentes protocolos, sendo que o protocolo humano apresentou a maior marcação de HNE e nitrotirosin, j a os grupos murino e OTC manifestaram maior dano oxidativo apenas pela intensidade de nitrotirosina e de HNE superior   do tecido fresco (Figura 7C e B). Não houve diferenç a na imunomarcação do NF-kB entre os grupos (Figura 7D).

Figura 7. Avaliação da imunohistoquímica no tecido ovariano entre os diferentes grupos após criopreservação e 30 dias reimplante.



Legenda: GF= grupo fresco; F30= Grupo fresco após 30 dias de reimplante; PrH30= Protocolo humano após 30 dias de reimplante; PrM30= Protocolo murino após 30 dias de reimplante; PrOTC30= Protocolo OTC após 30 dias de reimplante. (A) Não houve diferenç a significativa $p>0,05$; (B); $GF<PrH30$ $p=0,005$; (C) $GF<(F30=PrH30=PrOTC30)$ $p<0,001$; (D) Não houve diferenç a significativa $p>0,05$; (*) $p<0,05$.

4. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o impacto de diferentes protocolos de vitrificação sobre a vitalidade do tecido ovariano criopreservado. Para esta finalidade em um primeiro momento analisou-se marcadores de proliferação celular e ao mesmo tempo de dano tecidual imediatamente após o descongelamento do tecido, com objetivo de identificar qual protocolo melhor mantém a vitalidade das células com o mínimo dano possível. E num segundo momento buscou se avaliar a manutenção da capacidade funcional do tecido ovariano descongelado e reimplantando nos animais de origem, observando-se a manutenção ou não da capacidade do folículo em proliferar e se desenvolver e no grau de dano tecidual após o reimplante. Desta maneira procurou-se diferenciar o dano secundário ao congelamento, do dano secundário ao próprio enxerto.

Ao se avaliar exclusivamente o congelamento, através da marcação pelo Ki-67, que representa a capacidade de proliferação celular do tecido, verificamos que o PrOTC e o PrM foram os que apresentaram maior marcação, sendo esta inclusive maior que do próprio tecido fresco. A primeira ideia foi a de que haveria alguma inadequação com relação às amostras frescas, sendo que estas deveriam ser as com maior atividade proliferativa por encontrarem-se “in natura”, sem intervenção que causasse injúria. Entretanto, dados de Tanaka e colaboradores (2018) mostraram uma taxa média de proliferação do tecido ovariano avaliado pela marcação do Ki-67 de cerca de 1,55 a 3,04% dos folículos totais, ou seja, baixa atividade proliferativa dos folículos, semelhante ao que identificamos no grupo fresco, sem intervenção, neste estudo. A baixa marcação do Ki-67 no tecido fresco pode ser explicada pelo fato de que o antígeno da proteína Ki67 está presente no núcleo das células em todas as fases do ciclo (G1, S, e G2), inclusive na mitose, porém nas células quiescentes ou em repouso (fase G0) não expressam esta proteína (SCHOLZEN, GERDES 2000); sendo assim os folículos do protocolo fresco poderiam estar em repouso e não necessariamente com viabilidade comprometida, até porque os resultados dos marcadores de dano oxidativo (HNE e nitrotirosina) e de dano celular em geral (NF-kB) apresentam-se semelhantes entre os grupos fresco e criopreservados no tempo zero pós-descongelamento.

A marcação folicular com Ki-67 neste estudo foi identificada tanto em oócitos quanto em células da granulosa. As células da granulosa folicular têm sido apontadas como um dos principais marcadores de vitalidade folicular, uma vez que são muito mais sensíveis do que o próprio oócito quando submetidas a condições de estresse. Acredita-se que o dano aos folículos quiescentes no ovário em situações de quimioterapia

ocorreria muito mais por agressão e dano às células somáticas foliculares do que ao próprio oócito, o que indiretamente inviabilizariam a sobrevivência do folículo (MEIROW et al., 2008). Neste sentido, outra explicação para uma maior proliferação nos grupos PrOTC e PrM seria o aumento acentuado de folículos em atividade proliferativa por um efeito conhecido como “Burn Out”, o qual supõe que a retirada do tecido ovariano de seu ambiente nativo, aonde ele está sob efeito de substâncias inibitórias para manutenção do pool de reserva folicular quiescente, promoveria o recrutamento e ativação maciça dos mesmos e secundariamente a queima precoce da população folicular (ABIR et al., 2017). Este processo poderia ser justificado neste caso por uma ineficiência da vitrificação em manter o estado “latente” do tecido durante a criopreservação. Corroborando esta teoria, estes dois protocolos, murino e PrOTC, foram os que apresentaram indícios de maior dano tecidual pelos marcadores HNE, no caso do protocolo murino, e nitrotirosina no caso do PrOTC, quando comparados ao tecido fresco pré-reimplante.

O efeito do reimplante em si, pôde ser testado pelo enxerto heterotópico de amostra ovariana fresca, imediatamente após a ooforectomia, reavaliada após os mesmos 15 e 30 dias do reimplante. Verificou-se que a proliferação celular foi semelhante entre os tempos, quando avaliada pelo Ki-67, bem como a marcação para o dano tecidual pelos três marcadores utilizados (HNE, nitrotirosina e NF-kB), exceto pela amostra à fresco com 30 dias de reimplante que apresentou elevação da marcação pela nitrotirosina, sem aumento do número de folículos degenerados. Estes resultados sugerem uma boa resposta do tecido em curto prazo após o reimplante e algum dano no tecido após 30 dias, podendo demonstrar a dificuldade na manutenção da funcionalidade do tecido após um enxerto.

Vários fatores influenciam no funcionamento de um tecido enxertado, seja este transplante autólogo ou heterólogo. Todas as amostras deste estudo, tanto tecido fresco quanto criopreservado, teve o reimplante realizado no próprio animal, exceto no PrOTC (autotransplante), o que minimiza o risco de reação e agressão ao tecido. E o tipo de reimplante realizado foi o heterotópico, quando se implanta um tecido em uma região distinta àquela da região doadora. Entretanto, para uma “pega” adequada do enxerto há demanda de boa vascularização, sendo este um grande obstáculo no transplante de tecido ovariano, pois gera perda folicular imediatamente após o enxerto, possivelmente devido à lenta neovascularização que leva à isquemia (ABRIR et al., 2017).

Em 2011 Abrir e colaboradores transplantaram fragmentos ovarianos humanos para o músculo das costas de camundongos imunossuprimidos, porém o número de folículos recuperados após o enxerto foi limitado e o número de folículos atrésicos aumentou. (ABRIR et al., 2017; ABRIR et al., 2011). Já Yang e colaboradores (2006) mostraram sinais de desenvolvimento folicular em 100% dos ovários criopreservados e transplantados para a cápsula renal de camundongos. Neste estudo optamos pelo reimplante retroauricular pela facilidade técnica no procedimento de reimplante e também baseado em resultados prévios descritos por (WIETCOVSKY, et al., 2018) que evidenciaram boa vitalidade do tecido enxertado, resultados estes reproduzidos em nosso estudo no grupo de tecido fresco.

Ao se avaliar o impacto do reimplante sobre as amostras de tecido após o descongelamento ao longo do tempo verificou-se que a proliferação celular foi semelhante entre os protocolos após 15 dias, sendo inclusive igual ao tecido fresco cultivado, indicando boa viabilidade celular em todos; resultado semelhante foi observado em relação ao reimplante após 30 dias. Estes dados estão de acordo com os reportados por Candy, Wood e Whittingham (1995) em que foi observada a sobrevivência de todos os fragmentos de tecido ovariano reimplantados após o emprego de protocolo de criopreservação lento em camundongos.

Scalercio (2015) e por Luyckx (2015) e seus colaboradores demonstram que a expressão de Ki67 em folículos em crescimento (primário, secundário e antral) refletiu a habilidade desses folículos em continuarem seu desenvolvimento e poderem assumir um estado folicular saudável. Scalercio (2015), que também avaliou tecido ovariano após a criopreservação, demonstrou que a análise com Ki67 mostrou marcação nas células da granulosa indicando que a capacidade proliferativa permaneceu ativa, independente da criopreservação (tecido fresco ou vitrificado).

Em outro estudo publicado por Luyckx e colaboradores (2013), a porcentagem de proliferação celular positiva em tecido ovariano criopreservado após o descongelamento imediato foi de 1,03%, ou seja, baixo, como reportado neste estudo para os tecidos frescos e de protocolo humano, com aumento das taxas de proliferação para 17,30% após o enxerto (LUYCKX et al., 2013). Estes dados sugerem uma retomada da proliferação celular após o reimplante do tecido, que parece ser iniciada de maneira intensa, novamente aqui poderíamos atribuir a um efeito “burn out” sobre este tecido. Em estudo anterior de nosso grupo verificou-se o aumento da proporção de folículos secundários e redução do número de folículos primários após sete dias de

cultivo do tecido ovariano fresco ou após a vitrificação, sem que o congelamento prejudicasse este desenvolvimento (CAMPOS, 2012. Dados não publicados). Esse efeito “Burn out” seria muito mais um produto do reenxerto do que do congelamento em si, uma vez que não houve diferença na taxa de proliferação celular entre os grupos fresco e todos os reimplantados após 15 dias e tampouco após 30 dias, exceto pelo protocolo humano que teve uma redução do Ki-67 após 30 dias de reimplante.

Também Ao se avaliar longitudinalmente a proliferação celular dentro de um mesmo grupo, ou seja, o tecido fresco e descongelado em cada protocolo ao longo do tempo (t0, t15 e t30), verifica-se que os PrOTC e murino fazem um pico da atividade proliferativa no pós descongelamento imediato (t0) a qual se reduz ao longo do tempo, mas sem diferença com o tecido fresco cultivado nos mesmos tempos, sugerindo que o estado proliferativo intermediário é que seria o mais próximo do fisiológico. Desta maneira, verifica-se que há adequada preservação dos tecidos, com os diferentes protocolos, com boa viabilidade após criopreservação e reimplante, principalmente dos tecidos vitrificados com protocolo murino e PrOTC em relação aos reimplantes. Por mais que haja um eventual efeito “Burn out” nos primeiros momentos pós descongelamento, este processo é recuperado e a viabilidade se mantém após 15 e 30 dias do reimplante. Estes resultados se assemelham ao encontrado por Lee e colaboradores (2005) que obtiveram sucesso no transplante de tecido ovariano fresco (73%) e criopreservado (62%) de ratas estudadas

A manutenção da capacidade proliferativa verificada após a vitrificação não garante ausência de dano destes procedimentos sobre a amostra preservada, e de fato, apesar da aparente conservação adequada do tecido pôde-se medir algum grau de dano oxidativo após o reimplante nos tecidos criopreservados. O protocolo murino manteve marcação igual à do grupo fresco para todos os marcadores de dano tecidual, sugerindo ser este o protocolo com menor impacto sobre o tecido, tanto após 15 como após 30 dias do reimplante. O PrOTC apresentou marcação maior que o tecido fresco após 15 dias e 30 dias de reimplante na avaliação pela nitrotirosina, porém sem alteração dos demais marcadores. Já o protocolo humano apresentou sinais de dano tecidual após 15 (de acordo com a marcação pela nitrotirosina) e após 30 dias (pela marcação da nitrotirosina e HNE), além de menor Ki-67 como já descrito acima. Sendo assim, neste estudo, apesar do reimplante de tecido fresco não sugerir impacto significativo deste procedimento sobre a vitalidade do tecido, quando este é realizado após a

criopreservação há uma somatória de efeitos nocivos sobre a amostra que impacta no produto final.

Os marcadores escolhidos para a identificação de dano celular foram utilizados por outros autores (KLOTZ et al. 1998; VERHAGEN et al. 2002). Neste estudo a nitrotirosina mostrou-se um marcador mais sensível para a identificação de dano celular, mesmo que sem grande impacto sobre a sobrevivência dos folículos. Na avaliação das amostras após 15 dias do reimplante verificamos que somente a nitrotirosina foi capaz de identificar algum impacto negativo da vitrificação sobre as amostras, sendo este marcador mais expresso nos tecidos dos protocolos humano e PrOTC em relação ao fresco pré-reimplante; entretanto, tratou-se, provavelmente de dano leve, uma vez que não houve diferença nesta marcação ao se comprar o tecido fresco também reimplantado após 15 dias. A nitrotirosina é um biomarcador de dano protéico utilizado também para a caracterização do dano oxidativo (KARIHTALA, 2011), inclusive em um outro estudo deste o mesmo autor observou-se uma correlação entre o 4-HNE e a nitrotirosina com a progressão do dano oxidativo (KARIHTALA, 2006). Já o NF- κ B tem sido reportado mais como um marcador de dano oxidativo menos específico e tem sido associado em vários estudos à carcinogênese tecidual (HAI PING et al., 2016; ZHAO et al., 2015).

Segundo Isachenko e colaboradores (2006) a vitrificação pode causar alterações na morfologia dos folículos, resultando na sua incapacidade de manter uma taxa adequada de crescimento durante a cultura *in vitro*. Recentemente, um estudo mostrou que a vitrificação de folículos murinos levou à interrupção das comunicações intercelulares entre as células da granulosa e oócitos e retração oocitária (NASRABADI et al., 2015), o que pode interferir negativamente no crescimento folicular. O próprio processo de vitrificação pode ser uma das principais razões para a insuficiência na preservação de tecido ovariano, a contaminação com nitrogênio líquido com microorganismos e formação de cristais de gelo no interior das células podem trazer dano direto sobre a estrutura celular dos oócitos e células somáticas foliculares. Além de todos estes fatores as altas concentrações de crioprotetores, empregadas nesta técnica para a minimização do dano durante o processo de resfriamento na criopreservação, pode ser um problema. Neste estudo foram testados três protocolos de vitrificação distintos que se diferenciam basicamente pelo tipo e/ou concentração de crioprotetores utilizados, além do sistema OTC de armazenamento das amostras.

Os crioprotetores impactam de maneira distinta sobre o tecido a ser congelado. Um estudo realizado na espécie bovina, utilizando diferentes crioprotetores (EG, 1,2-propanodiol, DMSO e glicerol) mostrou que o EG nas concentrações de 1,5 e 3,0 M, reduziu o percentual de folículos normais (LUCCI, et al. 2004). Neste estudo foi utilizado EG no PrH e no PrOTC, sendo que no PrOTC foram utilizadas doses baixas e no PrH doses sequencialmente altas. O PrH apresentou piores taxas de proliferação celular e maior dano oxidativo em comparação aos outros grupos, acreditamos que esse resultado se deva à ação tóxica desse crioprotetor em altas doses. Já o uso de DMSO tem resultados bastante contraditórios, enquanto alguns autores relatam baixa taxa de recuperação oocitária e degeneração folicular (KIM et al., 2006; CECCONI et al., 2004), outros relatam retomada da ciclicidade hormonal e da fertilidade com obtenção de gestação natural após o reimplante independente da dose utilizada (DEMEESTERE et al., 2006). Ele foi utilizado nos PrM e nos PrOTC, sendo que o protocolo murino foi o que apresentou menor impacto sobre a vitalidade do tecido, seguido pelo PrOTC. A sacarose, por sua vez, é utilizada com frequência na criopreservação por agir como um tampão osmótico e ajudar na remoção do crioprotetor intracelular (MANDELBAUM et al., 1988), esta foi utilizada apenas no PrOTC nesse trabalho, o qual apresentou melhores taxas de proliferação celular no folículo em relação aos outros grupos; fica, entretanto, a dúvida, se esta proliferação acelerada no t0 pós descongelamento no PrOTC foi consequente ao “Burn out”, e neste caso o protocolo não foi adequado para manter o repouso do tecido durante a criopreservação, ou se a alta atividade do tecido traduziu boa vitalidade.

Neste estudo objetivou-se testar o OTC como sistema para a criopreservação de tecido ovariano murino, dado sua praticidade. Embora observássemos um aumento da proliferação celular, podemos observar também um aumento de dano oxidativo nos folículos do PrOTC após criopreservação, resultado semelhante a vários trabalhos onde foi relatada uma diminuição nas taxas de folículos pré-antrais após a vitrificação (OSKAM, ASADI, SANTOS, 2010), esses resultados também foram encontrados por outros autores independente do protocolo de criopreservação aplicado (ISACHENKO et al., 2007; HUANG et al., 2008; ZHOU et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Tal diminuição pode ser causada pelo estresse osmótico ao qual as células são expostas durante a vitrificação (VAJTA et al., 1998), toxicidade de crioprotetores (AYE et al., 2010), comprometimento da membrana basal (GHETLER et al., 2006), outras alterações no nível iônico (GUALTIERI et al., 2011) ou molecular (DAVID et al.,

2011) e vacuolização da ooplasma (OSKAM, ASADI, SANTOS, 2010). Porém em 2013 Oliveira e colaboradores observaram que a técnica OTC foi mais eficiente que as técnicas convencionais quando avaliaram a morfologia folicular após 7 dias de cultivo *in vitro* e puderam avaliar também que vitrificação convencional reduz o número de folículos morfológicamente normais.

A vitrificação é uma técnica extremamente importante para a criopreservação porque a formação de cristal de gelo intracelular é evitada (KEROS et al., 2009), e pode ser realizada sem equipamento específico. Vários estudos mostraram que a vitrificação resultou em morfologia, viabilidade folicular (SANTOS et al., 2007) e densidade estromal (KEROS et al., 2009; TING et al., 2011) preservados. Os três protocolos comparados neste trabalho foram feitos por protocolos de vitrificação, porém há também diversos trabalhos que mostram resultados semelhantes utilizando-se congelamento lento em relação à preservação da morfologia folicular (ISACHENKO et al., 2009; KIM et al., 2011), ultraestrutura (KIM et al., 2011), porcentagens de células necróticas (RAHIMI et al., 2004) e revascularização tecidual após o transplante (RAHIMI et al., 2010). É válido reforçar que a maioria dos nascimentos após reimplante de tecido ovariano criopreservado em humanos hoje são advindos de protocolos de congelamento lento (DOLMANS, MANVELLA, 2018). Entretanto, estudos mais recentes demonstram que os protocolos de vitrificação, mais recentemente testados, preservam melhor a integridade do estroma ovariano (CAMPOS, 2012. Dados não publicados). Existe uma tendência na literatura a se preferir a vitrificação ao congelamento lento para conservação de gametas e tecido ovariano, uma vez que os cristais de gelo mais comumente formados nos protocolos de congelamento lento parecem trazer maior impacto sobre as células (AMORIM et al., 2011).

A criopreservação do tecido ovariano vem sendo realizada por mais de 20 anos e hoje é executado em todo mundo por vários autores (DONNEZ e DOLMANS, 2015; JENSEN et al., 2015; MEIROW et al., 2016; VAN DER VEN et al., 2016). Já foram descritos 130 nascidos vivos informados até o momento (DOLMANS, MANVELLA, 2018) e taxas de sucesso no reestabelecimento da função gonadal que variam de 30 a 70% após o autotransplante de córtex ovariano congelado-descongelado (DONNEZ et al., 2013, 2015; DITTRICH et al., 2015; JENSEN et al., 2015; MEIROW et al., 2016; VAN DER VEN et al., 2016). Muitos são os estudos comparando diferentes técnicas e protocolos, com diferenças de desempenho entre eles, porém, de maneira geral os resultados são bastante satisfatórios, sendo assim acreditamos que esse procedimento

não deve mais ser considerado experimental. Pouco são os trabalhos que descrevem o seguimento em longo prazo das pacientes reimplantadas. O tempo de duração do enxerto e desfechos reprodutivos acumulados, bem como o impacto sobre a prole de nascidos vivos foi ainda pouco explorada e merece atenção nas próximas décadas que se segue.

De acordo com os nossos resultados, podemos concluir que com relação ao impacto da vitrificação sobre tecido ovariano o protocolo murino foi o que apresentou menor impacto sobre a vitalidade do tecido, seguido pelo protocolo do sistema OTC; O reimplante retroauricular isoladamente não comprometeu a qualidade do tecido ovariano enxertado, o que pode ser verificado pelo implante do tecido fresco e seu comportamento ao longo do tempo, com algum grau de comprometimento da amostra após 30 dias, sem aumentar o número de folículos degenerados; A criopreservação pré-reimplante sensibiliza o tecido a ser enxertado, deixando-o mais susceptível ao dano em graus variados de acordo com o protocolo. Os tecidos dos PrOTC e humano apresentaram aumento nos marcadores de dano após 15 e 30 dias de reimplante e o marcador mais sensível na identificação de dano tecidual foi a nitrotirosina.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR R, et al. Attempts to improve human ovarian transplantation outcomes of needle-immersed vitrification and slow-freezing by host and graft treatments. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 5, pg. 633-644, 2017.

ABIR R, et al. Improving post transplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, pg. 1205-1210, 2011.

ANDERSEN CY, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 23, pg. 2266-72, 2008.

ARNON J. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. **Human Reproduction Update**, v. 7, n.4, pg. 394-403, 2001.

AYE M, et al. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte, **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, pg. 1905-1912, 2010.

BARRITT J, et al. Report of four donor-recipient oocyte cryopreservation cycles resulting in high pregnancy and implantation rates. **Fertility and Sterility**, v. 87, n.1, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

CAMPOS JR. Avaliação da capacidade de desenvolvimento folicular do tecido ovariano criopreservado sob a influência do tempo de congelamento, 2012. Dados não publicados.

CAMPOS JR, et al. Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. **Clinics**, v. 66, n.12, pg. 2093-2097, 2011.

CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v. 10, pg. 2334-2338, 1995.

CARVALHO AA, et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 76, pg. 933-941, 2011.

CARVALHO AA, et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, v. 138, pg. 220-227, 2013.

CECCONI S, et al. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, pg. 12-17, 2004.

COTICCHIO G, et al. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 21, pg. 1771-1776, 2006.

DEMEESTERE I, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, pg. 2010-14, 2006.

DITTRICH R, et al. Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryopreserved ovarian tissue in a single center. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, pg. 462-468, 2015.

DOLMANS MM, et al. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, pg. 305-314, 2013a.

DOLMANS MM, MANAVELLA DD. Recent advances in fertility preservation. **The journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, 2018.

DONNEZ J, DOLMANS MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, pg. 1167-1170, 2015.

DONNEZ J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, pg. 1405-1410, 2004.

DONNEZ J, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v. 99, pg. 1503-1513, 2013.

GHETLER Y, et al. Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. **Fertility and Sterility**, v. 86, pg. 210-216, 2006.

GOSDEN RG, et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196° C. **Human Reproduction**, v. 9, pg. 597-603, 1994.

GUALTIERI R, 2011. Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. **Human Reproduction**, v. 26, pg. 2452–2460, 2011.

HAI PING P, et al. A sinalização IL-1 β / NF-k β promove o crescimento de células cancerígenas colorrectais através do eixo miR-181a / PTEN. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2016.

HOVATTA O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 2, pg. 331-342, 2003.

HUANG L, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by solide-surface vitrification. **European Journal Of Obstetrics Gynecology And Reproductive Biology**, v.139, n.2, pg.193- 198, 2008.

ISACHENKO V, et al. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 3, pg. 741-747, 2006.

ISACHENKO V. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, v.138, p. 319-327, 2009.

JEMAL A, et al. Global Cancer Statistics. **Cancer Journal Clinicians**, v. 61, n. 2, pg. 69-90, 2011.

JENSEN AK, et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2016.

JENSEN AK, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. **Human Reproduction**, v. 30, n. 12, pg. 2838-2845, 2015.

KARIHTALA P, et al. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. **Histopathology**, v. 58, n. 6, pg. 854–62, 2011.

KARIHTALA P, et al. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 42, n.15, pg. 2653–2659, 2006.

KAWAMURA KK, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **PNAS**, pg. 1-10, 2013.

KEROS V, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, pg. 1670-1683, 2009.

KIM S, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 61, n. 4, pg. 431-442, 2018.

KIM SS, et al. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, pg. 1045-51, 2011.

KIM SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, pg.1-11, 2006.

KLOTZ T, et al. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer**, v. 82, pg.1897-903, 1998.

LEE RK, et al. Blastocyst development after cryopreservation, and subcutaneous transplantation of mouse ovarian tissue. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, n. 2, pg. 95-101, 2005.

LIU J, et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 17, pg. 605-11, 2002.

LUCCI CM, et al. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, pg. 1101-1114, 2004.

LUYCKX V, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. **Fertility and Sterility**, v. 101, pg. 1149- 1156, 2015.

LUYCKX V, et al. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, n. 1, pg. 83, 2013.

MANDELBAUM J, et al. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. **Human Reproduction**, v. 2, pg. 709-715, 1988.

MEIROW D, et al. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. **Fertility and Sterility**, v. 106, pg. 467-474, 2016.

MEIROW D, et al. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. **Human Reproduction**, v. 23, pg.1007-1013, 2008.

MIGISHIMA F, et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, pg. 881-887, 2003.

NASRABADI HT, et al. Preservation of mouse ovarian tissue follicle morphology and ultra-structure after vitrifying in biotechnological protocols. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, pg.8-7, 2015.

OEHNINGER S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. **Journal of the Society for Gynecology Investigation**, v. 12, pg. 222–31, 2005.

OKTAY K, TURKCUOGLU I, RODRIGUEZ-WALLBERG KA. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: What is the explanation? **Fertility and Sterility**, v. 95, 2011.

OLIVEIRA FTB. Análise do desenvolvimento de folículos pré-antrais e da matriz extracelular ovariana após vitrificação de tecido ovariano ovino. 2013. Dados não publicados.

ONIONS VJ, et al. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. **Human reproduction**, v. 23, n. 3, pg. 606-618, 2008.

OSKAM IC, ASADI BA, SANTOS RR. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing procedures. **Fertility and Sterility**, v. 93, pg. 2764–2766, 2010.

PARKES A.S. Survival time of ovarian homografts in two strains of rats. *Journal of Endocrinology*; v. 13, pg. 201-210, 1956.

PARMEGIANI L, et al. Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. **Human Reproduction**, v. 23, pg. 1771–1777, 2008.

RAHIMI G, et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, pg. 187- 193, 2004.

RAHIMI, G, et al. Revascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 149, n. 1, pg. 63- 67, 2010.

SALLE, B. et al. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 1, pg. 172-177, 2003.

SANTOS RR, et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 91, pg. 249–263, 2006a.

SANTOS RR, et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*, v. 327, pg. 167-176, 2007.

SCALERCIO SRRA, et al. Immunolocalization of Growth, Inhibitory, and Proliferative Factors Involved in Initial Ovarian Folliculogenesis From Adult Common Squirrel Monkey (*Saimiri collinsi*). **Reproductive Sciences**, v. 22, pg. 68-74, 2015.

SCHOLZEN T, GERDES J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. **Journal of Cellular Physiology**, n. 182, pg. 311–322, 2000.

SHARMA GT, et al. Vitrification of in vitro matured goat oocytes and the effect on in vitro fertilization. **Small Ruminant Research**, v. 64, pg. 82-86, 2006.

SMITZ J, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 4, pg. 395–414, 2010.

SUMMERS MC, et al. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biology of Reproduction*, v. 53, pg. 431–437, 1995.

SUZUKI N, et al. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. **Human Reproduction**, v. 27, pg. 2420–2429, 2012.

TANAKA A, et al. Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 44, n. 10, pg. 1947-1955, 2018.

TAO T, DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v. 25, n. 7, pg. 287-96. 2008.

TING AY, et al. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, pg. 2461–2472, 2011.

VAN DER VEN H, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. **Human Reproduction**, v. 31, pg. 2031–2041, 2016.

VERHAGEN PCMS, et al. Prognostic factors in localized prostate cancer with emphasis on the application of molecular techniques. **European Urology**, v. 41, pg. 363-71, 2002.

WIETCOVSKY L, et al. Ovarian tissue vitrification and heterotopic autologous transplantation in prepubertal Wistar rats. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, v. 22, n. 2, pg. 116-122, 2018.

YANG HY, et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and

quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**, v. 131, n. 5, pg. 851-859, 2006.

ZHAO S et al. O LDOC1 inibe a proliferação e promove a apoptose reprimindo a ativação do NF- κ B no carcinoma papilífero da tireoide. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, pg. 1-12, 2015.

ZHOU XH, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, v. 60, pg. 101- 105, 2010.