

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Sistema de levitação magnética associada à nanopartículas: um novo sistema de cultivo tridimensional *in vitro* para fragmentos ovarianos bovinos

DEIZE DE CÁSSIA ANTONINO RISSATO

RIBEIRÃO PRETO
2023

DEIZE DE CÁSSIA ANTONINO RISSATO

Sistema de levitação magnética associada à nanopartículas: um novo sistema de cultivo tridimensional *in vitro* para fragmentos ovarianos bovinos

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa
e Silva

Ribeirão Preto

2023

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.

Rissato, Deize de Cássia Antonino

Sistema de levitação magnética associada à nanopartículas: um novo sistema de cultivo tridimensional in vitro para fragmentos ovarianos bovinos. Ribeirão Preto, 2023.

95 p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia. Ana Carolina

Orientador: Rosa, Ana Carolina Japur de Sá.

1. Tecido ovariano; 2. Folículos pré-antrais; 3. Cultivo tridimensional; 4. Nanopartículas; 5. Levitação magnética; 6. Alginato; 8. Fibrina-alginato.

Nome: RISSATO, Deize de Cássia Antonino

Título: **Sistema de levitação magnética associada à nanopartículas: um novo sistema de cultivo tridimensional *in vitro* para fragmentos ovarianos bovinos**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais Augusto e Antonia, as minhas irmãs Mislaine e Marcela e ao meu esposo Anderson. Esse doutorado é prova do amor e apoio incondicional de vocês. Certamente, não chegaria até onde estou sem a dedicação e amor que tanto recebi. Dedico também aos meus sobrinhos Davi, Luan e Théo e, em especial, ao meu amado filho Gael para que vocês saibam que a Ciência é a chave para um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a Nossa Senhora e a Santa Rita de Cássia por terem me guiado pelos caminhos que percorri e me acalmarem nos momentos difíceis nos quais pensei em desistir de todos os meus sonhos.

Aos meus pais, Augusto e Antonia, às minhas irmãs, Mislaine e Marcela, pelo amor, carinho, exemplos e força que sempre me deram. Se hoje estou conquistando mais um sonho, saibam que vocês foram a principal motivação para superar cada obstáculo. Essa vitória é de todos.

Ao meu marido Anderson, por estar sempre ao meu lado, apoiando e compreendendo os momentos de ausências e nervosismo. Você foi essencial para o término desse ciclo.

Ao meu filho Gael, que chegou no meio do doutorado e me mostrou o que é ter força e dedicação em meio ao caos. Filho, você é a minha motivação diária.

A minha orientadora profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva pela oportunidade, ensinamentos, confiança, paciência, compreensão e dedicação. Serei eternamente grata por todo apoio e conhecimento adquirido.

À Mayara Mafra que sempre esteve presente em todos os experimentos e me ajudou em todos os momentos. Não tenho como te agradecer por tudo o que você fez por mim.

À Paula Alvarenga e à Priscilla Flávia que mesmo tão distantes se fizeram presentes e me ajudaram com muito carinho e apoio.

Aos docentes Dr. Marcelo Beletti, Dra. Maria Célia Jamur e Dra. Luciane Carla Alberici por colaborarem com os experimentos e análises dos resultados.

Aos técnicos e responsáveis dos laboratórios, Maria Aparecida Vasconcelos, Vani Alves, Maria Dolores, Elizabete Milani, José Maulim, Roberta Rosalis, Dimitrius Pitol e a Mariani Franco.

Aos colegas da USP, Aline Sawa, Caroline Mantovani, Isabela Verzemiassi, Israel Silveira, Julia Menezes, Jonathas Santos, Luana Watanabe muito obrigada pelo apoio e colaboração.

Aos pesquisadores Kele Alves e Benner Alves pelo apoio no início do projeto.

Aos laboratórios, Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (BIOCEL) da FMRP, Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do BIOCEL, Laboratório Multiusuário de Histotécnica do BIOCEL, Laboratório do Grupo de análise de metabolismo mitocondrial e exercício (GAME) do Departamento de Ciências Biomoleculares da FCFRP e do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP, Laboratório de Análise de Imagem do Departamento de Biologia Básica e Oral da FMRP e a Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM/PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia por fornecerem os equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da FMRP e aos docentes do programa, muito obrigada pelo suporte e ensinamentos.

À secretária do programa de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da FMRP, Suelen Bezerra, por todo o apoio, atenção e paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para custear a execução do projeto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

RISSATO, D. C. A. **Sistema de levitação magnética associada à nanopartículas: um novo sistema de cultivo tridimensional *in vitro* para fragmentos ovarianos bovinos.** 2023. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Objetivo: avaliar a viabilidade, atividade mitocondrial, oxidação e danos no tecido conjuntivo de tecido ovariano bovino cultivado em três diferentes sistemas 3D: levitação magnética (LM), matriz de fibrina-alginato (FA) ou matriz de alginato (ALG). **Métodos:** Fragmentos ovarianos foram cultivados *in vitro* com nanopartículas de ouro e óxido de ferro reticuladas por poli-L-lisina (LM) ou FA 1% ou ALG 1%. Os fragmentos foram subdivididos em controle fresco (FC, D0), dia 1 (D1) e dia 7 (D7) após o cultivo. Os fragmentos foram avaliados quanto a viabilidade folicular, fibrose (Picosirius Red), níveis intercelulares de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, técnica de DCF) sinais de degeneração celular (técnica de iodeto de propídio) e atividade mitocondrial (técnica MitoTracker Orange CMTMRose). As análises estatísticas realizadas foram teste de Kruskal-Wallis, ANOVA, teste exato de Fisher e qui-quadrado por meio do software SAS. **Resultados:** *Viabilidade folicular:* o LM apresentou uma maior ($P < 0,05$) quantidade de folículos normais quando comparado aos demais grupos (FA e ALG). O ALG foi o grupo que mais ($P < 0,05$) apresentou folículos anormais em comparação ao LM e a FA. *Fibrose:* o LM apresentou mais semelhanças ($P > 0,05$) ao CF com relação a quantidade de colágeno tipo I e III. *Produção de ROS:* todos os grupos apresentaram produção de ERO maior ($P < 0,05$) quando comparados ao CF ($P > 0,05$). *Viabilidade tecidual:* Ao comparar a LM, a FA e o ALG com o CF, observou-se menores ($P < 0,05$) taxas de degeneração tanto em D1 quanto em D7. *Atividade mitocondrial:* com relação aos dias D1 e D7, constatou-se que a

LM e a FA apresentaram diminuição ($P < 0,05$) das taxas em D7. **Conclusão:** O cultivo tridimensional por levitação magnética favorece e preserva a morfologia, a vitalidade e a capacidade respiratória do tecido ovariano durante o cultivo *in vitro*, sendo mais eficiente em termos de ativação folicular do que os demais cultivos. Nas primeiras 24 horas parece haver um período de reparo após estresse de toda manipulação tecidual. Além disso, em D1 há uma maior taxa de ativação folicular sugerindo não haver necessidade de um cultivo tão extenso para a obtenção de folículos ativados com a morfologia normal. Assim, o cultivo tridimensional por levitação é um método promissor para o cultivo *in vitro* de tecido ovariano com folículos pré-antrais inclusos.

Palavras-Chave: Tecido ovariano. Folículos pré-antrais. Cultivo tridimensional. Nanopartículas. Levitação magnética. Alginato. Fibrina-alginato.

ABSTRACT

RISSATO, D. C. A. **Magnetic levitation system associated with nanoparticles: a new three-dimensional in vitro culture system for bovine ovarian fragments.** 2023. 62 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – Graduate Program in Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Objective: to evaluate the viability, mitochondrial activity, oxidation and connective tissue damage of bovine ovarian tissue cultured in three different 3D systems: magnetic levitation (LM), fibrin-alginate matrix (FA) or alginate matrix (ALG). **Methods:** Ovarian fragments were cultured in vitro with gold and iron oxide nanoparticles crosslinked by poly-L-lysine (LM) or 1% FA or 1% ALG. The fragments were subdivided into fresh control (FC, D0), day 1 (D1) and day 7 (D7) after cultivation. The fragments were evaluated for follicular viability, fibrosis (Picrosirius Red), levels of intercellular production of reactive oxygen species (ROS, DCF technique), signs of cell degeneration (propidium iodide technique) and mitochondrial activity (MitoTracker Orange CMTMRose technique). The statistical analyzes carried out were the Kruskal-Wallis test, ANOVA, Fisher's exact test and chi-square using the SAS software. **Results:** *Follicular viability:* LM showed a greater ($P < 0.05$) number of normal follicles when compared to the other groups (FA and ALG). ALG was the group that most ($P < 0.05$) presented abnormal follicles compared to LM and FA. *Fibrosis:* LM showed more similarities ($P > 0.05$) to FC regarding the amount of type III and I collagen. *ROS production:* all groups showed higher ROS production ($P < 0.05$) when compared to CF ($p > 0.05$). *Tissue viability:* When comparing LM, FA and ALG with CF, lower ($P < 0.05$) degeneration rates were observed in both D1 and D7. *Mitochondrial activity:* regarding days D1 and D7, it was found that LM and AF showed a decrease ($P < 0.05$) in rates on D7. **Conclusion:** Three-dimensional cultivation

by magnetic levitation favors and preserves the morphology, vitality and respiratory capacity of the ovarian tissue during in vitro cultivation, being more efficient in terms of follicular activation than other cultures. In the first 24 hours there seems to be a repair period after the stress of all tissue manipulation. In addition, in D1 there is a higher rate of follicular activation, suggesting that there is no need for such an extensive culture to obtain activated follicles. Thus, three-dimensional levitation cultivation is a promising method for in vitro cultivation of ovarian tissue with preantral follicles included.

Keywords: Ovarian tissue. Preantral follicles. Three-dimensional cultivation. nanoparticles. Magnetic levitation. Alginate. Fibrin-alginate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da foliculogênese.....	24
Figura 2. Sistema de cultura em <i>multistep</i> a partir do cultivo <i>in vitro</i> do córtex ovariano.....	27
Figura 3. Cultura tridimensional de folículos pré-antrais com nanopartículas magnéticas.....	30
Figura 4. Ilustração histológica de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento no córtex ovariano.....	31
Figura 5. Fragmentos com nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina nas concentrações de 300 µL/mL e 400 µL/mL levitando com auxílio do drive magnético.....	43
Figura 6. Porcentagem de folículos pré-antrais bovinos morfologicamente normais em tecidos ovarianos fresco (não cultivado) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	52
Figura 7. Figuras da coloração de Picrosirius Red obtidas a partir de microscopia de luz polarizada de tecidos ovarianos.....	54
Figura 8. Figuras da emissão de fluorescência do iodeto de propídio obtidas a partir de microscopia confocal de tecidos ovarianos.....	56
Figura 9. Figuras da emissão de fluorescência do DCF obtidas a partir de microscopia confocal de tecidos ovarianos.....	58
Figura 10. Figuras da emissão de fluorescência do MitoTracker obtidas a partir de microscopia confocal de tecidos ovarianos.....	60
Figura 11. Média de Routine de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 ou 7 dias.....	62
Figura 12. Média de LEAK de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 ou 7 dias.....	63
Figura 13. Média de ETS de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 e 7 dias.....	64

Figura 14. Média da razão LEAK/ETS de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 e 7 dias.....	74
Figura 15. Média da razão Routine-LEAK/ETS de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante durante 1, 3, 5 ou 7 dias.....	66
Figura 16. Micrografias eletrônicas de células da granulosa de folículos pré-antrais bovino..	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de folículos primordiais, ativados e degenerados em tecidos ovarianos cultivados em sistemas tridimensionais.....	51
Tabela 2. Média \pm desvio padrão de colágeno tipo I em tecidos ovarianos fresco (não cultivado) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	55
Tabela 3. Média \pm desvio padrão de colágeno tipo III em tecidos ovarianos fresco (não cultivado) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	55
Tabela 4. Média \pm desvio padrão de fluorescência do iodeto de propídio em tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	57
Tabela 5. Média \pm desvio padrão de fluorescência do DCF em tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	59
Tabela 6. Média \pm desvio padrão de fluorescência do <i>MitoTracker</i> em tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	61
Tabela 7. Proporção da área de mitocôndrias pela área total do tecido ovariano (%), fresco ou cultivados, em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	67
Tabela 8. Área (μm^2) média das mitocôndrias de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	68
Tabela 9. Número absoluto de mitocôndrias de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.....	69

LISTA DE SIGLAS

ALG: matriz de alginato

BIOCEL: Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

BSA: Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂: Dióxido de Carbono

COC: complexo *cumulus* oócito

DCF: diclorofluoresceína

DCFH: diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA: 2'7' dihidrodiclorofluoresceína

DNA: ácido desoxirribonucleico

EROs: espécies reativas de oxigênio

FA: matriz de fibrina-alginato

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FSH: hormônio folículo estimulante

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GAME: Grupo de Análise de Metabolismo Mitocondrial e Exercício

ITS: *Insulin, transferrin and selenium* (Insulina, transferrina e selênio)

LH: hormônio luteinizante

LM: levitação magnética

MEC: matriz extracelular

MEM: *Minimal essential medium* (Meio essencial mínimo)

mL: Mililitro

O₂: Oxigênio

$p < 0,05$: Probabilidade de erro menor do que 5%

$p > 0,05$: Probabilidade de erro maior do que 5%

SAS: *Statistical Analysis System* (Sistema de análise estatística)

α -MEM: *Alpha minimal essential medium* (Meio essencial mínimo alfa)

μg : Microgramas

μL : Microlitro

μm : Micrômetro

μM Micromolar

2D: bidimensional

3D: tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

< Menor

= Igual

> Maior

± Mais ou Menos

≥ Maior ou igual

°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
FOLICULOGÊNESE OVARIANA.....	23
SISTEMAS DE CULTIVO FOLICULAR.....	26
MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DO TECIDO OVARIANO CULTIVADO	30
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
4 METODOLOGIA	39
<i>EXPERIMENTO 1: TESTE DE CONCENTRAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS NO CULTIVO TRIDIMENSIONAL IN VITRO DE FRAGMENTOS OVARIANOS</i>	Erro! Indicador não definido.
<i>EXPERIMENTO 2: TESTE DE DIFERENTES MATRIZES NO CULTIVO TRIDIMENSIONAL IN VITRO DE FRAGMENTOS OVARIANOS</i>	39
REAGENTES E MEIOS DE CULTIVO	40
COLETA DO MATERIAL E TRANSPORTE.....	41
OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS	41
MATRIZ DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA.....	42
MATRIZ DE ALGINATO 1%.....	44
MATRIZ DE FIBRINA-ALGINATO.....	44
AVALIAÇÕES DOS FRAGMENTOS OVARIANOS	45
ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
PICROSIRIUS RED.....	46
MICROSCOPIA CONFOCAL	46
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	47
RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO (OROBOROS)	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS.....	50
<i>EXPERIMENTO 1</i>	Erro! Indicador não definido.
<i>EXPERIMENTO 2</i>	50
6 DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIA.....	81

1 INTRODUÇÃO

O câncer pode atingir uma porcentagem estimada de 2,5% das mulheres em idade reprodutiva ativa (menos de 40 anos) (ARAÚJO *et al.*, 2015; BUS *et al.*, 2019). Sabe-se, que os tratamentos com quimioterapia e a radioterapia podem causar danos ao tecido ovariano e conseqüentemente aos gametas. Portanto, é provável que as pacientes apresentem fertilidade comprometida após o tratamento (BUS *et al.*, 2019; LEE, STEPHANIE *et al.*, 2006). Diante de diagnósticos mais precisos e tratamentos mais eficazes, os índices de sobrevivência a essa doença são cada vez maiores, aumentando o interesse em proporcionar a melhor qualidade de vida a essas pacientes (DUNCAN *et al.*, 2019). Desta forma, a preservação da fertilidade é uma estratégia importante não somente para os humanos como também para os animais ameaçados de extinção e/ou de alto valor genético (BUS *et al.*, 2019).

A pesquisa com tecido ovariano humano enfrenta barreiras éticas e disponibilidade limitada que dificultam o aprimoramento e desenvolvimento de novas técnicas (FRANSOLET *et al.*, 2014). Assim, estudos translacionais com modelos animais têm sido realizados em diversas espécies (ALVES *et al.*, 2016; FRANSOLET *et al.*, 2014; TELFER; ZELINSKI, 2013). A espécie bovina é apontada (ARAÚJO *et al.*, 2014a; BAERWALD, 2009) como modelo experimental comparativo destes estudos com dupla aptidão, por favorecer o avanço genético e conservação desta espécie e fornecer informações importantes a serem aplicadas na clínica reprodutiva humana. Além do mais, estes ovários têm razoável disponibilidade em frigoríficos e são bons modelos de estudos para compreensão do desenvolvimento folicular.

Existem algumas ferramentas disponíveis para preservação da fertilidade da fêmea como a criopreservação de oócitos, a criopreservação de embriões e a criopreservação de tecido ovariano. Atualmente, as técnicas mais empregadas são as criopreserções de oócitos e embriões (REVELLI *et al.*, 2012; WALLACE, 2011; HUSSEIN; KHAN; ZHAO, 2020). Entretanto, existem alguns limitantes dessas técnicas como: 1) exige que a paciente/animal

esteja em idade puberal, 2) a paciente não ter tempo hábil para realizar a estimulação e a captação dos oócitos antes do início do tratamento oncológico (ROSENDAHL; GREVE; ANDERSEN, 2013), 3) o animal morrer antes da indução para a punção folicular, 4) além do custo financeiro significativamente elevado. Assim, a criopreservação de tecido ovariano com folículos pré-antrais inclusos é a única opção para meninas e mulheres pré-púberes que não podem atrasar o início dos tratamentos (LAMBERT *et al.*, 2018).

Entretanto, os folículos inclusos no tecido removido e criopreservado encontra-se em estágio primordial, ou seja, inativo. Fisiologicamente, estes folículos permaneceriam neste estado até o momento de recrutamento e crescimento para ovular em ciclos subsequentes, sendo o processo de ativação folicular ainda pouco esclarecido. Desta forma, o armazenamento destes folículos inativos demanda o desenvolvimento de estratégias para se ativar e desenvolver o folículo em todas as etapas de amadurecimento para a formação de um oócito maduro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FOLICULOGÊNESE OVARIANA

Para compreender melhor a dinâmica folicular e desenvolver técnicas mais eficazes a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), também conhecida como Ovário Artificial, possibilita realizar estudos visando compreender a foliculogênese inicial e os diversos fatores que influenciam o desenvolvimento folicular (ARAÚJO *et al.*, 2014). Os folículos são divididos em pré-antrais e antrais. Os pré-antrais são classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (Figura 1) em: primordial (oócito imaturo em prófase I localizado no centro do folículo e rodeado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso), transição (oócito em crescimento e multiplicação das células da granulosa com mudança morfológica de pavimentoso para

cubóide), primário (oócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide) e secundário (oócito imaturo rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide e presença de células da teca quando em estágio mais avançado). Os folículos terciários ou antrais apresentam a formação do antro (cavidade com líquido folicular) entre as várias camadas das células da granulosa e com a proliferação das células somáticas e aumento do fluido folicular, o folículo se torna pré-ovulatório (transição entre prófase I e metáfase II). Devido ao efeito do pico do hormônio luteinizante/hormônio folículo-estimulante (LH/FSH) (o que ocorre na puberdade), o folículo pré-ovulatório libera complexo *cumulus* oócito (COC) (TELFER, Evelyn E.; ZELINSKI, 2013; ADONA; MONZANI; GUEMRA, 2013).

Os primordiais (forma quiescente) estão estacionados na prófase da primeira meiose.

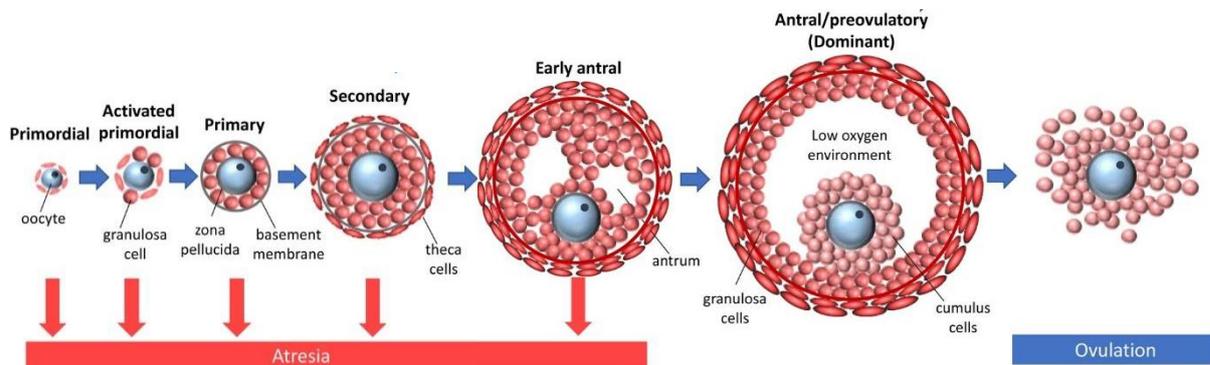


Figura 1. Estágios da foliculogênese. Os folículos primordiais consistem em um oócito imaturo (prófase I) circundado com células da pré-granulosa pavimentosa. Após a ativação, o folículo de transição (oócito em crescimento e multiplicação das células da granulosa com mudança morfológica de pavimentoso para cubóide) se desenvolvem em folículos primários (uma camada de células da granulosa de formato cuboide). O folículo secundário possui duas ou mais camadas de células da granulosa, uma camada das células da teca e um oócito com uma zona pelúcida completamente formada. Já o antral ou o folículo de Graaf é o último estágio do desenvolvimento folicular. Esse estágio é marcado pela presença de uma cavidade antral cheia de fluido folicular. Neste momento, o oócito alcança a retomada meiótica e continua a oogênese finalizando a meiose I. O oócito permanece em metáfase II até a fertilização (LIM; THOMPSON; DUNNING, 2021 com modificações).

A maioria dos folículos (95%) presente nos ovários das fêmeas jovens está em estágio primordial, eles permanecem em repouso (prófase da meiose I) até que haja um estímulo para que voltem a crescer (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A ativação folicular é irreversível e uma vez que os folículos primordiais deixam o *pool* quiescente, continuam a foliculogênese ou sofrem atresia (ARAÚJO *et al.*, 2014; FIGUEIREDO, ROBERTO; 1999).

2.2 SISTEMAS DE CULTIVO FOLICULAR

Os atuais sistemas de cultivo *in vitro* de tecido ovarino e folículos pré-antrais isolados ainda não mimetizam de forma ideal o ambiente intra ovariano *in vivo* (CHOI *et al.*, 2014). Sendo assim, são necessários testes para desenvolver condições de cultivos mais eficazes, bem como aprimorar os tipos de sistemas de cultivo *in vitro*, visando manter a integridade dos folículos pré-antrais com o desenvolvimento antral e a capacitação oocitária, a fim de se obter um ócito maduro (MII) e saudável para realização de procedimentos de fertilização *in vitro*.

Neste sentido vale destacar que a conservação do tecido envolve não só manter o folículo viável mas também a matriz extracelular (MEC) que o suporta. A MEC ovariana é uma rede que forma o andaime 3D no qual residem os folículos e as células do estroma. A MEC possui uma estrutura estável, fornecendo suporte físico, assim como propriedades bioquímicas e biomecânicas necessárias para a morfogênese, diferenciação e homeostase do tecido (THEOCHARIS *et al.*, 2016). Além disso, ela também é um reservatório de fatores de crescimento e hormônios regulando de forma espacial e temporal sua difusão e disponibilidade dentro do tecido ovariano (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; TAIPALE; KESKI-OJA, 1997). O estudo dos efeitos dos cultivos sobre a MEC é imprescindível para eleger o sistema mais eficiente.

Para aprimorar as técnicas de cultivo são necessários diversos estudos que confrontem barreiras éticas e a baixa disponibilidade de tecido humano para pesquisa (FRANSOLET *et al.*, 2014). Assim, a espécie bovina é apontada como modelo animal experimental comparativo com dupla aptidão: favorecer o avanço genético e conservação desta espécie, e as semelhanças na morfologia e função ovariana permite compreender a dinâmica folicular humana (ARAÚJO *et al.*, 2014; BAERWALD, 2009; BUS *et al.*, 2019).

Estudos anteriores reportaram o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* para obter maior taxa de maturação meiótica a partir de folículos primordiais (TELFER, *et al.*, 2008;

TELFER; MCLAUGHLIN, 2012; XIAO *et al.*, 2015). Porém, para alcançar o desenvolvimento completo de folículos que estão em estado quiescente é necessário um sistema de cultivo em várias etapas (*multistep*) (Figura 2).

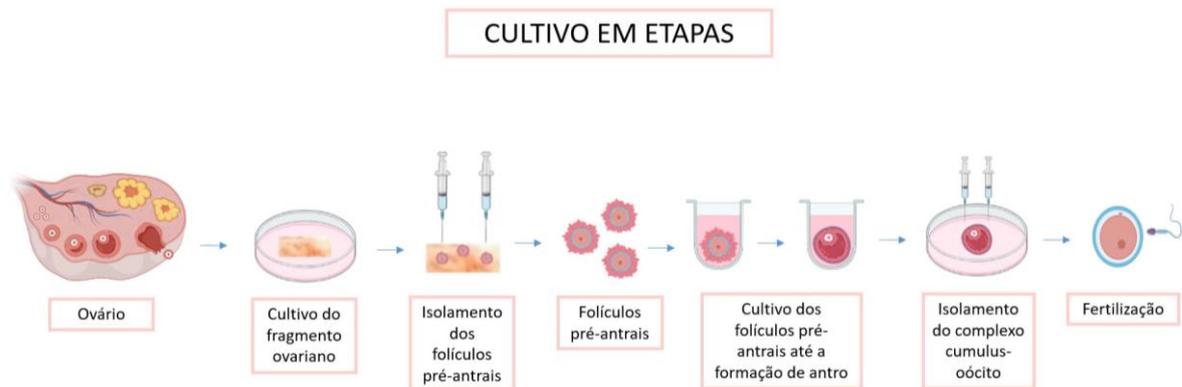


Figura 2. Sistema de cultura em *multistep* a partir do cultivo *in vitro* do córtex ovariano. Etapa 1: (a) ativação *in vitro* do fragmento do córtex ovariano por 7 dias, em seguida, microdissecção dos folículos pré-antrais. Etapa 2: (b) folículos pré-antrais cultivados individualmente até a formação do antro (c). Etapa 3: isolamento do complexo granulosa e oócito (d) do folículo intacto para crescimento adicional nas membranas (e). Etapa 4: complexos cumulus oócito são colocados no meio para maturação *in vitro* (IVM) e possível fertilização (Fonte: elaborado pela autora).

A primeira etapa envolve o cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano, com a ativação e o desenvolvimento dos folículos primordiais (*pool* quiescente). Já na segunda etapa, é necessário realizar a microdissecção dos folículos secundários e fornecer as condições ideais para o desenvolvimento até o estágio antral. A terceira etapa consiste na obtenção de oócitos aptos para a maturação *in vitro* (MIV) (TELFER, 2019). Em busca de se obter mais conhecimento sobre o cultivo *in situ* de tecido ovariano e de folículos pré-antrais isolados, vários estudos foram desenvolvidos com o sistema convencional (bidimensional - 2D) (NATION; SELWOOD, 2009b; ARAÚJO *et al.*, 2015; SADR *et al.*, 2015; CORREIA *et al.*, 2020; PAIS *et al.*, 2021) e encapsulados em matrizes (tridimensional - 3D) (ZHOU *et al.*, 2015; LARONDA *et al.*, 2014b; CORREIA *et al.*, 2020; PAIS *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2022). No

cultivo 2D, o tecido ovariano e o folículo isolado ficam diretamente em contato com a superfície da placa e, por isso, as células do estroma ovariano e foliculares aderem-se à superfície da mesma causando uma difusão da morfologia folicular que não corresponde à fisiológica (CHOI; AGARWAL; HE, 2013). No entanto, quando o material biológico é encapsulado e/ou cultivado *in vitro* no sistema 3D, a arquitetura é preservada de forma semelhante a original, mantendo um ambiente similar à matriz extracelular do ovário (ANTONINO *et al.*, 2019; TELFER, 2019; TELFER; MCLAUGHLIN, 2012).

Diante dos resultados promissores dos cultivos de sistema 3D e a necessidade de aprimorar as técnicas, novas metodologias estão sendo desenvolvidas com o cultivo *in situ* e com o folículo pré-antral isolado. Há estudos utilizando sistema de gotas suspensas (ROWGHANI *et al.*, 2004), gotas de matrigel aderidas a superfície da placa (HIGUCHI *et al.*, 2015), encapsulamento com matrizes de hidrogel (KING *et al.*, 2011; LARONDA *et al.*, 2014a; LERER-SERFATY *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015) e *scaffold* de alginato (KEDEM *et al.*, 2011). Alguns exemplos das matrizes são: o alginato, o alginato com a fibrina e as nanopartículas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina associadas a levitação magnética. Os sais de ácido algínico (alginatos) derivam das algas marrons e a dissociação dos sais resulta nos hidrogéis de alginato (GREEN; SHIKANOV, 2016; SHEA; WOODRUFF; SHIKANOV, 2014). Mesmo preservando a morfologia folicular e sua eficácia ter sido determinada na foliculogênese de roedores, primatas e humana (GREEN; SHIKANOV, 2016), o alginato parece atuar como barreira ao crescimento folicular, assim como, à formação do antro (SILVA *et al.*, 2015; XU, Min *et al.*, 2006). XU e colaboradores (2013), constataram que alginato com fibrina melhora o desenvolvimento de folículos primários de macacas quando comparado ao alginato sozinho. Isso se deve pelo fato da fibrina ser degradada por proteases foliculares durante o cultivo e o alginato manter a morfologia do folículo sozinho em concentrações menores.

Neste contexto, um novo método inovador de sistema de cultivo 3D tem sido amplamente utilizado em diversas áreas de estudo (ANTONINO *et al.*, 2019; DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; HAISLER *et al.*, 2013; HOGAN; SOUZA; BIRLA, 2016; SOUZA *et al.*, 2010). Este método magnetiza o material biológico com nanopartículas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina e com o auxílio de uma placa que contém ímãs, o material levita no meio de cultivo, sem contato direto com a placa, mimetizando o ambiente *in vivo* e permitindo que desta forma os folículos e as células da MEC se desenvolvam de forma mais adequada (HAISLER *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2010). Este sistema 3D por levitação magnética possibilita a manutenção da viabilidade celular, a interação célula-célula e a síntese da matriz extracelular (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; HOGAN; SOUZA; BIRLA, 2016; LIN *et al.*, 2016a; SOUZA *et al.*, 2010). Antonino et al. (2019), concluíram que o sistema de cultivo 3D com nanopartículas associadas a levitação magnética de folículos ovarianos (Figura 3) propiciou o desenvolvimento *in vitro* dos folículos secundários bovinos com taxas superiores de viabilidade folicular, formação e manutenção do antro além de crescimento regular comparado ao sistema convencional. Zhao et al. (2018), observaram que folículos isolados de galinhas domésticas (*Gallus domesticus*), independentemente do método de isolamento, apresentaram taxas de sobrevivência e viabilidade superiores quando cultivados em matriz tridimensional de hidrogéis de alginato comparado ao cultivo bidimensional. Diante do exposto, acredita-se que o uso do sistema 3D por levitação magnética com nanopartículas influenciará positivamente no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos, assim como, em folículos secundários isolados com a preservação da estrutura folicular original e crescimento controlado da mesma.

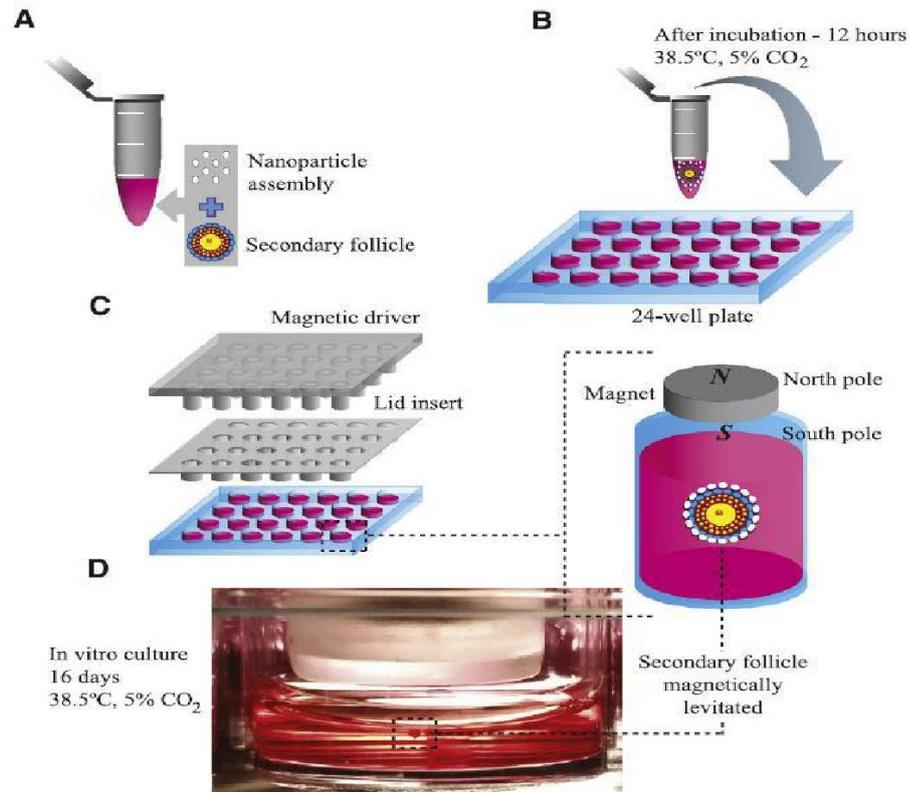


Figura 3. Cultura tridimensional de folículos pré-antrais com nanopartículas magnéticas. (A) Os folículos secundários foram incubados individualmente em microtubos com meio de cultura e montagem de nanopartículas; (B) os folículos foram transferidos para uma placa de 24 poços coberta com (C) um inserto de tampa e um *driver* magnético; (D) folículo secundário levitando após a magnetização (ANTONINO *et al.*, 2019).

2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DO TECIDO OVARIANO CULTIVADO

Uma das principais dificuldades dos cultivos foliculares é a manutenção da qualidade e da viabilidade dos folículos em crescimento e conseqüentemente dos oócitos obtidos. A manutenção do tecido ovariano uma vez extraído para cultivo *in vitro* depende da capacidade do sistema de cultivo em manter a nutrição e perfusão de oxigênio. Vários métodos são descritos na tentativa de se avaliar estes parâmetros de qualidade e viabilidade tecidual, tanto em relação à arquitetura do tecido (morfologia folicular (HE), ultraestrutura do tecido (microscopia eletrônica) e vitalidade celular de folículo e estroma por técnicas diversas (iodeto de propídio,

método do YO-PRO e Picrosirius). Além disso, também tem sido avaliada a capacidade funcional do tecido, seja pela produção hormonal, secreção de substâncias (como as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou atividade respiratória do tecido, esta última avaliada por técnicas distintas.

Com relação a avaliação estrutural do tecido tem se empregado a morfologia de folículos e estroma como forma de identificar processos de apoptose, degeneração em geral ou, ao contrário, capacidade proliferativa do tecido. Pela histologia clássica (hematoxilina e eosina, HE) pode-se classificar os folículos de acordo com o desenvolvimento folicular (Figura 4) (primordial, transição, primário e secundário) e também como normais (oócito com forma regular e citoplasma homogêneo, e camadas bem arranjadas de células da granulosa) ou degenerados (células com núcleo picnótico, ooplasma encolhido, células da granulosa desorganizadas e separadas da membrana basal) (PAIS *et al.*, 2021; PRAXEDES *et al.*, 2021).

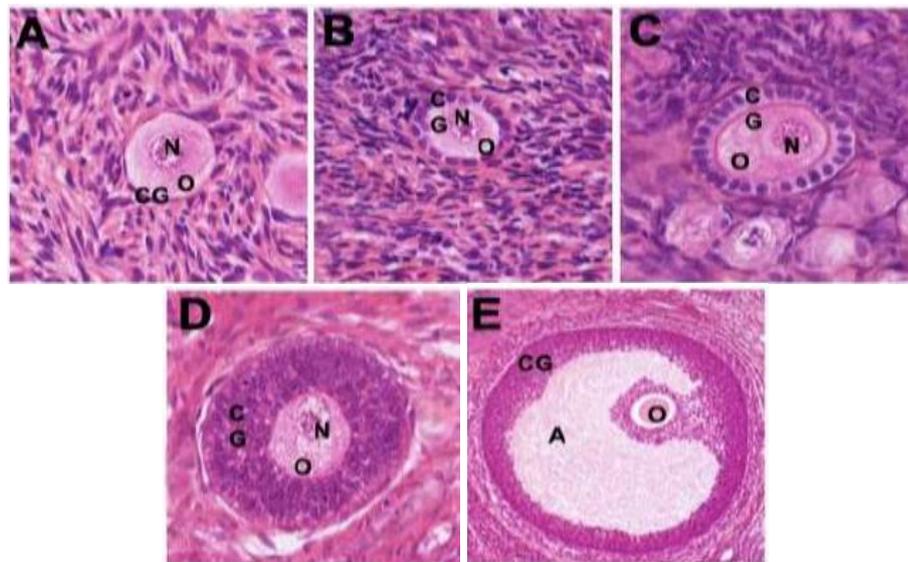


Figura 4. Ilustração histológica de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento no córtex ovariano. Folículo primordial (A), folículo de transição (B), folículo primário (C), folículo secundário (D) e folículo antral (E) (GUERREIRO, 2019 com modificações).

Para se avaliar necrose (degeneração) tecidual, pode-se utilizar o iodeto de propídio pois, cora somente o DNA e RNA de células necróticas, não atravessando a membrana de

células viáveis ou apoptóticas (YEOMAN; WOLF; LEE, 2005; ROCHA *et al.*, 2018). Porém, durante a apoptose a membrana plasmática se torna mais permeável, permitindo que o corante YO-PRO-1 penetre na célula que já está morta e core os ácidos nucleicos (IDZIOREK *et al.*, 1995).

Além da capacidade de manter os folículos com a morfologia normal, um bom cultivo deverá também manter a vitalidade estromal, sendo esta uma das maiores dificuldades dos cultivos. A matriz extracelular (MEC) ovariana é uma rede macromolecular associada à superfície celular que forma o andaime 3D no qual residem os folículos e as células do estroma. Existem evidências que sugerem o envolvimento da MEC durante a foliculogênese, particularmente durante a ativação do folículo primordial. De acordo com a composição, organização e densidade espacial da MEC, o ovário é dividido em dois compartimentos principais, o córtex, contendo principalmente folículos quiescentes, e a medula, contendo folículos em desenvolvimento (GROSBOIS, Johanne *et al.*, 2023). Acredita-se que a região cortical que é rica em colágeno (49% do matrissoma total) fornece um ambiente mais rígido que mantém a quiescência dos folículos. Já a medula, apresenta um ambiente mais flexível, permitindo a expansão e o crescimento folicular (WOODRUFF; SHEA, 2011).

A expressão de mRNA e proteína para os colágenos tipos I, III e IV foi demonstrada em biópsias de ovários de mulheres férteis (LIND *et al.*, 2006). O colágeno tipo I (constitui cerca de 90% dos tipos de colágeno) forma fibras largas com o agrupamento das fibrilas e está presente em quase todos os tecidos conjuntivos. O colágeno tipo III, é caracterizado por fibras finas e tende a associar-se com o colágeno tipo I, formando fibrilas heterotípicas. O do tipo IV, constitui redes (não forma fibrilas) que estão presentes nas membranas basais, que separam os epitélios do estroma conjuntivo associado.

Um dos métodos que permite uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo do estroma é o Picrosirius que avalia a coloração e a diferenciação dos diferentes

tipos de colágeno. Essa técnica também tem sido utilizada para o diagnóstico diferencial de neoplasias fibrocísticas (CARDONA; VARGAS; PERDOMO, 2013).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) *in vivo* é um processo fisiológico importante, sendo a síntese desencadeada durante a redução de oxigênio no interior da mitocôndria (LI *et al.*, 2017). As EROs são importantes mensageiras secundárias em várias cascatas de sinalização intracelular (LU *et al.*, 2018). Quando há a formação em excesso, pode ocorrer o desencadeamento do estresse oxidativo ocasionando estão a peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo aos ácidos nucleicos e carboidratos e ainda a oxidação de grupos sulfidrilas nas proteínas (COSTA *et al.*, 2022). Como consequência, há o mau funcionamento do DNA, perda da integridade da membrana e disfunção mitocondrial (WU *et al.*, 2011). Durante o cultivo *in vitro* dos folículos ou tecido ovariano, ele está associado a altas taxas de morte folicular (SAEED-ZIDANE *et al.*, 2017). O 2',7' diacetado diclorofluoresceína (H2DCF-DA) é utilizado na detecção EROs. As enzimas esterases intracelulares hidrolisam o DCFH-DA à DCFH, e este é oxidado por EROs resultando em 2',7' diclorofluoresceína (DCF) (FABBRI, Raffaella *et al.*, 2014). Este método detecta a quantidade de peróxidos no tecido sendo a fluorescência proporcional a oxidação, ou seja, quanto maior for a oxidação, maior será a fluorescência (GLEBSKA; KOPPENOL, 2003).

A verificação da ativação folicular, bem como a progressão dos estágios foliculares, também tem relevância na verificação da eficiência dos cultivos, sendo este o objetivo primário do processo. Sendo a classificação do estágio folicular, bem como a identificação de folículos já degenerados (taxa de folículos vivos ou degenerados) também um parâmetro relevante utilizado por diversos autores em estudos sobre o tema (FORTUNE, 2003; GOUGEON, 2010).

Uma vez em cultivo o tecido ovariano sofre ativação maciça dos folículos do *pool* de primordiais por falta de atividade inibitória estromal própria do ovário íntegro. Neste processo de desenvolvimento folicular a atividade respiratória da célula também aumenta, o que pode

ser verificado ao se medir o consumo de oxigênio pelo tecido (Respirometria de alta resolução - Oroboros), a distribuição de mitocôndrias pelo citoplasma celular, bem como área total de mitocôndrias (microscopia eletrônica de transmissão) e atividade mitocondrial propriamente dita (Mitotracker).

Dentre os métodos de avaliação da atividade mitocondrial, o mais utilizado é o Mitotracker. O MitoTracker é uma sonda fluorescente específica para mitocôndrias e permeante celular, é utilizada para detectar e localizar mitocôndrias com respiração ativa (com potencial de membrana mitocondrial ativo), dependendo de sua atividade oxidativa (LEONI *et al.*, 2015; MASCIANGELO *et al.*, 2021). A sonda é permeável à célula e contém uma porção de clorometil reativa ao tiol. Após o MitoTracker se acumular na mitocôndria, ele pode reagir com grupos tiol acessíveis em peptídeos e proteínas para formar um conjugado fixável com o aldeído (FABBRI *et al.*, 2016).

Recentemente, a utilização do OROBOROS Oxygraph-2, uma técnica que avalia o consumo tecidual de oxigênio, e vem sendo descrita como Respirometria de Alta Resolução. Se mede o consumo de oxigênio, permitindo a inferência da respiração basal total do tecido (routine), o consumo máximo de oxigênio sob estímulo (ETS), além de permitir diferenciar o consumo de oxigênio não relacionado à fosforilação do ATP (Leak) (PESTA; GNAIGER, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2021). Estes parâmetros indiretamente medem a manutenção ou perda da capacidade funcional do tecido ou célula analisada.

Logo, percebe-se que a caracterização da eficiência do cultivo na manutenção do tecido ovariano é muito mais ampla do que simplesmente verificar o comprometimento da morfologia folicular ou da presença de apoptose. Ao se comparar diferentes sistemas de cultivo com intuito de se eleger o melhor, deve-se levar em consideração estes múltiplos parâmetros, além obviamente, da capacidade de obtenção de oócito maduro, que aí sim, é o objetivo final do cultivo.

3 JUSTIFICATIVA

A necessidade da realização de tratamentos gonadotóxicos por algumas mulheres para o tratamento do câncer vem incentivando o desenvolvimento de técnicas de criopreservação de tecido germinativo e gametas para fins de preservação de fertilidade (CAMPOS; ROSA-E-SILVA, 2011; TELFER, 2019). Dentre as opções oferecidas, a criopreservação do tecido ovariano com folículos pré-antrais inclusos é a que proporciona a preservação de maior número de gametas, entretanto, uma vez que a maior população de folículos no tecido ovariano é constituída pelos primordiais inativos (EPPIG, 1996; PENG *et al.*, 2010), ainda não estão bem estabelecidas as biotécnicas para o cultivo *in vitro* visando a obtenção de oócitos maduros ao final do processo (BUS *et al.*, 2019).

Assim, MOIFOPA tem como objetivo otimizar o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, resultando em um aumento do potencial reprodutivo advindo dos fragmentos criopreservados (FIGUEIREDO; ROBERTO; SILVA, 1999). Diante desta necessidade de aperfeiçoamento das biotécnicas de cultivo *in vitro* de tecido ovariano, vários estudos têm sido desenvolvidos para aumentar a taxa de oócitos maduros recuperados provenientes de folículos primordiais ativados *in vitro*. Os cultivos 3D têm apresentado os melhores resultados (ANTONINO *et al.*, 2019; ARAÚJO, *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2014; HIGUCHI *et al.*, 2015; JACKSON *et al.*, 2009; KEDEM *et al.*, 2011; KING *et al.*, 2011; LARONDA *et al.*, 2014a; LERER-SERFATY *et al.*, 2013; PAES *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2010), porém, não há uma metodologia consolidada.

Já foi constatado que o alginato preserva a morfologia folicular de roedores, primatas e humana (GREEN; SHIKANOV, 2016), porém pode atuar como barreira ao crescimento folicular e à formação de antro (SILVA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2006). Quando adicionada a fibrina ao alginato é possível observar melhora no desenvolvimento de folículos primários de

macacas, pois, a fibrina pode ser degradada por proteases foliculares durante o cultivo diminuindo a rigidez do alginato sozinho (XU *et al.*, 2013).

Já o sistema 3D que utiliza levitação magnética com o auxílio de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina vem sendo testado em diferentes tipos celulares, com boa interação célula-célula, síntese da matriz extracelular e manutenção da viabilidade celular (ANTONINO *et al.*, 2019; DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; HOGAN; SOUZA; BIRLA, 2016; LIN *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2010), porém ainda não foi testado para o cultivo do tecido ovariano. Em um estudo com cultivo *in vitro* de folículos secundários bovinos isolados com nanopartículas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina associadas à levitação magnética, concluiu que o sistema 3D por levitação magnética manteve a viabilidade e desenvolvimento regular dos folículos em comparação sistema 2D (ANTONINO, 2017). Estes resultados foram o suporte para a ideia de cultivar os fragmentos ovarianos e folículos pré-antrais isolados neste sistema e desenvolver uma nova proposta de cultivo tridimensional *in situ* e de folículos pré-antrais isolados, pois, ainda não está claro qual é a melhor metodologia. Desta forma, desenvolver um novo método de cultivo tridimensional de folículos ovariano *in situ* e compará-lo aos sistemas já conhecidos, a fim de dar suporte ao uso do tecido ovariano congelado em situações de preservação de fertilidade feminina.

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

a) O cultivo *in vitro* em sistema 3D por levitação magnética associada à nanopartículas proporcionará melhor desenvolvimento e viabilidade dos folículos inclusos no tecido ovariano bovino se comparado aos cultivos com matrizes de alginato ou fibrina-alginato. Além disso, terão desenvolvimento de forma contínua favorecendo a viabilidade, formação de antro.

b) As taxas de atividade mitocondrial e das espécies reativas de oxigênio nos fragmentos e nos ovócitos cultivados *in vitro* no sistema 3D por levitação magnética serão mais equilibradas que os demais tratamentos.

4OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

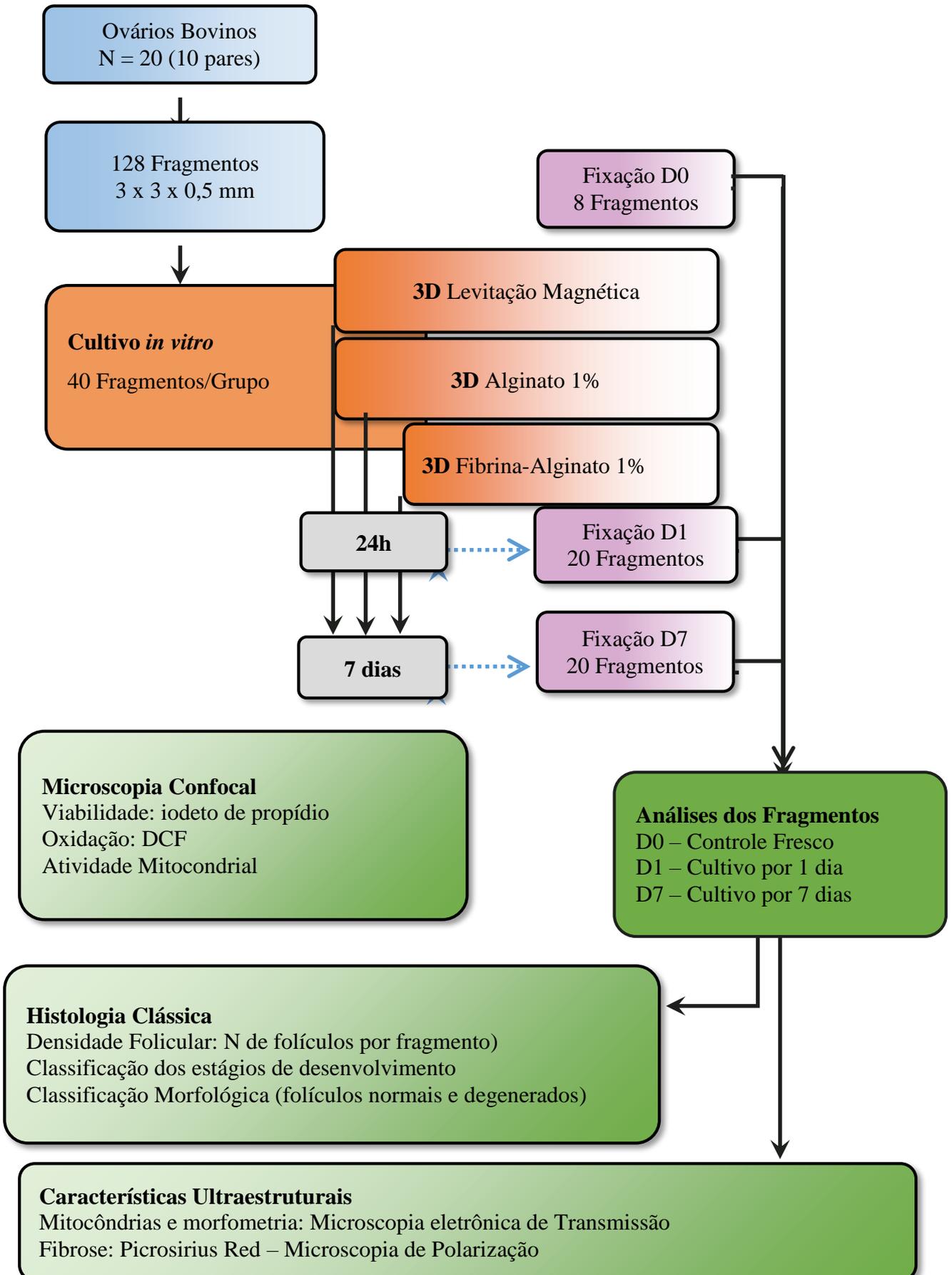
Avaliar a capacidade do sistema de cultivo por levitação magnética associada à nanopartículas em comparação aos cultivos tridimensionais com matriz de fibrina-alginato ou matriz de alginato, na manutenção estrutural e funcional do tecido ovariano bovino, durante a etapa *in situ* do cultivo *multistep*.

4.2 Objetivos específicos

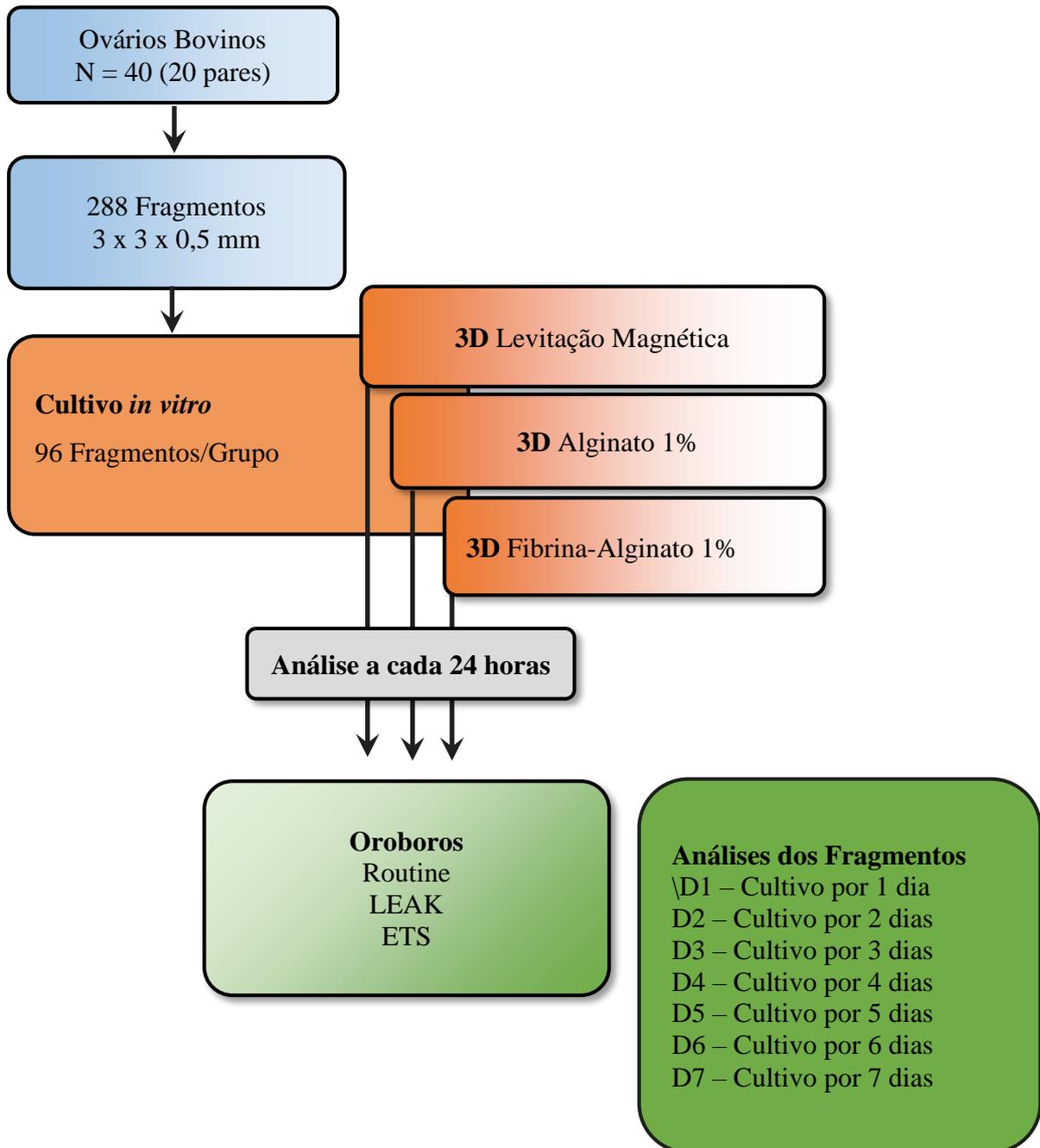
- a) Quantificar e classificar os folículos pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário) inclusos em tecidos ovarianos após 1 ou 7 dias de cultivo *in vitro*;
- b) Avaliar a viabilidade tecidual dos fragmentos cultivados nos diferentes tratamentos;
- c) Avaliar a atividade mitocondrial, a proliferação celular e a degeneração no tecido ovariano fresco e cultivado *in vitro* nos diferentes tratamentos;
- d) Avaliar se o tempo de cultivo *in vitro* influenciará na viabilidade tecidual nos diferentes tratamentos.

5 METODOLOGIA

EXPERIMENTO 1: TESTE DE DIFERENTES MATRIZES NO CULTIVO TRIDIMENSIONAL IN VITRO DE FRAGMENTOS OVARIANOS



EXPERIMENTO 2: TESTE RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO (OROBOROS)



REAGENTES E MEIOS DE CULTIVO

Os reagentes e sondas utilizados neste estudo foram provenientes da Sigma (Sto Louis MO, USA) a não ser que indicado de outra forma.

O meio de transporte e o de lavagem utilizado foi o meio alfa *Minimum Essential Medium Eagle* modificado (alfa MEM) com 25 mM de HEPES, suplementado com 100 µg/mL de amicacina e 100 µg/mL de estreptomicina. A temperatura de transporte foi de 4°C. O meio de cultivo *in vitro* dos fragmentos foi composto de alfa MEM suplementado com 1% de BSA, ITS (10 µg/mL insulina, 5,5 µg/mL transferrina, 4,0 ng/mL selênio, LifeTechnologies), 3 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 100 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de estreptomicina.

COLETA DO MATERIAL E TRANSPORTE

Foram utilizados ovários de fêmeas bovinas sem raça definida. Os ovários foram coletados em abatedouros, transportados em garrafa térmica com meio de transporte e processados no período máximo em 4 horas. Foi utilizada a temperatura de aproximadamente 4°C (CORREIA *et al.*, 2017).

OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS

Os ovários e fragmentos do córtex ovariano foram lavados e imersos em meio de lavagem (38°C). A fragmentação dos ovários foi realizada com o auxílio do Thomas Stadie-Riggs Tissue Slicer (Thomas Scientific), à espessura aproximada de 3 x 3 x 0,5 mm³.

Os fragmentos foram distribuídos entre os grupos: CF (8 fragmentos), concentração de 400 µL/mL (3D 400 µL/mL) de nanopartículas (40 fragmentos), matriz de alginato 1% (AG) (40 fragmentos) e matriz de fibrina-alginato 1% (FA) (40 fragmentos).

MATRIZ DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

Em nosso estudo prévio para determinação das melhores concentrações (200, 300 e 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas para o cultivo *in vitro* de tecido ovariano, foi possível testar pela primeira vez a eficiência do sistema de cultivo em Levitação Magnética (LM) para promoção da ativação de folículos inclusos em tecido ovariano, mantendo sua qualidade e capacidade de desenvolvimento. Foi constatado que o cultivo tridimensional por LM com nanopartículas foi eficiente em manter a viabilidade do tecido cultivado por um período de 7 dias, em ambas as concentrações testadas (300 ou 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$), demonstrando alta recuperação de folículos ativos viáveis ao final de 7 dias. Na padronização dos protocolos de cultivo, na etapa um do estudo prévio, ao se comparar com o cultivo 2D convencional, ambas as concentrações foram superiores na obtenção de folículos com a morfologia normal, sendo a maior concentração de partículas mais eficiente (68,78% versus 90,78% de folículos com a morfologia normal) e, por isso, escolhida como a concentração ideal para os demais cultivos. Além disso, também apresentou maiores taxas de ativação folicular e menores taxas de degeneração celular, apoptose e produção de EROs.

Para aderência entre o fragmento ovariano e as nanopartículas, os fragmentos foram transferidos de forma individual para poço de placas de 24 poços que continham gotas com 200 μL meio de cultivo sem nanopartículas.

Acrescentou-se ao meio de cultivo nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina (NanoShuttle™-PL, Greiner Bio-One) na concentração de 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Adicionou-se 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de meio de cultivo com nanopartículas sobre os fragmentos que já estavam submersos nas gotas de 200 μL de meio de cultivo sem nanopartículas, totalizando 300 μL . Durante quatro horas, foram incubados em estufa com 5% de CO_2 a 38,5°C com o *drive* magnético posicionado abaixo da placa para concentrar as nanopartículas próximas aos fragmentos ovarianos. Ao término desse período, os fragmentos foram transferidos

individualmente para outra placa de 24 poços com 500 μL de meio de cultivo e um *drive* magnético foi adicionado substituindo a tampa da placa. Após uma hora, foi possível visualizar os fragmentos em levitação (Figura 5).

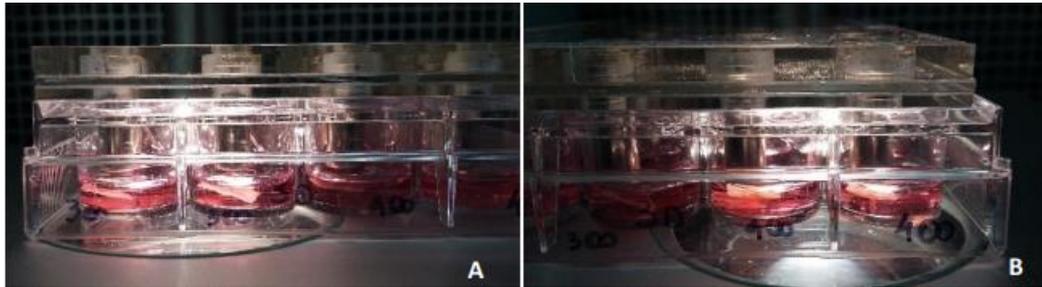


Figura 5. Fragmentos com nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina nas concentrações de 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ levitando com auxílio do *drive* magnético. A: fragmentos magnetizados com 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$. B: fragmentos magnetizados com 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

MATRIZ DE ALGINATO 1%

O estabelecimento do volume adequado de alginato para encapsular o tecido ovariano, foi realizado em experimento piloto para testar o encapsulamento com 50, 100 e 200 μL de alginato com o auxílio de uma pipeta Pasteur de 3 mL descartável, com a ponta cortada. A maior abertura da ponta da pipeta possibilitou a transferência do fragmento com o alginato para a solução de encapsulamento. Observou-se que o maior volume de alginato proporcionou o encapsulamento mais homogêneo do tecido.

O alginato foi preparado como descrito por Xu *et al.* (2013) na concentração de 1%. Cada fragmento foi lavado com 100 μL de alginato para remoção do meio de cultivo. Os fragmentos foram transferidos de forma individual para gotas de 200 μL de alginato fresco. Em seguida, foram adicionados em uma solução de encapsulamento (50 mM CaCl_2 e 140 mM NaCl). Os fragmentos encapsulados foram transferidos para as placas de cultivo e mantidos em estufa com 5% de CO_2 a 38,5°C, durante 7 dias.

MATRIZ DE FIBRINA-ALGINATO

A matriz de fibrina-alginato foi preparada como descrito em (SHIKANOV *et al.*, 2009a). Foi utilizada a fibrina do kit Tisseel (Baxter) de acordo com as instruções do fabricante. A matriz de fibrina-alginato foi preparada misturando 100 mg/mL da solução de fibrinogênio com solução de alginato a 1% (1:1). Em seguida, os fragmentos foram encapsulados e transferidos para as placas de cultivo de forma semelhante ao encapsulamento da matriz de alginato.

AVALIAÇÕES DOS FRAGMENTOS OVARIANOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os fragmentos destinados a histologia foram fixados em paraformaldeído a 4%, armazenados em álcool 70% e encaminhados para histologia clássica. Após a inclusão em parafina os fragmentos foram seccionados serialmente na espessura de 7 μ m (ALVES et al., 2015). Em seguida, procedeu-se a coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas utilizando no microscópio óptico (Centauro) em aumento de 400x. Para a captura de imagens foi utilizado o sistema VS120 da Olympus em um microscópio BX.

As variáveis analisadas foram: a viabilidade folicular; número de folículos por fragmento; classificação morfológica (folículos normais ou degenerados), e classificação quanto ao estágio de desenvolvimento. Os folículos foram classificados como normal quando o oócito e nucléolo estiverem preservados e circundados por uma ou mais camadas de células da granulosa organizadas. Já os folículos degenerados apresentaram o citoplasma retraído ou desorganizado com células da granulosa separadas da membrana basal e o oócito com núcleo picnótico. Os estágios de desenvolvimento dos folículos pré-antrais quantificados e avaliados foram: primordial (oócito imaturo localizado no centro do folículo e rodeado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso); transição (oócito em crescimento e multiplicação das células da granulosa com mudança morfológica de pavimentoso para cubóide); primário (oócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide) e secundário (oócito imaturo rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide e presença de células da teca quando em estágio mais avançado). Todas as avaliações e medições foram realizadas por um único operador.

PICROSIRIUS RED

A análise do picrosirius é um método sensível que permite a determinação de redes fibrilares de colágeno em cortes teciduais por meio de microscopia de luz polarizada (Junqueira et al., 1978). As cores vermelha e verde representam os colágenos tipo I e tipo III, respectivamente. Para a coloração PSR, as lâminas de tecido ovariano foram desparafinizadas em xilol e depois reidratadas em banhos seriados de etanol. Elas foram imersas em uma solução de coloração de picrosirius red (0,1%) diluído em ácido pícrico (1,2%) por vinte minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com *Hematoxylin Harris*, desidratadas e finalmente, foram montadas. As lâminas de todas as réplicas foram processadas ao mesmo tempo para minimizar a variação na intensidade da coloração. Os cortes ovarianos (CF: 4 cortes e LM, FA e ALG: 4 cortes em D1 e 4 cortes em D7 cada) foram analisados em microscopia de luz polarizada Nikon, Tóquio, Japão. Para avaliar a porcentagem de fibras de colágeno tipo I e III no tecido ovariano, foram fotodocumentados 40 campos diferentes (área 10377613653333 μm^2) no grupo CF e 80 campos (40 em D1 e 40 em D7) do mesmo tamanho nos grupos LM, FA e ALG. As imagens foram analisadas com aumento de 400x. Com o auxílio do software Fiji, utilizou-se a medida do limiar RGB (*Red, Green, Blue*) para obter a porcentagem das cores vermelha e verde em cada imagem.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Experimento 1

No experimento 1, foram utilizados os corantes DCF, iodeto de propídio e o MitoTracker Orange CMTMRos ($\lambda = 551/576$ nm). O corante H2DCFDA (DCF, $\lambda = 485-530$ nm) emite fluorescência que indica a intensidade de emissão de espécies reativas de oxigênio e detecção de processo oxidativo em células fagocíticas. O corante iodeto de propídio ($\lambda = 536-$

620 nm) emite a fluorescência adquirida por células degeneradas. O MitoTracker é um corante fluorescente que marca as mitocôndrias dentro das células vivas utilizando o potencial da membrana mitocondrial. As imagens foram realizadas por meio do Microscópio de Fluorescência Leica DMI 6000B. O comprimento de onda para cada corante foi previamente programado e as secções realizadas em intervalos de 8 micrômetros com média de 8 a 12 secções em Z-Stack. Após a média dos pixels das imagens obtidas pelo Microscópio Confocal ZEISS - LSM510 Meta, cada fragmento foi analisado em cinco pontos diferentes e em cada ponto foram avaliadas as três sondas. Dessa forma, os números em pixels foram obtidos. Além disso, o background da lâmina também foi avaliado. Os dados numéricos da intensidade de fluorescência foram utilizados nas análises estatísticas.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Experimento 1

Os fragmentos ovarianos foram fixados em 2% de glutaraldeído mais 2% de formaldeído (EM Sciences) em PBS 0,1 M por 2 horas a 4°C. Os espécimes foram pós-fixados em 1% OsO₄ (EM Sciences) em PBS 0,1 M. A seguir, os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol, infiltrados com EMBED-812 (EM Sciences) sob vácuo. Posteriormente, os materiais foram incluídos em cápsula BEEM com resina pura na temperatura de 60°C por 72 horas. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo Leica utilizando navalhas de diamante (Diatome). Primeiramente, foram obtidos cortes semifinos (0,5 µm) que foram corados com azul de toluidina e avaliados e por microscopia óptica. Dos blocos de interesse, foram obtidos cortes finos (60 nm) que foram colocados em grades de cobre, contrastados com 1% acetato de uranila e 2% de citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e observados em microscópio de transmissão JEOL 100CX (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). As

mitocôndrias foram medidas com o auxílio do software Fiji. Com a ferramenta *Freehand selections*, as mitocôndrias sofreram circundadas para obter os dados numéricos da área total da mitocôndria. Além disso, com os dados das mitocôndrias pode-se estabelecer a quantidade de mitocôndria por área. Todas as imagens foram feitas no mesmo padrão e todas as análises foram realizadas pela mesma pessoa.

RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO (OROBOROS)

Experimento 2

A quantificação do consumo de oxigênio foi realizada utilizando respirometria de alta resolução (*Oroboros Instruments-oxygraph-2k*). O tecido de ovários incubados em meio de cultivo foi previamente fatiado (1 cm^2) e posteriormente adicionados 3 fatias em cada cuba de 2 mL. A análise do consumo de oxigênio pelos ovários foi realizada no meio de cultivo dos tecidos, na temperatura de 25°C com agitação constante de 800 rpm. Após a adição do tecido e estabilização do fluxo de oxigênio, foi adicionado sequencialmente o inibidor oligomicina da ATP sintase ($12,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$), o desacoplador CCCP (carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; $3,5 \text{ } \mu\text{M}$) e o inibidor da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial NaCN (cianeto de sódio; 1 mM). O estado de consumo de oxigênio *routine* foi estabelecido na presença do tecido e do meio de respiração, o estado de consumo de oxigênio *leak* foi estabelecido na presença de oligomicina e o estado de consumo de oxigênio *ETS* (*eléctron transport chain*) foi estabelecido na presença de CCCP. Todos os valores considerados foram realizados com a subtração do consumo de oxigênio residual não mitocondrial (na presença de cianeto de sódio).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS. Para as análises de microscopia confocal, Picrosirius Red e microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas as análises de variâncias onde foram comparados os tempos em cada grupo e o tempo entre os grupos. E as análises da histologia foram realizados teste exato de Fisher e qui-quadrado. Os dados foram apresentados na forma de média (\pm erro padrão da média ou \pm desvio padrão) e porcentagem e os resultados considerados significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

AValiação Histológica

Um total de 1.703 folículos pré-antrais foram avaliados antes e após o cultivo *in vitro*. Em geral, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) na quantidade de folículos não ativados (primordiais) normais avaliados em D1 e D7 tanto dentro do próprio grupo, como também, entre os grupos (CF, LM, FA e ALG) (Tabela 1 e Figura 6). Ao avaliar os folículos ativados com a morfologia normal, observou-se que apenas o grupo LM foi semelhante ($P > 0,05$) ao CF em D1. O grupo LM apresentou maior ($P < 0,05$) quantidade de folículos ativados com a morfologia normal em D1 e em D7 quando comparado aos grupos FA e ALG (Tabela 1). Porém, todos os grupos (LM, FA e ALG) apresentaram diminuição ($P < 0,05$) da ativação em D7. Com relação aos folículos degenerados (anormais), todos os grupos apresentaram aumento ($P < 0,05$) de folículos degenerados em D1 e D7 em comparação ao CF. Somente o grupo LM apresentou uma porcentagem semelhante ($P > 0,05$) ao CF em D1 (Tabela 1). Todos os grupos apresentaram aumento ($P < 0,05$) de degeneração folicular de D1 para D7. O grupo LM apresentou as menores ($P < 0,05$) taxas de degeneração folicular quando comparado com os grupos FA e ALG, tanto em D1 quanto em D7. O ALG apresentou as menores ($P < 0,05$) taxas de ativação e as maiores ($P < 0,05$) taxas de degeneração.

Tabela 1. Porcentagens de folículos primordiais, ativados com a morfologia normal e degenerados em tecidos ovarianos cultivados em sistemas tridimensionais.

	Primordiais (%)			Ativados (%)			Degenerados (%)		
	D0	D1	D7	D0	D1	D7	D0	D1	D7
CF	9,2			72,4			18,4		
LM		9,0 ^{Aa}	2,6 ^{Aa}		70,6 ^{Aa}	48,1 ^{*Ba}		20,4 ^{Aa}	49,2 ^{*Ba}
FA		9,0 ^{Aa}	4,8 ^{Aa}		50,6 ^{*Ab}	29,6 ^{*Bb}		40,4 ^{*Ab}	65,6 ^{*Bb}
ALG		4,0 ^{Aa}	2,6 ^{Aa}		37,5 ^{*Ac}	7,7 ^{*Bc}		58,5 ^{*Ac}	89,7 ^{*Bc}

Legenda: CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. * Difere do controle fresco ($P < 0,05$). *Letras maiúsculas:* comparação dos grupos (CF, LM, FA ou ALG) entre os dias D1 e D7. *Letras minúsculas:* comparação entre os grupos de cultivo 3D (CF, LM, FA e ALG) no mesmo dia (D1 ou D7). Letras diferentes se referem ao $P < 0,05$.

Ao avaliar os folículos de transição em D1 entre os grupos, observou-se uma menor ($P < 0,05$) taxa de folículos normais no grupo ALG quando comparado ao CF e ao LM (Figura 5). Já o grupo FA, apresentou diminuição ($P < 0,05$) de folículos normais quando comparado ao grupo LM. Em D7, todos os grupos apresentaram menores ($P < 0,05$) taxas folículos normais de transição com relação ao CF. O LM apresentou uma quantidade maior ($P < 0,05$) de folículos normais de transição quando comparado ao ALG e foi semelhante ($P > 0,05$) ao FA. Em geral, ao analisar os folículos de transição entre D1 e D7 dentro dos grupos, observou-se que o LM e o ALG tiveram uma diminuição ($P < 0,05$) de folículos normais em D7.

Ao avaliar os folículos primários normais em D1, apenas o grupo LM apresentou semelhança ($P > 0,05$) ao CF, os demais grupos tiveram uma diminuição ($P < 0,05$) no número de folículos primários viáveis quando comparados ao CF e ao LM (Figura 5). Em D7, todos os grupos apresentaram quantidades menores ($P < 0,05$) de folículos primários normais com relação ao CF. O LM teve uma quantidade maior ($P < 0,05$) de folículos primários normais quando comparado ao FA e ALG. Ao analisar os folículos primários entre os dias D1 e D7 nos grupos, constatou-se que todos os grupos tiveram uma diminuição ($P < 0,05$) de folículos primários normais em D7.

Ao comparar as porcentagens de folículos secundários normais dos grupos em D1, o LM apresentou semelhança ($P > 0,05$) ao CF (Figura 5). Os grupos FA e ALG apresentaram quantidades menores ($P < 0,05$) de folículos secundários normais quando comparados ao CF. O ALG também teve menor quantidade de folículos secundários normais quando comparado ao FA. Em D7, apenas o grupo FA apresentou diminuição da quantidade de folículos secundários normais em comparação ao CF e ao LM. Ao avaliar a quantidade de folículos secundários normais entre D1 e D7 nos grupos, observou-se uma diminuição ($P < 0,05$) em D7 no grupo FA.

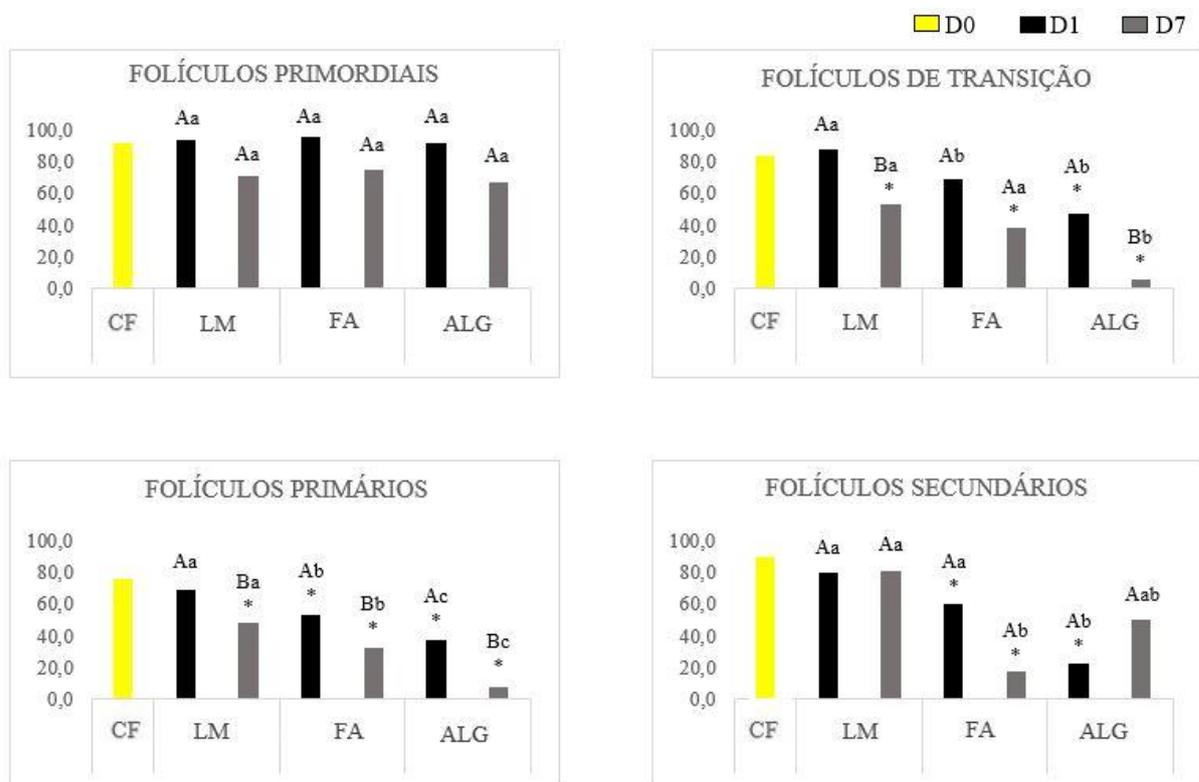


Figura 6. Porcentagem de folículos pré-antrais bovinos morfologicamente normais em tecidos ovarianos fresco (não cultivado) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias. *Legenda:* CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. * Difere do controle fresco ($P < 0,05$). *Letras maiúsculas:* comparação dos grupos (CF, LM, FA ou ALG) entre os dias D1 e D7. *Letras minúsculas:* comparação entre os grupos de cultivo 3D (CF, LM, FA e ALG) no mesmo dia (D1 ou D7). Letras diferentes se referem ao $P < 0,05$.

PICROSIRIUS RED

Em D1, apenas o grupo LM apresentou semelhanças ($P > 0,05$) nas porcentagens de colágenos tipo I (Figura 7, Tabela 2) e tipo III (Tabela 3) com relação ao CF. O grupo FA apresentou aumento ($P < 0,05$) dos colágenos tipo I e tipo III com relação ao CF. O grupo ALG teve um aumento ($P < 0,05$) do colágeno tipo I e diminuição do colágeno tipo III com relação ao CF. Ao comparar as taxas dos colágenos entre os grupos em D1, observou-se que a FA apresentou as maiores ($P < 0,05$) porcentagens dos dois tipos de colágenos com relação aos demais grupos.

Em D7, os grupos LM e FA apresentaram menores ($P < 0,05$) porcentagens de colágenos dos tipos I e III e o ALG apresentou maiores ($P < 0,05$) porcentagens dos colágenos em comparação ao CF. Os grupos LM e FA tiveram menores porcentagens ($P < 0,05$) de colágenos tipo I e III quando comparados ao CF. Ao comparar as taxas dos colágenos entre os grupos em D7, observou-se que a ALG apresentou as maiores ($P < 0,05$) porcentagens dos dois tipos de colágenos ($P < 0,05$) com relação aos demais grupos.

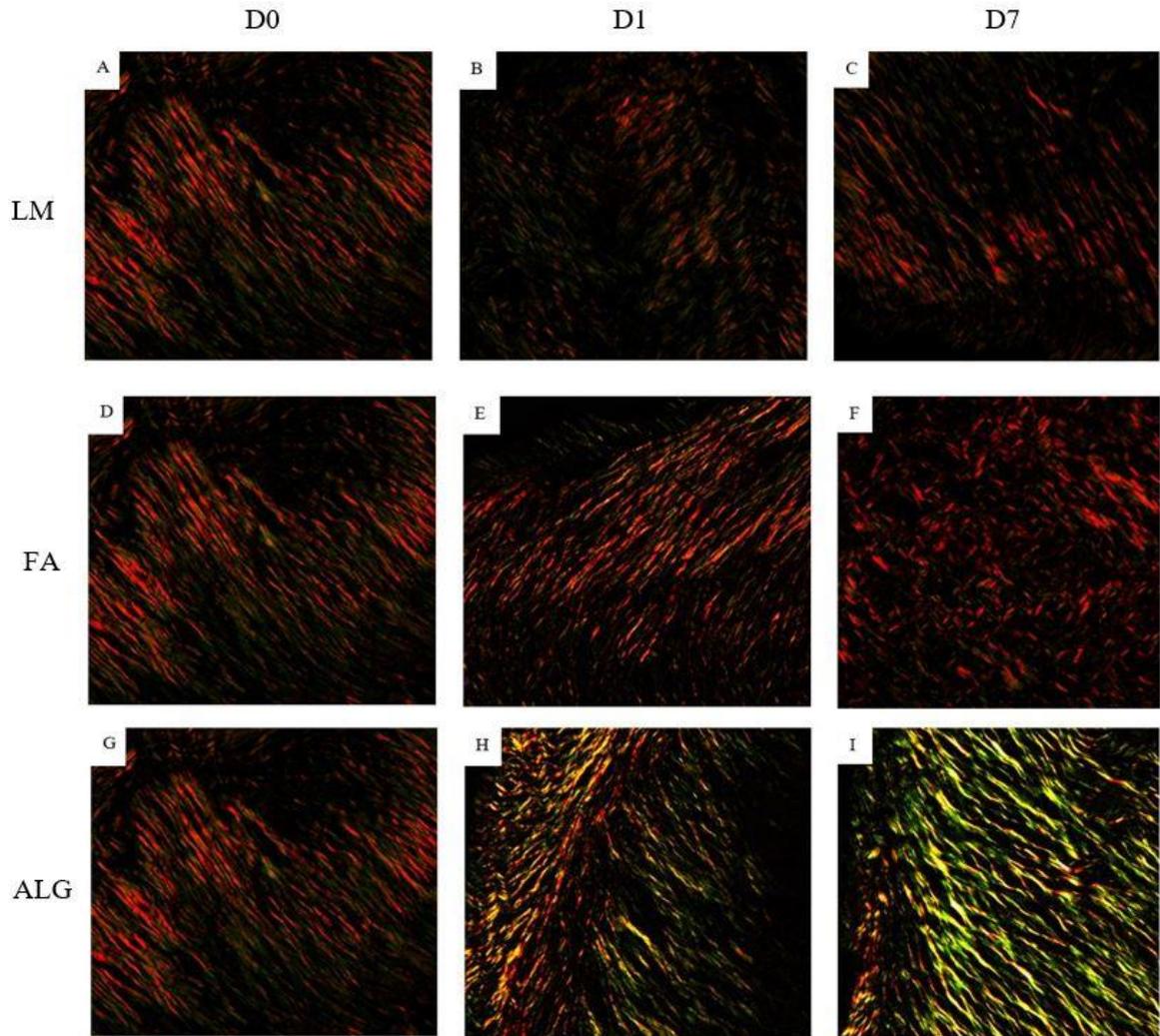


Figura 7. Figuras da coloração de Picrosirius Red obtidas a partir de microscopia de luz polarizada de tecidos ovarianos fresco, controle fresco (A,D,G) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 (B,E,H) ou 7 dias (C,F,I). Cultivos tridimensionais das matrizes LM (B,C), FA (E,F) e ALG (H,I). *Legenda:* CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. D0: fragmentos não cultivados. D1: 24 horas de cultivo. D7: sete dias de cultivo. As figuras permitem fazer a análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo após serem observadas sob luz polarizada, pela diferença na interferência de cores, na intensidade e na birrefringência dos tecidos corados. Essa coloração permite a diferenciação principalmente das fibras de colágenos tipo I e tipo III

Tabela 2. Média \pm desvio padrão de colágeno tipo I em tecidos ovarianos fresco (não cultivado) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
CF	9,89 \pm 12,57		
LM		11,91 \pm 14,82 ^{Aa}	7,24 \pm 7,95 ^{*Ba}
FA		26,18 \pm 17,96 ^{*Ab}	4,72 \pm 10,80 ^{*Ba}
ALG		20,73 \pm 13,33 ^{*Ac}	28,1 \pm 14,30 ^{*Bb}

Legenda: Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas (dias: D1 e D7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas (grupos: LM, FA e ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato.

Tabela 3. Média \pm desvio padrão de colágeno tipo III em tecidos ovarianos fresco (não cultivado) ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
CF	5,25 \pm 9,79		
LM		9,91 \pm 15,27 ^{Aa}	3,07 \pm 3,92 ^{*Ba}
FA		14,18 \pm 11,89 ^{*Ab}	2,68 \pm 4,16 ^{*Ba}
ALG		2,68 \pm 9,34 ^{*Aac}	17,97 \pm 10,52 ^{*Bb}

Legenda: Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas (dias: D1 e D7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas (grupos: LM, FA e ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato.

CONFOCAL: EROS, DEGENERAÇÃO E ATIVIDADE MITOCONDRIAL

IODETO DE PROPÍDIO

Em geral, os grupos LM e FA apresentaram as maiores ($P < 0,05$) taxas de viabilidade tecidual (Figura 8, Tabela 4). Ao comparar as taxas de degeneração dos grupos LM, FA e o ALG em relação ao CF, observou-se menores ($P < 0,05$) taxas de degeneração tanto em D1 quanto em D7 em todos os grupos de cultivos, com exceção do LM que apresentou semelhança ($P > 0,05$) ao CF em D7. Em D1, o ALG apresentou a menor ($P < 0,05$) taxa de degeneração e em D7 a maior ($P < 0,05$) taxa quando comparado aos demais grupos. Os grupos LM e ALG apresentaram um aumento ($P < 0,05$) das taxas de degeneração do D1 para o D7; enquanto o grupo FA apresentou uma diminuição ($P < 0,05$) desta taxa de D1 para D7.

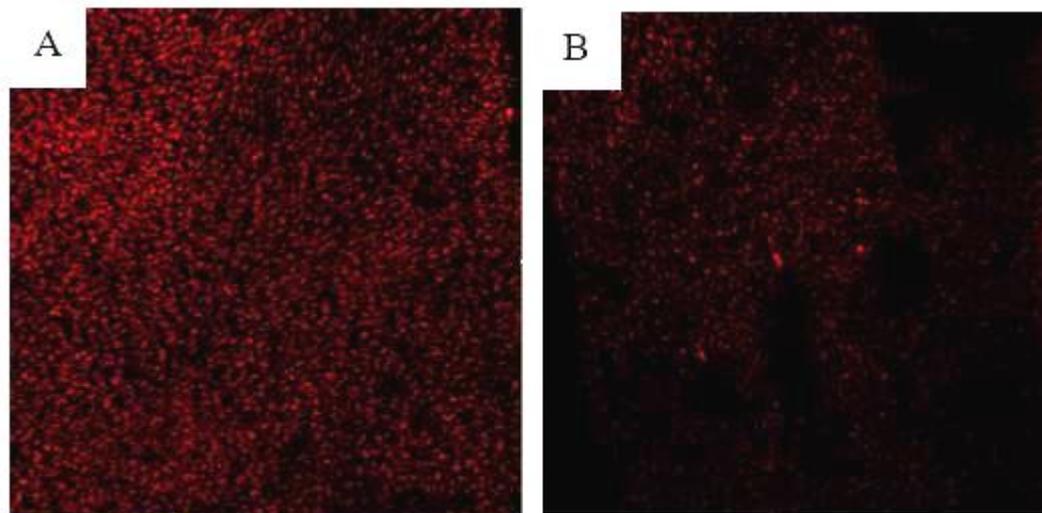


Figura 8. Figuras da emissão de fluorescência do iodeto de propídio obtidas a partir de microscopia confocal de tecidos ovarianos. **A.** Alta taxa de emissão de fluorescência do iodeto de propídio no tecido ovariano bovino. **B.** Baixa taxa de emissão de fluorescência do iodeto de propídio no tecido ovariano bovino.

Tabela 4. Média \pm desvio padrão de fluorescência do iodeto de propídio em tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
CF	189,97 \pm 42,40		
LM		113,35 \pm 56,88 ^{*Aa}	156,60 \pm 49,14 ^{Ba}
FA		152,69 \pm 32,38 ^{*Ab}	77,36 \pm 54,55 ^{*Ba}
ALG		25,16 \pm 7,23 ^{*Aa}	137,48 \pm 54,63 ^{*Bb}

Legenda: Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas (dias: D1 e D7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas (grupos: LM, FA e ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato.

DCF

Em D1 e D7, todos os grupos tiveram taxas de EROS semelhantes ($P > 0,05$) ao CF (Figura 9, Tabela 5). Após avaliar as médias de EROS em cada grupo separadamente com relação aos dias D1 e D7, observou-se que apenas o ALG teve diminuição ($P < 0,05$) nas taxas de EROS em D7. Ao comparar os grupos, observou-se que o ALG teve menores ($P < 0,05$) taxas de EROS em D1 e D7 quando comparado ao LM. Os demais grupos tiveram taxas semelhantes ($P > 0,05$).

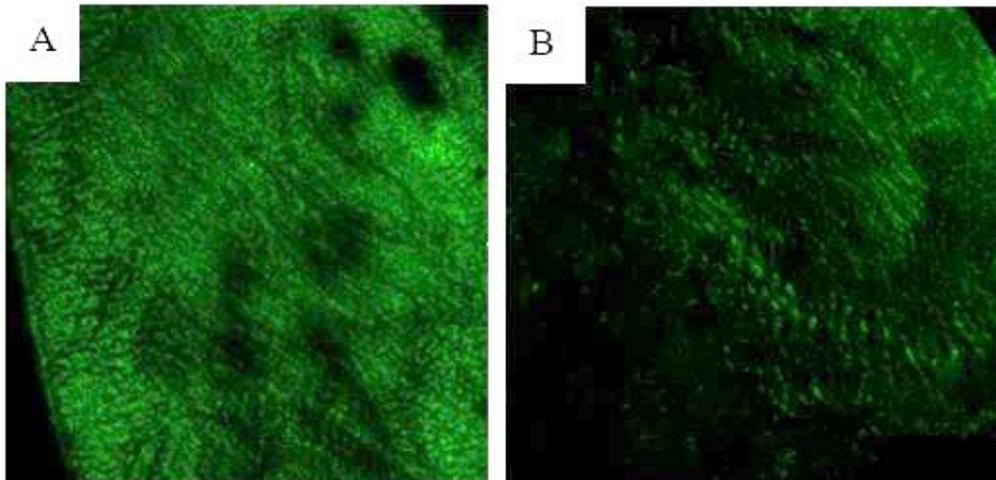


Figura 9. Figuras da emissão de fluorescência do DCF obtidas a partir de microscopia confocal de tecidos ovarianos. **A.** Alta taxa de emissão de fluorescência do DCF no tecido ovariano bovinos. **B.** Baixa taxa de emissão de fluorescência do DCF no tecido ovariano bovino.

Tabela 5. Média \pm desvio padrão de fluorescência do DCF em tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
CF	27,85 \pm 13,67		
LM		35,29 \pm 10,21 ^{Aa}	32,81 \pm 18,39 ^{Aa}
FA		23,29 \pm 9,74 ^{Aab}	18,75 \pm 9,91 ^{Aab}
ALG		30,79 \pm 5,51 ^{Ab}	24,20 \pm 17,73 ^{Ab}

Legenda: Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas (dias: D1 e D7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas (grupos: LM, FA e ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato.

MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL (MMP - MITOTRACKER)

Em D1, os grupos LM e FA tiveram um aumento ($P < 0,05$) da taxa de atividade mitocondrial quando comparados ao CF (Figura 10, Tabela 6). Em D7, apenas o grupo ALG teve menor ($P < 0,05$) taxa de atividade mitocondrial quando comparado ao CF. Ao analisar as taxas de atividade mitocondrial em cada grupo separadamente com relação aos dias D1 e D7, constatou-se que a LM apresentou diminuição ($P < 0,05$) das taxas em D7. O FA teve um aumento ($P > 0,05$) na taxa de atividade mitocondrial em D7. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os dias no grupo ALG, porém, apresentou menor ($P < 0,05$) taxa em D7 quando comparado aos demais grupos.

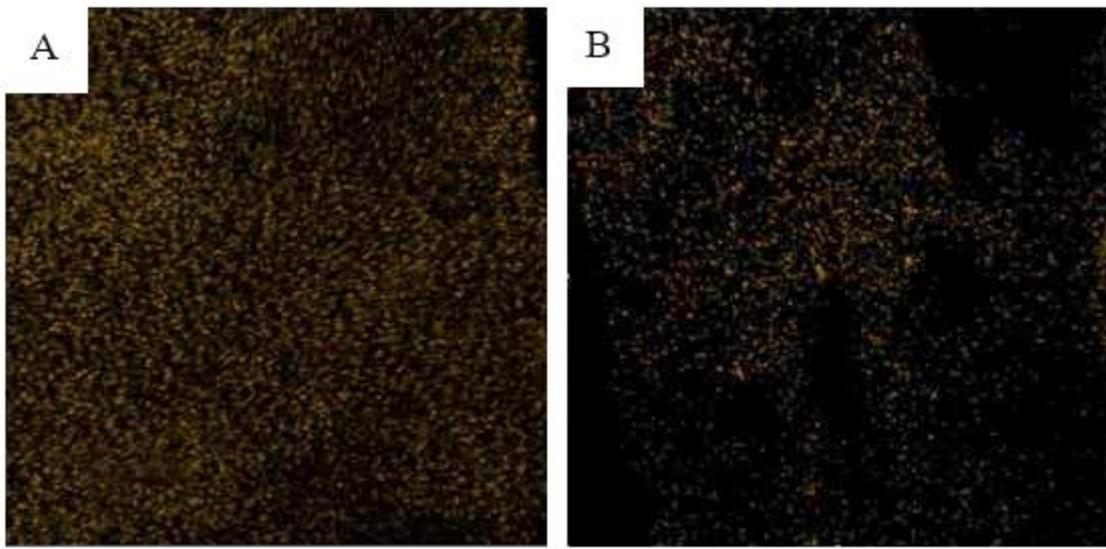


Figura 9. Figuras da emissão de fluorescência do MitoTracker obtidas a partir de microscopia confocal de tecidos ovarianos. **A.** Alta taxa de emissão de fluorescência do DCF no tecido ovariano bovinos. **B.** Baixa taxa de emissão de fluorescência do DCF no tecido ovariano bovino.

Tabela 6. Média \pm desvio padrão de fluorescência do *MitoTracker* em tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
CF	47,21 \pm 23,31		
LM		95,37 \pm 41,34 ^{*Aa}	29,49 \pm 15,43 ^{Ba}
FA		74,22 \pm 32,29 ^{*Aa}	84,67 \pm 32,99 ^{Ba}
ALG		75,01 \pm 44,24 ^{Aa}	38,73 \pm 17,98 ^{*Ab}

Legenda: Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas (dias: D1 e D7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas (grupos: LM, FA e ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato.

OROBOROS

Ao analisar a respiração basal (Routine, Figura 11), observou-se que os grupos apresentaram redução ($P < 0,05$) no consumo basal de oxigênio durante os sete dias de cultivo em relação ao tempo 1 (D1). Não houve diferença estatística entre os grupos.

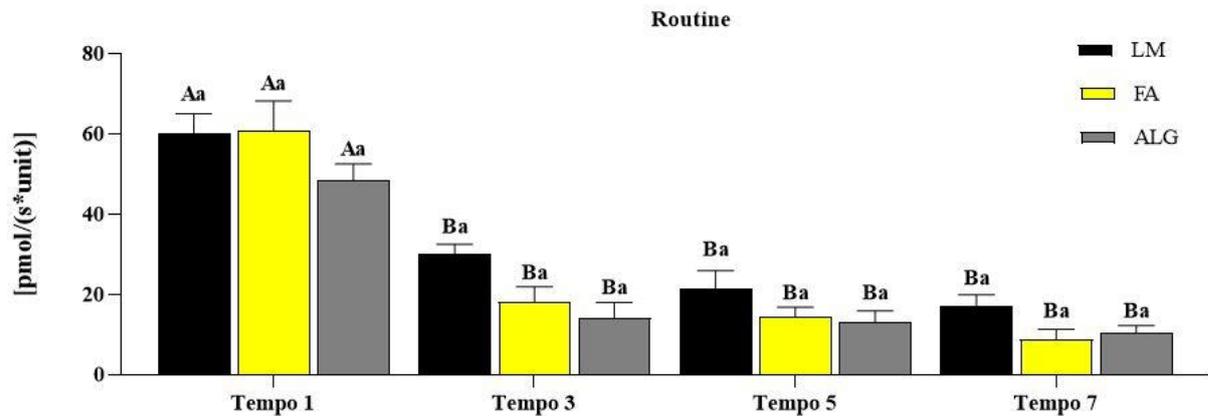


Figura 11. Média de Routine de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 ou 7 dias. *Legenda:* Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (T1, T3, T5, T7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os sistemas em um mesmo tempo (LM, FA, ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Todos os resultados foram expressos como taxas médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/unidade de fragmentos ovarianos.

Ao avaliar o consumo de O₂ devido à oxidação do succinato exógeno, ou seja, a respiração não relacionada à fosforilação (LEAK, Figura 12), observamos que o consumo máximo de O₂ sob estímulo foi maior ($P < 0,05$) no tempo 1 (D1) e, a partir do tempo 3 (D3) ocorreu uma diminuição ($P < 0,05$) do consumo máximo em todos os grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos.

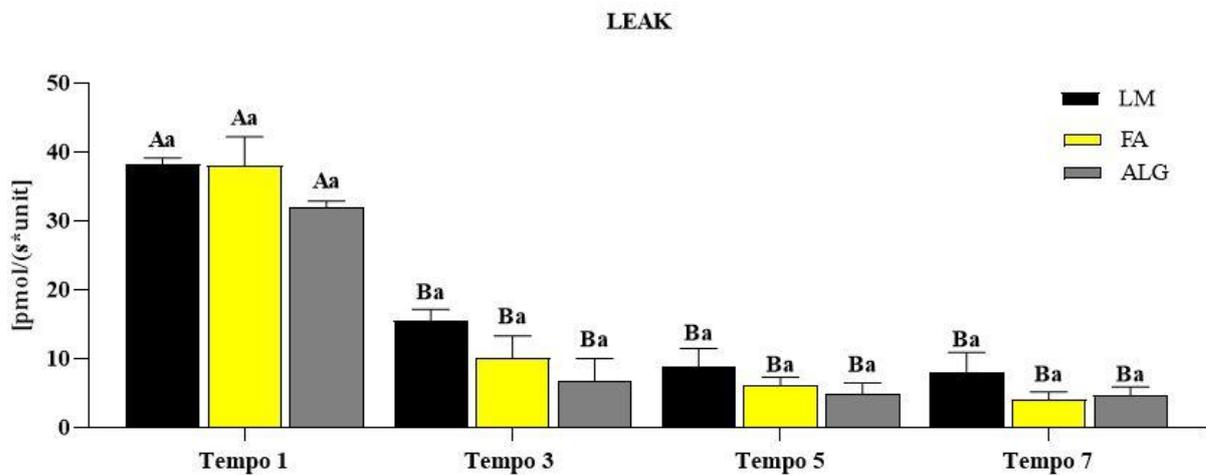


Figura 12. Média de LEAK de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 ou 7 dias. *Legenda:* Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (T1, T3, T5, T7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os sistemas em um mesmo tempo (LM, FA, ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Todos os resultados foram expressos como taxas médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/unidade de fragmentos ovarianos.

Ao analisar o consumo máximo de O₂ (ETS, Figura 13) obtido pelo desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial, pode-se observar que, em geral, todos os grupos apresentaram diminuição do consumo de O₂ com relação ao tempo 1 (D1) dentro de cada grupo. Embora o consumo de O₂ por ETS não tenha sido significativamente diferente entre os grupos, há uma tendência do LM manter o consumo de O₂ mais constante durante os sete dias de cultivo.

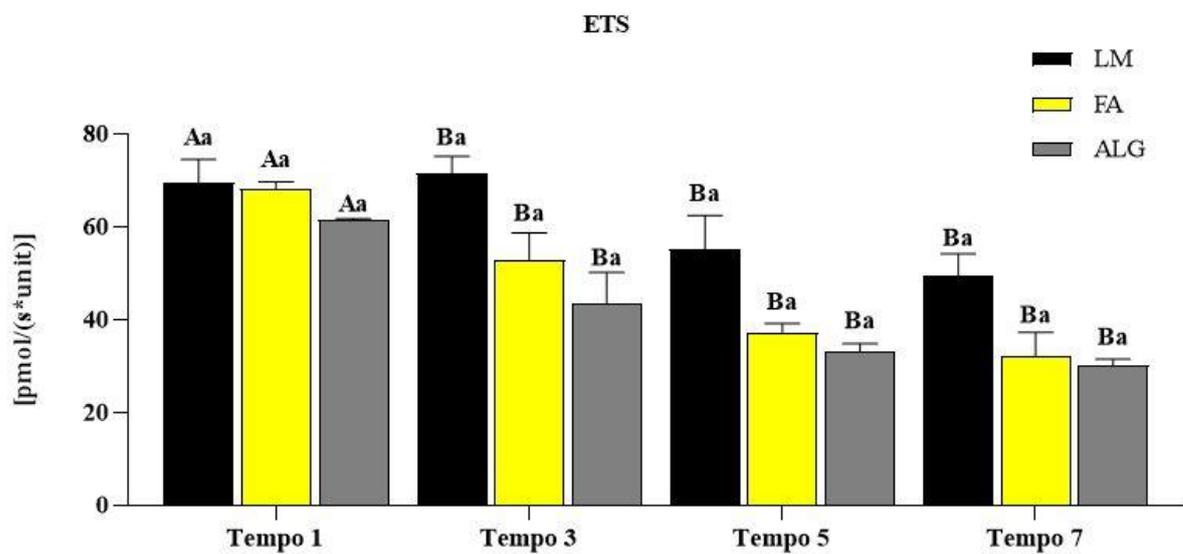


Figura 13. Média de ETS de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 e 7 dias. *Legenda:* Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (T1, T3, T5, T7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os sistemas em um mesmo tempo (LM, FA, ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Todos os resultados foram expressos como taxas médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/unidade de fragmentos ovarianos.

Após a análise da razão LEAK/ETS (Figura 14) que avalia a proporção do consumo máximo de O₂ que não está relacionada com a fosforilação, observou-se que todos os grupos tiveram diminuição ($P < 0,05$) do consumo máximo de O₂ quando comparados ao tempo 1 (D1). Desta forma, há uma diminuição da respiração não relacionada a fosforilação.

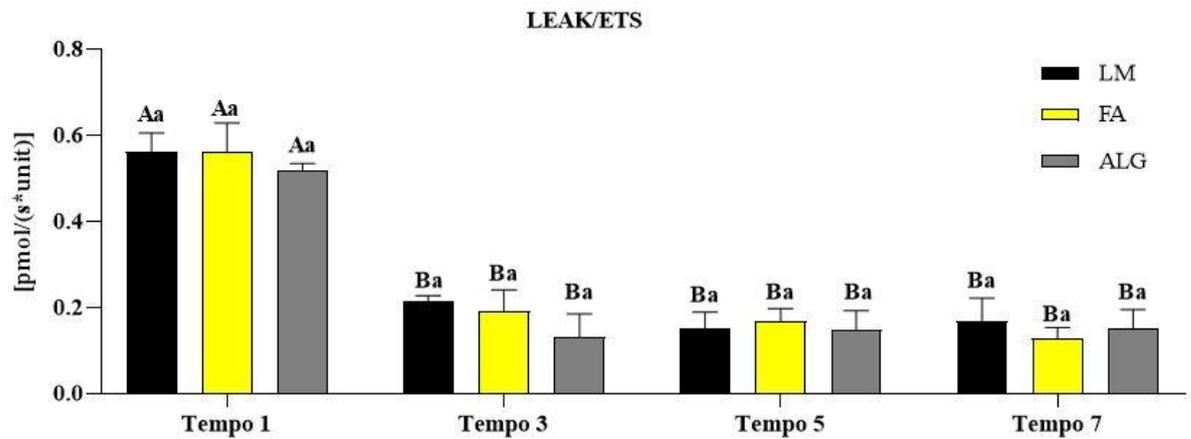


Figura 14. Média da razão LEAK/ETS de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1, 3, 5 e 7 dias. *Legenda:* Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (T1, T3, T5, T7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os sistemas em um mesmo tempo (LM, FA, ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Todos os resultados foram expressos como taxas médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/unidade de fragmentos ovarianos.

Não há diferença estatística na proporção da respiração relacionada à fosforilação (Figura 15) entre os grupos e os dias de cultivo, mostrando que todos os grupos mantiveram o consumo de O₂ relacionado à fosforilação constante durante o cultivo *in vitro*.

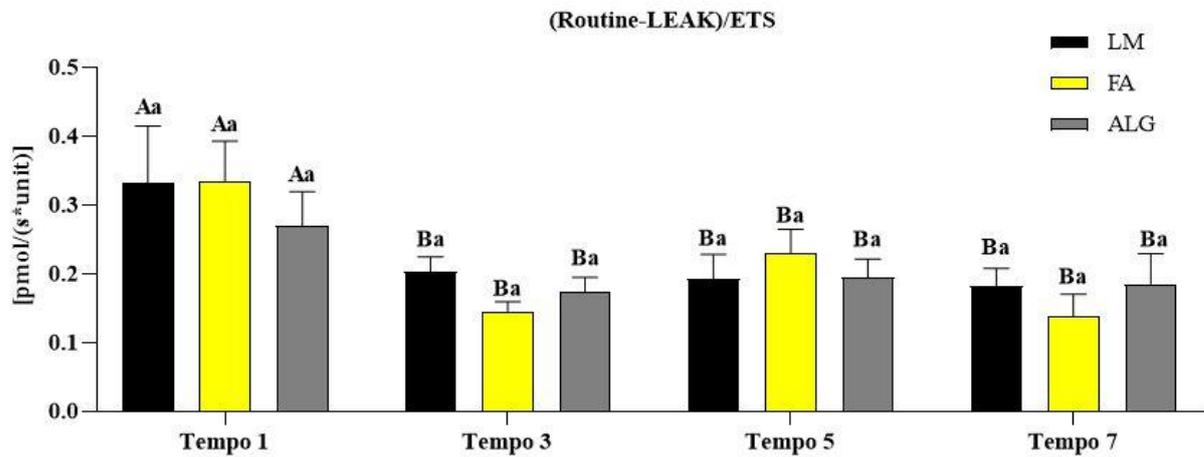


Figura 15. Média da razão Routine-LEAK/ETS de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante durante 1, 3, 5 ou 7 dias. *Legenda:* Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo (T1, T3, T5, T7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre os sistemas em um mesmo tempo (LM, FA, ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Todos os resultados foram expressos como taxas médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/unidade de fragmentos ovarianos.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Ao analisar a área percentual das mitocôndrias pela área total de tecidos ovarianos fresco ou cultivados (Tabela 7), observou-se que todos os grupos apresentaram semelhanças ($P > 0,05$) tanto em D1 quanto em D7 quando comparados ao CF, exceto o grupo ALG que foi teve menor área no D7 em relação ao fresco, LM e FA. Na comparação dos diferentes tempos no grupo ALG foi verificada redução ($P < 0,05$) na média da área de mitocôndrias, evidenciando perda destas organelas ao longo do cultivo somente neste grupo.

Tabela 7. Proporção da área de mitocôndrias pela área total do tecido ovariano (%), fresco ou cultivados, em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
Controle Fresco	2,35 ± 0,91		
Levitação Magnética		4,55 ± 4,07 ^{Aa}	4,36 ± 1,96 ^{Aa}
Fibrina-Alginato		3,69 ± 1,59 ^{Aa}	5,97 ± 3,04 ^{Aa}
Alginato		3,71 ± 1,85 ^{Aa}	1,92 ± 0,95 ^{*Bb}

Legenda: Valores representados em média ± desvio padrão. Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas; Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas. *Difere do controle fresco ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Área em μm^2 .

Ao avaliar a área média das mitocôndrias de tecidos ovarianos (Tabela 8), observou-se que em D1 todos os grupos tiveram um aumento ($P < 0,05$) da área média das mitocôndrias com relação ao CF. Em D7, somente a LM teve a média das mitocôndrias maior ($P < 0,05$) que o CF e todos os grupos tiveram diminuição das médias das áreas após 7 dias de cultivo ($P < 0,05$).

Tabela 8. Área (μm^2) média das mitocôndrias de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
Controle Fresco	0,12± 0,05		
Levitação Magnética		0,40 ± 0,19* ^{Aa}	0,20 ± 0,11* ^{Ba}
Fibrina-Alginato		0,22 ± 0,09* ^{Ab}	0,11 ± 0,09 ^{Bb}
Alginato		0,35 ± 0,14* ^{Aa}	0,12 ± 0,03 ^{Bc}

Legenda: Valores representados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas; Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas. *Difere do controle fresco ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato. Área em μm^2 .

Em geral, o grupo FA apresentou o maior número de mitocôndrias, tanto em D1 quanto em D7 ($P < 0,05$, Tabela 9) com relação aos demais grupos. Em D1, os grupos LM e ALG apresentaram menos ($P < 0,05$) mitocôndrias do que o CF. Todos os grupos de cultivo apresentaram elevação no número de mitocôndrias no D7 em relação ao D1.

Tabela 9. Número absoluto de mitocôndrias de tecidos ovarianos fresco ou cultivados em sistemas tridimensionais durante 1 ou 7 dias.

	D0	D1	D7
CF	13		
LM		7* ^{Aa}	16 ^{Ba}
FA		10 ^{Ab}	36* ^{Bb}
ALG		6* ^{Aa}	11 ^{Bc}

Legenda: Valores representados em média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre colunas (dias: D1 e D7); Letras minúsculas se referem à diferença ($P < 0,05$) entre linhas (grupos: CF, LM, FA e ALG). *Difere do CF ($P < 0,05$). CF: controle fresco. LM: matriz de levitação magnética. FA: matriz de fibrina-alginato. ALG: matriz de alginato.

Ao analisar a histomorfologia dos fragmentos ovarianos por TEM foi possível identificar que em algumas amostras havia perda da integridade estromal, caracterizada por afrouxamento do tecido conectivo do estroma associado e perda das estruturas das células e mitocôndrias. A proporção dos cortes analisados em que se identificava dano estromal foi maior nos grupos FA (100% dos cortes em D1 e 67% em D7) e ALG (33% dos cortes em D1 e 67% em D7), enquanto no CF havia 33% de amostras com dano estromal e mitocondrial e no grupo LM não foi observado dano em D1 e apenas 33% dos fragmentos apresentava dano em D7 (Figuras 16).

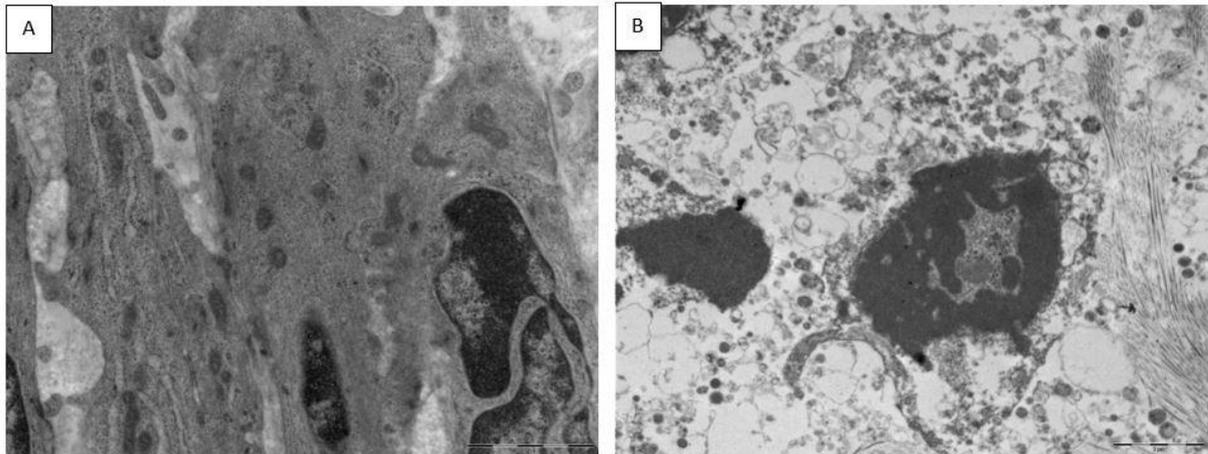


Figura 16. Micrografias eletrônicas de células da granulosas de folículos pré-antrais bovino. **A.** Tecido ovariano não cultivado (CF) com mitocôndrias e estroma preservados. **B.** Tecido ovariano cultivado *in vitro* por 7 dias em sistema tridimensional (matriz de ALG) apresentando danos nas mitocôndrias e estroma. Barras (A; B): 2 μm .

6 DISCUSSÃO

A literatura sugere uma superioridade dos cultivos tridimensionais em relação ao cultivo 2D. Habitualmente os cultivos de folículos pré-antrais isolados e fragmentos de tecido ovariano são feitos em matrizes de gel, de diferentes composições e concentrações (ARAÚJO *et al.*, 2014; LARONDA *et al.*, 2014; HIGUCHI *et al.*, 2015), ou com uso de “scaffolds” para inclusão de folículos isolados, sistema este batizado de “ovário artificial”(KEDEM *et al.*, 2011; KHUNMANEE; PARK, 2022).

Sabe-se que a cultura de tecido ovariano como tecnologia para o desenvolvimento folicular *in vitro* não é tão eficaz pois, o desenvolvimento do folículo primordial no cultivo pode ocorrer, porém, o desenvolvimento até o estágio antral é infrequente (DESAI *et al.*, 2010; HIGUCHI *et al.*, 2015). A sinalização autócrina e parácrina entre o oócito e as células foliculares, juntamente com o suporte vascular fornecido pela estrutura 3D do tecido ovariano, são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento adequados dos oócitos no ovário (LUCIANO *et al.*, 2011). Portanto, é muito importante manter a estrutura 3D do tecido ovariano durante o cultivo *in vitro*.

Uma vez verificada a superioridade do sistema de LM (3D) em relação ao sistema 2D, convencional, era necessário a comparação com outros sistemas tridimensionais amplamente utilizados na literatura, tais como a matriz de alginato (ALG) e a de fibrina-alginato (FA). Estas matrizes podem variar em termos de rigidez de acordo com a concentração utilizada, o que interfere de maneira significativa no resultado dos cultivos e na capacidade de crescimento dos folículos. Esta dificuldade de se identificar a concentração ideal de ALG e FA, e a dificuldade de manipular o produto na replicação dos experimentos, torna o seu uso complicado e de difícil emprego na prática clínica, uma vez que demanda grande expertise para seu preparo. Sendo assim, realizou-se os cultivos *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos durante sete dias utilizando as matrizes tridimensionais de FA e ALG, além do sistema de cultivo por LM. De

modo geral, ao final do cultivo pôde-se observar que os tecidos cultivados em LM e FA tiveram a viabilidade preservada, sendo superior ao grupo ALG. A degeneração celular como um todo e a comprovação de vitalidade das células e tecidos pôde ser feita de várias maneiras. Neste estudo, a viabilidade tecidual foi avaliada pela quantidade de células apoptóticas (técnica do Yo-Pro), pela perda da integridade da membrana celular (técnica do iodeto de propídio) e também pelas análises morfológicas feitas tanto pela histologia convencional (técnica de HE) quanto pela microscopia eletrônica de transmissão, que permitiram verificar a conservação ou perda da arquitetura e microarquitetura folicular normal, do tecido saudável. Além disso, um aspecto bastante relevante da vitalidade do tecido, se refere à conservação do estroma, que normalmente é negligenciado; neste estudo o emprego do *picrosirius* teve a finalidade de quantificar o colágeno estromal, o que indiretamente determina a maior ou menor degeneração local. Em todas estas análises os sistemas LM e FA de cultivo foram similares entre si e superiores ao ALG.

Os alginatos são derivados de algas marrons e têm sido amplamente estudados como biomateriais devido às suas propriedades de biocompatibilidade e capacidade de formar hidrogéis (GREEN; SHIKANOV, 2016; LARONDA *et al.*, 2014b). Esses hidrogéis de ALG podem ser usados como matrizes para cultivo de células, incluindo fragmentos ovarianos e folículos pré-antrais isolados (XU, J. *et al.*, 2013b). No entanto, é importante mencionar que alguns estudos relataram que o ALG pode atuar como uma barreira ao crescimento folicular e à formação de antro (SILVA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2009). Isso pode ser devido à rigidez da matriz de ALG, à falta de fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento completo dos folículos, a porosidade que não permite a difusão de substratos maiores como albumina e a biodisponibilidade de oxigênio e nutrientes pode ser limitada (PAIS *et al.*, 2021).

Já a fibrina pode formar uma biomatriz com vários componentes da MEC e fatores de crescimento como o fibrinogênio. O fibrinogênio é uma proteína que é polimerizada em fibrina

pela ação da trombina na presença de cálcio. Em comparação, o alginato é um andaime relativamente inerte e que não interage com integrinas de células de mamíferos (SHIKANOV *et al.*, 2009b). Xu e colaboradores, concluíram que a combinação de fibrina com alginato melhora o desenvolvimento de folículos primários de macacas em comparação com o uso de ALG isoladamente, provavelmente pela presença de fibrina que pode fornecer uma matriz mais degradável, permitindo a interação adequada entre as células foliculares e o ambiente circundante (XU *et al.*, 2013).

Nas pesquisas *in vitro*, o sistema de levitação magnética com nanopartículas é utilizado para avaliar a liberação controlada de substâncias terapêuticas, como marcadores para avaliar a toxicidade de compostos, vasoatividade de células musculares (TSENG *et al.*, 2016), modelos de estudos de tumores (BECKER; SOUZA, 2013; JAGANATHAN *et al.*, 2014), modelos de culturas celulares (TSENG *et al.*, 2013; TSENG *et al.*, 2014). Um estudo *in vivo* sobre o tratamento da disfunção erétil de ratos com células-tronco derivadas de tecido adiposo, utilizou o sistema de LM e concluiu que foi possível manter as células-tronco no corpo cavernoso utilizando um ímã e obteve-se bons resultados na terapia (LIN *et al.*, 2016b). No estudo de Antonino e colaboradores, foi concluído que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos com o sistema 3D por LM, propiciou o desenvolvimento *in vitro* dos folículos secundários bovinos com taxas superiores de viabilidade folicular, formação e manutenção do antro além de crescimento regular comparado ao sistema 2D convencional (ANTONINO *et al.*, 2019). Além disso, a LM é um método mais simples de ser executado comparado à manipulação das outras matrizes gel. A ausência de resistência ao redor dos folículos em crescimento, uma vez que o meio de cultivo é líquido e não gel, provavelmente interfere de maneira positiva na capacidade de formação e expansão do antro folicular.

Além disso, Silva e colaboradores, ao utilizar o cultivo tridimensional para folículos pré-antrais caprinos com matriz de alginato, demonstrou que o aumento na concentração da

matriz promove melhores resultados nas taxas de sobrevivência folicular, maior percentagem de desenvolvimento *in vitro*, na taxa de fertilização e na produção de embriões viáveis (SILVA *et al.*, 2015). Xu e colaboradores, também observaram correlação positiva ao relacionar a viabilidade folicular com o aumento da concentração da matriz tridimensional de alginato utilizada para cultivar folículos pré-antrais de primatas (XU *et al.*, 2009).

Independente do sistema de cultivo empregado, sabe-se que logo após a remoção dos ovários de seu sítio de origem, a interrupção do fluxo sanguíneo e consequente comprometimento do aporte de oxigênio para o tecido, leva a um aumento no processo de degeneração celular (WONGSRIKEAO *et al.*, 2005). A redução da oxigenação celular diminui a produção de ATP interna afetando diretamente a permeabilidade das membranas celulares alterando o fluxo de Na^+ para o citoplasma, ativando a Na^+/K^+ ATPase, que altera a distribuição de Ca^{++} fazendo com que a água intracelular se eleve (ALBERTS *et al.*, 2013), podendo resultar em aumento do volume da célula, formação de vacúolo no citoplasma, degeneração e morte celular (BARROS; HERMOSILLA; CASTRO, 2001). Estudo prévio, demonstrou que o cultivo 3D com nanopartículas e hidrogéis de sílica diminuiu a degeneração celular e aumentou a viabilidade de células de tecido neural (LEE *et al.*, 2013).

Além da conservação da viabilidade ou morte celular do estroma e folículos, é fundamental que analisemos a capacidade funcional do tecido em cultivo, o que, no caso do ovário, implica na capacidade de ativação e maturação folicular (evolução dos estágios de desenvolvimento do folículo deste primordial até antral maior), bem como na preservação da capacidade respiratória do tecido, que aqui foi avaliado pela técnica de Oroboros, além da avaliação da produção de EROs. A ativação folicular foi beneficiada pelo cultivo 3D no grupo LM. Entende-se que, assim como houve melhoria nas taxas de viabilidade celular, o cultivo por LM pode ter preservado as principais características morfológicas dos folículos ovarianos que por conseguinte melhoraram a comunicação entre as células circundantes que são responsáveis

pela produção de fatores estimulatórios da ativação folicular. Entretanto, houve também alta taxa de ativação folicular no grupo CF (tecido não cultivado). Acredita-se que a remoção dos folículos de seu ambiente (tecido) ou mesmo agressões diversas sobre este tecido (exposição a agentes gonadotóxicos, isquemia do tecido, entre outras agressões ambientais), podem levar a uma ativação folicular maciça, um fenômeno conhecido como “Burn-out” (RONESS *et al.*, 2013). Este fenômeno, observado já por diferentes autores (TELFER *et al.*, 2008; TELFER; ZELINSKI, 2013; DE ROO *et al.*, 2020), tem sido atribuído à ausência do efeito de substâncias inibitórias da ativação (mantenedoras da quiescência ovariana) sobre estes folículos primordiais e, dentre estas substâncias, o hormônio anti-mulleriano (AMH) parece ser dos mais relevantes. A criopreservação de tecido ovariano é capaz de manter viáveis folículos em fase de desenvolvimento, que são os produtores de AMH, estes degeneram ao longo dos processos de congelamento e de cultivo ou reimplante; isso leva a uma redução importante dos níveis de AMH tecidual e conseqüentemente à perda de seu papel inibitório sobre a ativação (RONESS *et al.*, 2013). A manipulação do tecido durante abate do animal, coleta das amostras e processamento do tecido para cultivo, pode ter causado este mesmo efeito sobre as amostras, o que explicaria a grande proporção de folículos ativados com a morfologia normal já no tecido fresco fixado. Em concordância, há trabalhos que confirmaram a ativação do folículo primordial pela manipulação mecânica das tiras corticais (TELFER *et al.*, 2008; TELFER; ZELINSKI, 2013; DE ROO *et al.*, 2020). De Roo e colaboradores descreveram a evolução detalhada do desenvolvimento folicular e o envolvimento da via Hippo folículo-específica durante 6 dias de cultura de tecidos *in vitro* e os resultados confirmaram uma ativação do folículo primordial impulsionada pela via Hippo devido à manipulação mecânica das tiras corticais (DE ROO *et al.*, 2020).

Experimentos anteriores com ovários inteiros e fragmentos corticais estabeleceram o papel significativo do estroma ovariano no suporte à ativação do folículo primordial e

crescimento inicial (EPPIG, 1996; GROSBOIS *et al.*, 2023; HOVATTA *et al.*, 1997; O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; TELFER *et al.*, 2008). Grosbois e colaboradores afirmaram que a ativação do folículo primordial ocorre concomitantemente com um afrouxamento do córtex ovariano durante o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de mulheres, caracterizado por uma diminuição precoce na densidade de células estromais e uma remodelação dinâmica da MEC ovariana (GROSBOIS *et al.*, 2023). Desta forma, o grupo LM pode ter permitido esse processo de maneira mais eficiente, pois o fragmento não fica aderido a placa de cultivo (como ocorre no sistema 2D) e esse tipo de matriz permite a remodelação dinâmica da MEC (SOUZA *et al.*, 2010). O ambiente físico dos folículos em desenvolvimento parece afetar diretamente a resposta ao estímulo e inibição de fatores de ativação e, portanto, o ambiente de desenvolvimento influencia diretamente sua capacidade de crescimento (MCLAUGHLIN *et al.*, 2014).

Neste sentido, se apenas a manipulação do tecido e a remoção dos fragmentos da estrutura integral do ovário já permite a ativação, o que se observa é que após 24 horas de cultivo (análises de D1) ocorre o pico da apresentação de folículos ativados com a morfologia normal viáveis, variando de 70 a 35% da população folicular, na dependência do sistema de cultivo empregado, sendo 70% nos cultivos LM, 50% nos FA e 37,5% nos ALG. Após 7 dias a proporção de folículos ativados com a morfologia normal decai, mas às custas do aumento da proporção de folículos degenerados. De acordo com Sutton e colaboradores, os cultivos mais extensos do que 7 dias costumam comprometer de maneira muito significativa a qualidade do tecido cultivado (SUTTON *et al.*, 2021). Em nosso estudo foi possível verificar nos grupos LM e FA que o tecido conseguiu manter concentrações de colágeno semelhantes ao tecido fresco, porém o ALG promoveu grande formação de colágeno nas amostras.

Do ponto de vista funcional ao analisarmos a capacidade respiratória do tecido ao longo do cultivo, foi verificado um aumento significativo da atividade mitocondrial (avaliação pelo

potencial de membrana mitocondrial) após 24 horas de cultivo nos grupos LM e FA, sugerindo alta atividade metabólica celular, a qual foi reduzida após 7 dias de cultivo, igualando ao controle fresco; poderíamos especular que após os 7 dias de cultivo houve estabilização do tecido com recuperação de sua atividade metabólica após reparo do estresse inicial do manuseio. Acompanhando a maior atividade mitocondrial houve um consumo basal (em repouso) muito elevado de oxigênio (Oroboros-routine) na avaliação de tempo 1 (24 horas), seguido de redução progressiva deste consumo ao longo do cultivo até o dia 7. Este aumento do consumo de O₂ não foi inicialmente realizado às custas de uma maior quantidade de mitocôndrias no citoplasma das células, uma vez que houve inclusive diminuição destas organelas após 24 horas de cultivo em todos os grupos. Entretanto, após os 7 dias de cultivo todos os sistemas promoveram aumento do número de mitocôndrias, concomitante a uma redução progressiva do consumo basal de O₂. Vale ressaltar que este menor consumo de O₂ não ocorreu devido a perda da capacidade respiratória do mesmo, uma vez que o consumo de O₂ mediante estímulo toxicológico (parâmetro ETS do Oroboros) do tecido estava preservado ao longo dos 7 dias de cultivo, mantendo a capacidade de resposta. De acordo com Pesta e Gnaiger, um certo grau de desacoplamento intrínseco, que está relacionado a um consumo de O₂ para fosforilação oxidativa e pode ocorrer sem que isso necessariamente indique dano tecidual, entretanto, desacoplamento de natureza patológica ou toxicológica são considerados defeitos mitocondriais (PESTA; GNAIGER, 2012). Em situações de hipóxia, a respiração e a produção de ATP ficam restritos, tornando a fosforilação oxidativa mais eficiente do que em situações de boa saturação de oxigênio. Nas condições de hipóxia o consumo de oxigênio não relacionado à fosforilação do ATP fica suprimida objetivando reduzir o gasto energético, isso sugere um papel dos baixos níveis de oxigênio intracelular na prevenção da produção de EROs e na proteção da eficiência bioenergética (GNAIGER; MÉNDEZ; HAND, 2000).

Em um estudo com células endoteliais onde se induziu dano celular por estímulo criogênico para preservação celular seguido de reoxigenação, verificou-se que houve redução de todos os parâmetros respiratórios nas células expostas ao dano em comparação com células não expostas, porém sem aumento de morte celular (avaliado pelo *Trypan blue*). Ao realizar estímulo químico para incremento da atividade respiratória todos os parâmetros foram semelhantes aos de células não expostas: a membrana plasmática manteve-se impermeável ao succinato e a função da membrana mitocondrial interna foi conservada, indicando uma preservação da capacidade respiratória das células, semelhante aos resultados verificados neste estudo. Os autores deste estudo concluíram que a perda da capacidade catalítica para a respiração é um evento precoce em resposta ao dano (no caso, o congelamento) seguido de reoxigenação, eficiente enquanto não ocorre a perda da integridade da membrana celular (STEINLECHNER-MARAN *et al.*, 1997).

Segundo Shiratsuki e colaboradores uma outra adaptação celular que ocorre como mecanismo de proteção contra a hipóxia é a glicosilação em substituição à fosforilação oxidativa; este evento é acompanhado da redução da quantidade e da função das mitocôndrias (SHIRATSUKI *et al.*, 2016). Como mencionado acima, neste estudo houve inicialmente uma redução do número de mitocôndrias, o que está condizente com o dano sofrido pelo tecido durante a manipulação e as primeiras horas de cultivo até a estabilização do mesmo, que parece ocorrer em algum tempo após as 24 horas e antes do dia 7. Inclusive, se observarmos o consumo de O₂ dos tecidos, veremos que o consumo basal começa a ser reduzido já a partir do dia 3 de cultivo, mantendo-se mais baixo após.

Verificamos que das múltiplas análises realizadas neste estudo, os resultados são consistentes e coerentes, indicando superioridade dos sistemas LM e FA sobre o alginato, na manutenção da vitalidade tecidual (folicular e estromal), bem como preservação da função respiratória do tecido cultivado. Vale destacar, entretanto, que o sistema LM foi mais eficiente

na ativação de folículos, com menores índices de folículos degenerados, sendo este o objetivo principal dos cultivos realizados. Um aspecto que necessita ser revisto é o tempo de cultivo, uma vez que já com 24 horas os folículos primordiais haviam sido ativados e a taxa de degenerado não era tão elevada; consideramos que cultivos com menor duração possam alcançar o mesmo objetivo com menor dano. Também em favor do sistema LM, a despeito do custo das partículas, este é um sistema mais fácil de ser reproduzido, uma vez que o manuseio das partículas é simples e de fácil capacitação técnica para treinamento de equipes. Sendo assim, consideramos que dentre os sistemas de cultivo testados, a LM é a opção mais efetiva para a realização do “Step 1” do cultivo multistep, a fim de se obter oócitos maduros a partir de folículos primordiais inclusos.

CONCLUSÃO

O cultivo tridimensional por levitação magnética favorece e preserva a morfologia, a vitalidade e a capacidade respiratória do tecido ovariano durante o cultivo *in vitro*, sendo mais eficiente em termos de ativação folicular do que os demais cultivos.

Parece haver um período de reparo após estresse, marcada por intensa atividade respiratória e metabólica nas primeiras 24 horas de cultivo, com sinais da presença de hipóxia tecidual, a qual parece ser compensada após este período não sendo tão evidente após 24 horas.

A ativação dos folículos primordiais foi maior em D1 do que em D7, sugerindo não haver necessidade de um cultivo tão extenso para a obtenção de folículos ativados com a morfologia normal. Com provável benefício de um cultivo de 3 dias, quando há indícios de estabilização da respiração do tecido nos testes funcionais.

REFERÊNCIAS

ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. **UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saúde**; v. 15, n. 3, 2013.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Essential Cell Biolog.** 4. ed. [S. l.]: W.W. Norton & Company, 2013. DOI 10.1201/9781315815015. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781317806271>.

ANTONINO, D. de C.; SOARES, M. M.; JÚNIOR, J. de M.; DE ALVARENGA, P. B.; MOHALLEM, R. de F. F.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. A.; DE SOUZA, A. G.; BELETTI, M. E.; ALVES, B. G.; JACOMINI, J. O.; GOULART, L. R.; ALVES, K. A. Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 38, n. 3, p. 300–311, mar. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.013>.

ARAÚJO, V R; GASTAL, M. O.; WISCHRAL, A.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1246–53, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.004>.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; WISCHRAL, A.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Long-term in vitro culture of bovine preantral follicles: Effect of base medium and medium replacement methods. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 23–31, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.07.006>.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 78, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>.

BAERWALD, A. R. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. **Anim. Reprod.**, v.6, n.1, p.20-29, Jan./Mar., 2009.

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 130, n. 3, p. 401–409, out. 2001. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00438-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00438-X).

BECKER, J. L.; SOUZA, G. R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 315–327, maio 2013. <https://doi.org/10.1038/nrc3507>.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, dez. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.

BUS, A.; LANGBEEN, A.; MARTIN, B.; LEROY, J. L. M. R.; BOLS, P. E. J. Is the pre-antral ovarian follicle the ‘holy grail’ for female fertility preservation? **Animal Reproduction Science**, v. 207, p. 119–130, 1 ago. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.017>.

CAMPOS, J. R.; ROSA-E-SILVA, A. C. J. de S. Cryopreservation and Fertility: Current and Prospective Possibilities for Female Cancer Patients. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, p. 1–7, 2011. <https://doi.org/10.5402/2011/350813>.

CARDONA Á, J. A.; VARGAS V, M. I.; PERDOMO A, S. C. Estudio clínico e histopatológico del carcinoma de células escamosas de bovinos en el departamento de Córdoba, Colombia. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 54, n. 2, p. 68–77, dez. 2013.

CHEN, H.; XUE, L.; GONG, G.; PAN, J.; WANG, X.; ZHANG, Y.; GUO, J.; QIN, L. Collagen-based materials in reproductive medicine and engineered reproductive tissues. **Journal of Leather Science and Engineering**, v. 4, n. 1, p. 3, dez. 2022. <https://doi.org/10.1186/s42825-021-00075-y>.

CHEN, J.; TODOROV, P.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; MALLMANN, P.; ISACHENKO, V. Construction and cryopreservation of an artificial ovary in cancer patients

as an element of cancer therapy and a promising approach to fertility restoration. **Human Fertility**, v. 25, n. 4, p. 651–661, 8 ago. 2022.

<https://doi.org/10.1080/14647273.2021.1885756>.

CHOI, J. K.; AGARWAL, P.; HE, X. In vitro culture of early secondary preantral follicles in hanging drop of ovarian cell-conditioned medium to obtain MII oocytes from outbred deer mice. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 23–24, p. 2626–37, 2013.

<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0055>.

CHOI, J. K.; AGARWAL, P.; HUANG, H.; ZHAO, S.; HE, X. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue. **Biomaterials**, v. 35, n. 19, p. 5122–5128, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.028>.

CORREIA, H. H. V.; LIMA, L. F.; SOUSA, F. G. C.; FERREIRA, A. C. A.; CADENAS, J.; PAES, V. M.; ALVES, B. G.; SHIKANOV, A.; FIGUEIREDO, J. R. Activation of goat primordial follicles in vitro: Influence of alginate and ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 1, p. 105–109, jan. 2020b. <https://doi.org/10.1111/rda.13582>.

CORREIA, H.H.V.; VIEIRA, L. A.; MASIDE, C.; PAES, V. M.; SILVA, R. F.; ALVES, B. G.; SANTOS, F. W.; APGAR, G. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian transport temperature (4 vs 33 °C) impacts differently the in vitro development of isolated goat preantral and antral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 155, p. 16–23, out. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.09.001>.

CORREIA, H. H. V.; LIMA, L. F.; SOUSA, F. G. C.; FERREIRA, A. C. A.; CADENAS, J.; PAES, V. M.; ALVES, B. G.; SHIKANOV, A.; FIGUEIREDO, J. R. Activation of goat primordial follicles in vitro: Influence of alginate and ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 1, p. 105–109, jan. 2020a. <https://doi.org/10.1111/rda.13582>.

COSTA, F. D. C.; VASCONCELOS, E. M.; SILVA, J. R. V.; BATISTA, A. L. P. S.

Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo in vitro de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 46, n. 1, p. 28–42, 2022. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2022.003>.

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 5, p. 336–44, 2013.

<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0198>.

DE LAMBERT, G.; POIROT, C.; GUÉRIN, F.; BRUGIÈRES, L.; MARTELLI, H. Preservation of future fertility in pediatric patients with cancer. **Journal of Visceral Surgery**, v. 155, p. S41–S46, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2018.04.002>.

DE ROO, C.; LIERMAN, S.; TILLEMANN, K.; DE SUTTER, P. In-vitro fragmentation of ovarian tissue activates primordial follicles through the Hippo pathway. **Human Reproduction Open**, v. 2020, n. 4, p. hoaa048, 3 out. 2020.

<https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa048>.

DESAI, N.; ALEX, A.; ABDELHAFEZ, F.; CALABRO, A.; GOLDFARB, J.; FLEISCHMAN, A.; FALCONE, T. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 119, 2010. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-119>.

DUNCAN, F. E.; FEINBERG, E.; BRANNIGAN, R. E.; EDMONDS, M.; ATAMAN, L.; WOODRUFF, T. K. Fertility Preservation. **Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 857-886.e6. DOI 10.1016/B978-0-323-47912-7.00033-0.

EPPIG, J. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 197–207, 1996a. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.197>.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MACCIOCCA, M.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MORSELLI-LABATE, A. M.; SERACCHIOLI, R.; PARADISI, R. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 31, n. 8, p. 1838–1849, ago. 2016. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew134>.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCA, M.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 3, p. 795-804.e1, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.032>.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**, v. 9, n. 1, p. 11-25, 1999.

FIGUEIREDO, J.; CELESTINO, J.; RODRIGUES, A.; SILVA, J. Importance of the biotechnique of MOEPF for the study of folliculogenesis and in vitro embryo production in large scale. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 135–163, out. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5).

FRANSOLET, M.; LABIED, S.; HENRY, L.; MASEREEL, M. C.; ROZET, E.; KIRSCHVINK, N.; NISOLLE, M.; MUNAUT, C. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091073>.

GHEZELAYAGH, Z.; KHOSHDEL-RAD, N.; EBRAHIMI, B. Human ovarian tissue in-vitro culture: primordial follicle activation as a new strategy for female fertility preservation. **Cytotechnology**, v. 74, n. 1, p. 1–15, fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10616-021-00510-2>.

GLEBSKA, J.; KOPPENOL, W. H. Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 676–682, set. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00389-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00389-7).

GNAIGER, E.; MÉNDEZ, G.; HAND, S. C. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences, v. 97, n. 20, p. 11080–11085, 26 set. 2000.

<https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.11080>.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales d'Endocrinologie**, v. 71, n. 3, p. 132–143, maio 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles.

Theriogenology, v. 86, n. 1, p. 229–238, jul. 2016a.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>.

GROSBOIS, J; DEMEESTERE, I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation. **Human Reproduction**, v. 33, n. 9, p. 1705–1714, 1 set. 2018.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dey250>.

GROSBOIS, Johanne; BAILIE, E. C.; KELSEY, T. W.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during *in vitro* culture. **Human Reproduction**, v. 38, n. 3, p. 444–458, 1 mar. 2023.

<https://doi.org/10.1093/humrep/dead008>.

GUERREIRO, D. D. **Utilização do processo biotecnológico do ovário artificial para avaliar a toxicidade do vitanolido D e da quinoxalina sobre os folículos pré-antrais caprinos**. 2019. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

RIZZO, M. Stability of first and second premolars extraction space closure. 2018. 79 p. Tese (Doutorado em Ortodontia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2018.

HASLER, W. L.; TIMM, D. M.; GAGE, J. A.; TSENG, H.; KILLIAN, T. C.; SOUZA, G. R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–9, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.125>.

HIGUCHI, C. M.; MAEDA, Y.; HORIUCHI, T.; YAMAZAKI, Y. A simplified method for three-dimensional (3-D) Ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 2015a.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143114>.

HOGAN, M.; SOUZA, G.; BIRLA, R. Assembly of a functional 3D primary cardiac construct using magnetic levitation. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 277–288, 2016.

<https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.3.277>.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R. M. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. **Human Reproduction**, v. 12, n. 5, p. 1032–1036, 1 maio 1997.

<https://doi.org/10.1093/humrep/12.5.1032>.

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

<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.10.009>.

IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; DE BELS, F.; AMEISEN, J.-C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 2, p. 249–258, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00172-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00172-7).

JACKSON, K. S.; INOUE, K.; DAVIS, D. A.; HILLIARD, T. S.; BURDETTE, J. E. Three-dimensional ovarian organ culture as a tool to study normal ovarian surface epithelial wound repair. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3921–3926, 2009. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1674>.

JAGANATHAN, H.; GAGE, J.; LEONARD, F.; SRINIVASAN, S.; SOUZA, G. R.; DAVE, B.; GODIN, B. Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6468, 1 out. 2014.

<https://doi.org/10.1038/srep06468>.

JIN, S. Y.; LEI, L.; SHIKANOV, A.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 8, p. 2633–2639, maio 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.027>.

KEDEM, A.; HOURVITZ, A.; FISCH, B.; SHACHAR, M.; COHEN, S.; BEN-HAROUSH, A.; DOR, J.; FREUD, E.; FELZ, C.; ABIR, R. Alginate scaffold for organ culture of cryopreserved-thawed human ovarian cortical follicles. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, n. 9, p. 761–769, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9605-x>.

KHUNMANEE, S.; PARK, H. Three-Dimensional Culture for *In Vitro* Folliculogenesis in the Aspect of Methods and Materials. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 28, n. 6, p. 1242–1257, 1 dez. 2022. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0229>.

KING, S. M.; QUARTUCCIO, S.; HILLIARD, T. S.; INOUE, K.; BURDETTE, J. E. Alginate hydrogels for three-dimensional organ culture of ovaries and oviducts. **Journal of Visualized Experiments**, n. 52, p. 1–5, 2011. <https://doi.org/10.3791/2804>.

LARONDA, M. M.; DUNCAN, F. E.; HORNICK, J. E.; XU, M.; PAHNKE, J. E.; WHELAN, K. A.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. , p. 1013–1028, 2014a. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0252-x>.

LARONDA, M. M.; DUNCAN, F. E.; HORNICK, J. E.; XU, M.; PAHNKE, J. E.; WHELAN, K. A.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 8, p. 1013–1028, ago. 2014b. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0252-x>.

LEE, J. H.; PARK, J.-H.; ELTOHAMY, M.; PEREZ, R.; LEE, E.-J.; KIM, H.-W. Collagen gel combined with mesoporous nanoparticles loading nerve growth factor as a feasible therapeutic three-dimensional depot for neural tissue engineering. **RSC Advances**, v. 3, n. 46, p. 24202, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3ra43534b>.

LEE, S. J.; SCHOVER, L. R.; PARTRIDGE, A. H.; PATRIZIO, P.; WALLACE, W. H.; HAGERTY, K.; BECK, L. N.; BRENNAN, L. V.; OKTAY, K. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18, p. 2917–2931, 2006. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.5888>.

LEONI, G. G.; PALMERINI, M. G.; SATTA, V.; SUCCU, S.; PASCIU, V.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; MACCHIARELLI, G.; NOTTOLA, S. A.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Differences in the Kinetic of the First Meiotic Division and in Active Mitochondrial Distribution between Prepubertal and Adult Oocytes Mirror Differences in their Developmental Competence in a Sheep Model. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0124911, 20 abr. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124911>.

LERER-SERFATY, G.; SAMARA, N.; FISCH, B.; SHACHAR, M.; KOSSOVER, O.; SELIKTAR, D.; BEN-HAROUSH, A.; ABIR, R. Attempted application of bioengineered/biosynthetic supporting matrices with phosphatidylinositol-trisphosphate-enhancing substances to organ culture of human primordial follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 10, p. 1279–1288, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0052-8>.

LI, B.; WENG, Q.; LIU, Z.; SHEN, M.; ZHANG, J.; WU, W.; LIU, H. Selection of antioxidants against ovarian oxidative stress in mouse model. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 12, p. e21997, dez. 2017. <https://doi.org/10.1002/jbt.21997>.

LIM, M.; THOMPSON, J. G.; DUNNING, K. R. HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH: Hypoxia and ovarian function: follicle development, ovulation, oocyte maturation. **Reproduction**, v. 161, n. 1, p. F33–F40, jan. 2021. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0509>.

LIN, H.; DHANANI, N.; TSENG, H.; SOUZA, G. R.; WANG, G.; CAO, Y.; KO, T. C.; JIANG, H.; WANG, R. Nanoparticle Improved Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. **The Journal of urology**, v. 195, n. 3, p. 788–795, 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.10.129>.

LIN, H.; DHANANI, N.; TSENG, H.; SOUZA, G. R.; WANG, G.; CAO, Y.; KO, T. C.; JIANG, H.; WANG, R. Nanoparticle Improved Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. **Journal of Urology**, v. 195, n. 3, p. 788–795, mar. 2016b. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.10.129>.

LIND, A.-K.; WEIJDEGÅRD, B.; DAHM-KÄHLER, P.; MÖLNE, J.; SUNDFELDT, K.; BRÄNNSTRÖM, M. Collagens in the human ovary and their changes in the perifollicular stroma during ovulation. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 85, n. 12, p. 1476–1484, jan. 2006. <https://doi.org/10.1080/00016340601033741>.

LU, J.; WANG, Z.; CAO, J.; CHEN, Y.; DONG, Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 80, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s)1. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252–1259, 1 dez. 2011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>.

MASCIANGELO, R.; CHITI, M. C.; CAMBONI, A.; AMORIM, C. A.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Mitochondrial content, activity, and morphology in prepubertal and adult human ovaries. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 10, p. 2581–2590, out. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02282-2>.

MCLAUGHLIN, M.; KINNELL, H. L.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 8, p. 736–744, 1 ago. 2014. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau037>.

NATION, A.; SELWOOD, L. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. **REPRODUCTION**, v. 138, n. 2, p. 247–255, ago. 2009. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0028>.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence1. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682–1686, 1 maio 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013029>.

PAES, V. M.; VIEIRA, L. A.; CORREIA, H. H. V.; SA, N. A. R.; MOURA, A. A. A.; SALES, A. D.; RODRIGUES, A. P. R.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; SANTOS, F. W.; APGAR, G. A.; CAMPELLO, C. C.; CAMARGO, L. S. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus-oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, p. 994–1003, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.027>.

PAIS, A. S.; REIS, S.; LARANJO, M.; CAMELO, F.; SILVA, F.; BOTELHO, M. F.; ALMEIDA-SANTOS, T. The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. **Journal of Ovarian Research**, v. 14, n. 1, p. 147, 1 nov. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00892-z>.

PENG, X.; YANG, M.; WANG, L.; TONG, C.; GUO, Z. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 5, p. 247–257, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9415-6>.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. *In*: PALMEIRA, C. M.; MORENO, A. J. (orgs.). **Mitochondrial Bioenergetics**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 810, p. 25–58. DOI 10.1007/978-1-61779-382-0_3. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-382-0_3.

PRAXEDES, É. C. G.; BEZERRA, L. G. P.; MOREIRA, S. S. J.; SANTOS, C. S.; BRASIL, A. V.; SILVA, A. M. D.; GUERREIRO, D. D.; PEREIRA, A. F.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, A. R. Microbiological load and preantral follicle preservation using different systems for ovarian tissue vitrification in the red-rumped agouti. **Cryobiology**, v. 103, p. 123–128, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.08.003>.

- REVELLI, A.; MOLINARI, E.; SALVAGNO, F.; DELLE PIANE, L.; DOLFIN, E.; OCHETTI, S. Oocyte Cryostorage to Preserve Fertility in Oncological Patients. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2012, p. 1–7, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/525896>.
- REYNOLDS, E. S. THE USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–212, 1 abr. 1963. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>.
- ROCHA, C. D.; SOARES, M. M.; DE CÁSSIA ANTONINO, D.; JÚNIOR, J. M.; FREITAS MOHALLEM, R. F.; RIBEIRO RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; BELETTI, M. E.; JACOMINI, J. O.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, v. 114, p. 244–251, jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.004>.
- RODRIGUES, A. Q.; PICOLO, V. L.; GOULART, J. T.; SILVA, I. M. G.; RIBEIRO, R. B.; AGUIAR, B. A.; FERREIRA, Y. B.; OLIVEIRA, D. M.; LUCCI, C. M.; DE BEM, A. F.; PAULINI, F. Metabolic activity in cryopreserved and grafted ovarian tissue using high-resolution respirometry. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 21517, 2 nov. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01082-z>.
- RONESS, H.; GAVISH, Z.; COHEN, Y.; MEIROW, D. Ovarian follicle burnout: A universal phenomenon? **Cell Cycle**, v. 12, n. 20, p. 3245–3246, 15 out. 2013. <https://doi.org/10.4161/cc.26358>.
- ROSENDAHL, M.; GREVE, T.; ANDERSEN, C. Y. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: A review of the literature. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 1, p. 11–24, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9912-x>.
- ROWGHANI, N. M.; HEISE, M. K.; MCKEEL, D.; MCGEE, E. a; KOEPESEL, R. R.; RUSSELL, A. J. Maintenance of morphology and growth of ovarian follicles in suspension culture. **Tissue engineering**, v. 10, n. 3–4, p. 545–552, 2004. <https://doi.org/10.1089/107632704323061906>.

SADR, S. Z.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSEINI, M.; FATEHI, R.; FAVAEDI, R. Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 194, p. 206–211, nov. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.09.028>.

SAEED-ZIDANE, M.; LINDEN, L.; SALILEW-WONDIM, D.; HELD, E.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187569, 8 nov. 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187569>.

SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K.; SHIKANOV, A. Bioengineering the Ovarian Follicle Microenvironment. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, n. 1, p. 29–52, 2014.

<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105131>.

SHIKANOV, A.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Biomaterials Interpenetrating fibrin – alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5476–5485, 2009a. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.054>.

SHIKANOV, A.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Interpenetrating fibrin–alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5476–5485, out. 2009b. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.054>.

SHIRATSUKI, S.; HARA, T.; MUNAKATA, Y.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 437, p. 75–85, dez. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.010>.

SILVA, G. M.; ROSSETTO, R.; CHAVES, R. N.; DUARTE, a B. G.; ARAÚJO, V. R.; FELTRIN, C.; BERNUCI, M. P.; ANSELMO-FRANCI, J. a; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro development of secondary follicles from

pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 4, p. 475–84, 2015a.

<https://doi.org/10.1017/S0967199414000070>.

SOUZA, G. R.; MOLINA, J. R.; RAPHAEL, R. M.; OZAWA, M. G.; STARK, D. J.; LEVIN, C. S.; BRONK, L. F.; ANANTA, J. S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M.-M.; BANKSON, J. A.; GELOVANI, J. G.; KILLIAN, T. C.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–6, 2010. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23>.

STEINLECHNER-MARAN, R.; EBERL, T.; KUNC, M.; SCHR??CKSNADEL, H.; MARGREITER, R.; GNAIGER, E. RESPIRATORY DEFECT AS AN EARLY EVENT IN PRESERVATION-REOXYGENATION INJURY OF ENDOTHELIAL CELLS1: **Transplantation**, v. 63, n. 1, p. 136–142, jan. 1997. <https://doi.org/10.1097/00007890-199701150-00025>.

SUTTON, C. M.; SPRINGMAN, S. A.; ABEDAL-MAJED, M. A.; CUPP, A. S. Bovine Ovarian Cortex Tissue Culture. **Journal of Visualized Experiments**, n. 167, p. 61668, 14 jan. 2021. <https://doi.org/10.3791/61668>.

TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the extracellular matrix. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 1, p. 51–59, jan. 1997. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.1.9034166>.

TELFER, E. E. Future developments: In vitro growth (IVG) of human ovarian follicles. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 98, n. 5, p. 653–658, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1111/aogs.13592>.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1151–1158, 1 maio 2008. <https://doi.org/10.1093/humrep/den070>.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1151–1158, 2008.

<https://doi.org/10.1093/humrep/den070>.

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

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.043>.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M. Strategies to support human oocyte development in vitro. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 901–907, 2012.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.130001et>.

TSENG, H.; BALAOING, L. R.; GRIGORYAN, B.; RAPHAEL, R. M.; KILLIAN, T. C.; SOUZA, G. R.; GRANDE-ALLEN, K. J. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 173–182, jan. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.003>.

TSENG, H.; GAGE, J. A.; HAISLER, W. L.; NEELEY, S. K.; SHEN, T.; HEBEL, C.; BARTHLOW, H. G.; WAGONER, M.; SOUZA, G. R. A high-throughput in vitro ring assay for vasoactivity using magnetic 3D bioprinting. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30640, 1 ago. 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep30640>.

TSENG, H.; GAGE, J. A.; RAPHAEL, R. M.; MOORE, R. H.; KILLIAN, T. C.; GRANDE-ALLEN, K. J.; SOUZA, G. R. Assembly of a Three-Dimensional Multitype Bronchiole Coculture Model Using Magnetic Levitation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, n. 9, p. 665–675, set. 2013.

<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0157>.

WALLACE, W. H. B. Oncofertility and preservation of reproductive capacity in children and young adults. **Cancer**, v. 117, n. SUPPL. 10, p. 2301–2310, 2011.

<https://doi.org/10.1002/cncr.26045>.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N. W. K.; AGUNG, B.; NII, M.; NAGAI, T.

Effects of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of

Porcine Oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 87–97, 2005. <https://doi.org/10.1262/jrd.51.87>.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 1, p. 3–6, jan. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9478-4>.

WU, J.; JING, L.; YUAN, H.; PENG, S. T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 202, n. 3, p. 168–177, maio 2011. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.01.029>.

XIAO, S.; ZHANG, J.; ROMERO, M. M.; SMITH, K. N.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep17323>.

XU, J.; LAWSON, M. S.; YEOMAN, R. R.; MOLSKNESS, T. A.; TING, A. Y.; STOUFFER, R. L.; ZELINSKI, M. B. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. **Human Reproduction**, v. 28, n. 8, p. 2187–2200, 2013. <https://doi.org/10.1093/humrep/det093>.

XU, M.; WEST, E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Identification of a Stage-Specific Permissive In Vitro Culture Environment for Follicle Growth and Oocyte Development 1. v. 923, n. September, p. 916–923, 2006. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054833>.

XU, M.; WEST-FARRELL, E. R.; STOUFFER, R. L.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Encapsulated Three-Dimensional Culture Supports Development of Nonhuman Primate Secondary Follicles 1. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 587–594, 1 set. 2009. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074732>.

YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 4, p. 1248–1254, abr. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.036>.

ZHOU, H.; MALIK, M. A.; ARAB, A.; HILL, M. T.; SHIKANOV, A. Hydrogel Based 3-Dimensional (3D) System for Toxicity and High-Throughput (HTP) Analysis for Cultured Murine Ovarian Follicles. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140205, 9 out. 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140205>.