

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

**ISRAEL NUNES SILVEIRA**

**Efeitos da inibição de PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue*) em cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino sobre a ativação folicular inicial e qualidade tecidual**

Ribeirão Preto

2023

**ISRAEL NUNES SILVEIRA**

**Efeitos da inibição de PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue*) em cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino sobre a ativação folicular inicial e qualidade tecidual**

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)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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.

Silveira, Israel Nunes

Efeitos da inibição de PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue*) em cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino sobre a ativação folicular inicial e qualidade tecidual / Israel Nunes Silveira; Orientadora, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva. Ribeirão Preto: FMRP, 2023.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023 - 75 pag.

1. PTEN; 2. Cultivo de Tecido Ovariano; 3. Ativação Folicular; 4. Estroma Ovariano

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, força, e constante companhia nessa jornada.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina, agradeço o acolhimento, apoio, paciência constante e confiança e por ser um exemplo de respeito e gentileza na academia.

Às minhas colegas de laboratório, Dra. Deize Antonino, Julia Cândido, Ana Laura Lourenço, Stefany Santana e demais colegas de Pós-Graduação, com quem foi uma honra dividir tantos momentos de crescimento.

Às técnicas Maria Aparecida (Cidinha), Adriana Murashima, Vani Alves e Elizabete Milani pelas grandes contribuições e paciência com minhas muitas urgências.

Aos meus pais Ely e Regina por acreditar, impulsionar e orar pelos meus sonhos.

Às minhas irmãs Petra e Haifa e meu cunhado Valdinê pelo carinho e apoio, os quais sei que sempre posso contar.

À dona do mais doce sorriso, a pequena Olívia, que me impulsionou a ser um tio Mestre e futuro Doutor.

A Ivan Lucas, meu carinho, afeto, sorriso e companhia nesses últimos três anos.

Aos meus tão amados amigos de vida e aqueles tantos presenteados pela USP-RP, por existirem e me permitirem existir em sua companhia.

A todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

O presente projeto foi desenvolvido com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através da concessão de bolsa de estudo de Mestrado, nº de processo 130256/2020-0.

*“[...] Gravity, release me  
And don't ever hold me down  
Now my feet won't touch the ground”*

- Coldplay

## RESUMO

SILVEIRA, I. N. Efeitos da inibição de PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue) em cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino sobre a ativação folicular inicial e qualidade tecidual. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências / Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

Pacientes Oncológicas do sexo feminino, principalmente meninas pré-púberes e mulheres inaptas à estimulação ovariana, quando são submetidas à quimioterapia enfrentam a possibilidade de perder sua fertilidade devido à gonadotoxicidade destas drogas. A criopreservação de tecido ovariano, seguida do cultivo de folículos ovarianos *in vitro* em sistema *multistep*, apesar de ainda experimental, parece ser a estratégia mais promissora para a obtenção de oócitos MII competentes, para futura utilização em técnicas de FIV. A ativação de folículos primordiais no tecido ovariano e seu crescimento aos estágios primário e secundário é o passo mais desafiador para a consolidação deste sistema uma vez que, em condições fisiológicas, esse processo leva meses nos mamíferos superiores. O processo de ativação dos folículos primordiais inativos do pool é um evento fisiológico ainda pouco elucidado, por isso a ativação folicular artificial é um grande desafio. A via de sinalização PI3K parece estar diretamente envolvida na ativação de folículos ovarianos primordiais. O uso de inibidores do PTEN, um regulador negativo fundamental da PI3K, parece promover ativação destes folículos *in vitro*, no entanto, com sucesso modesto com a continuação do crescimento e desenvolvimento, principalmente devido a impactos importantes na estrutura folicular e do estroma tecidual. Nosso estudo teve como objetivo expor o tecido do córtex ovariano bovino ao bpV(pic), um inibidor de PTEN em diferentes condições e avaliar seus efeitos nos folículos e no estroma ovariano. Fragmentos ovarianos foram cultivados com bpV(pic) a 1, 10 ou 100µM por 12, 24 e 48h (9 grupos tratados) e mantidos em cultivo até completar 7 dias. Um controle fresco e um controle cultivado foram comparados aos grupos tratados quanto ao (a) desenvolvimento folicular, através de classificação histomorfométrica, (b) ativação de PI3K, indicada pela extrusão nuclear do fator de transcrição Foxo3 pelo ensaio IHC, (c) apoptose folicular e (d) do estroma, por IHC de caspase-3 clivada e (e) quantificação de espessura de fibras colágenas por coloração de *picrosírius red* observada sob microscopia de luz polarizada. Nossos achados não mostraram diferença significativa na ativação da via PI3K ou na alteração das taxas de desenvolvimento folicular, no entanto, doses elevadas de bpV(pic) mostraram-se prejudiciais à sobrevivência folicular. Quando comparados ao controle cultivado, os fragmentos tratados com 100µM apresentaram até o dobro das taxas de apoptose nas células do estroma. O uso de doses intermediárias (10 µM) do fármaco mostrou

um efeito protetor às células do estroma. O ensaio de *picrosirius red* mostrou influência significativa da exposição prolongada, com importante redução da espessura das fibras colágenas, indicando desgaste na matriz extracelular em resposta ao fármaco. Há um efeito dose-dependente da exposição ao bpV (pic) na vitalidade folicular e no dano do estroma. Considerando uma possível atividade protetora tecidual em condições intermediárias de exposição ao inibidor de PTEN, a utilização desta molécula associada a outros ativadores de PI3K pode ser uma abordagem interessante para a concepção de uma primeira fase do sistema de cultivo *multistep*.

**Palavras-Chave:** PTEN; Cultivo de Tecido Ovariano; Ativação Folicular; Estroma Ovariano

## ABSTRACT

SILVEIRA, I. N. Effects of PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue) inhibition in *in vitro* culture of bovine ovarian tissue on initial follicular activation and tissue quality. 2023. Dissertation (Master of Science / Gynecology and Obstetrics – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, 2023).

Female oncopatients, especially pre-pubertal girls and women unsuitable for ovarian stimulation, when undergoing chemotherapy face the possibility of losing their fertility due to the gonadotoxicity of these drugs. Cryopreservation of ovarian tissue, followed by the cultivation of ovarian follicles *in vitro* in a multistep system, although still experimental, appears to be the most promising strategy for obtaining competent MII oocytes for future use in IVF techniques. The activation of primordial follicles in the ovarian tissue and their growth to the primary and secondary stages is the most challenging step towards the consolidation of this system since, under physiological conditions, this process takes months in higher mammals. The activation of primordial follicles in the ovarian tissue and their growth to the primary and secondary stages is the most challenging step towards the consolidation of this system since, under physiological conditions, this process takes months in higher mammals. The activation process of dormant primordial follicles in the ovarian pool is a physiological event that is still poorly understood, which is why artificial follicular activation is a great challenge. The PI3K signaling pathway appears to be directly involved in the activation of primordial ovarian follicles. The inhibition of PTEN, a fundamental negative regulator of PI3K, appears to promote activation of these follicles *in vitro*, however, with modest success with continued growth and development, mainly due to important impacts on the follicular structure and tissue stroma. Our study aimed to expose bovine ovarian cortex tissue to bpV(pic), a PTEN inhibitor under different conditions and evaluate its effects on follicles and ovarian stroma. Ovarian fragments were cultured with bpV(pic) at 1, 10 or 100 $\mu$ M for 12, 24 and 48h (9 treated groups) and kept in culture until complete seven days. A fresh control and a cultured control were compared to the treated groups regarding (a) follicular development, through histomorphometric classification, (b) PI3K activation, indicated by nuclear extrusion of the Foxo3 transcription factor by IHC assay, (c) follicular apoptosis and (d) stroma, by cleaved caspase-3 IHC and (e) quantification of collagen fiber thickness by picosirius red staining observed under polarized light microscopy. Our findings showed no significant difference in the activation of the PI3K pathway or changes in follicular development rates, however, high doses of bpV(pic) were detrimental to follicular survival. When compared with the cultured control group, fragments treated with 100 $\mu$ M showed up to double the apoptosis rates in stromal cells. The use of



intermediate doses (10  $\mu\text{M}$ ) of the drug showed a protective effect on stromal cells. The picosirius red assay showed a significant influence of prolonged exposure, with a significant reduction in the thickness of collagen fibers, indicating wear in the extracellular matrix in response to the drug. There is a dose-dependent effect of bpV(pic) exposure on follicular vitality and stromal damage. Considering a possible tissue protective activity in intermediate conditions of exposure to the PTEN inhibitor, the use of this molecule associated with other PI3K activators could be an interesting approach for designing a first phase of the multistep culture system.

**Keywords:** PTEN; Ovarian Tissue Culture; Follicular Activation; Ovarian Stroma

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação do Cultivo *Multistep*
- Figura 2 Desenvolvimento folicular
- Figura 3 Sinalização Intracelular da Ativação Folicular Inicial (AFI)
- Figura 4 Sinalizações Envolvidas na Ativação Folicular Inicial (AFI)
- Figura 5 Desenho Experimental
- Figura 6 Transporte e Lavagens
- Figura 7 Dissecção e fatiamento do córtex ovariano
- Figura 8 Fragmentação do córtex ovariano
- Figura 9 Placas de tratamento e cultivo
- Figura 10 Seccionamento e distribuição nas lâminas
- Figura 11 Escaneamento de lâminas histológica
- Figura 12 Aquisição de imagens do estroma ovariano
- Figura 13 Captura de imagens para análise de colágeno
- Figura 14 Ajuste linear de brilho e contraste
- Figura 15 Quantificação de apoptose do estroma ovariano
- Figura 16 Processamento das imagens de *picrosírius red* em microscópio de luz polarizada
- Figura 17 Classificação folicular e imunolocalização de Foxo3
- Figura 18 Apoptose Folicular por Imunohistoquímica de Caspase3-Clivada
- Figura 19 Apoptose de Células do Estroma por Imunohistoquímica de Caspase3-Clivada
- Figura 20 Espessura de fibras colágenas por *picrosírius red* sob luz polarizada

**LISTA DE SÍMBOLOS**

≈	Aproximadamente
cm	Centímetro
≠	Diferente
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
°C	Graus Celsius
h	Hora
=	Igual
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro Quadrado
min	Minuto
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
%	Porcentagem
kg	Quilograma
seg	Segundos

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Oncofertilidade .....	15
1.2. Preservação de fertilidade .....	17
1.2.1. Criopreservação de Gametas.....	17
1.2.2. Criopreservação de tecido ovariano .....	17
1.2.3. Cultivo <i>in vitro</i> .....	19
1.3. Foliculogênese .....	20
1.4. Sinalização da AFI .....	22
1.5. Ativação Folicular <i>in vitro</i> (AIV) .....	27
1.6. Modelo Experimental .....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS .....	32
3.1. Objetivo Geral .....	33
3.2. Objetivos Específicos.....	33
4. HIPÓTESES .....	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
5.1. Aspectos Éticos .....	38
5.2. Grupos Experimentais e n amostral .....	38
5.3. Composição dos Meios.....	38
5.4. Coleta e Transporte do Material Biológico .....	39
5.5. Processamento e Fragmentação .....	39
5.6. Inibição de PTEN <i>in vitro</i> e Cultivo Tecidual .....	41
5.7. Fixação e Histotecnologia .....	41
5.8. Imunoensaios.....	42
5.8.1. IHQ - FOXO3 e Caspase-3 Clivada.....	42
5.8.2. IF - FOXO3 .....	43
5.9. Coloração com <i>PSR</i> .....	44
5.10. Aquisição de Imagens .....	44
5.10.1. IHQ – Contagem e Classificação Folicular.....	44

5.10.2.	IHQ – Quantificação de Estroma Marcado.....	44
5.10.3.	Lâminas Coradas com PSR – Colágeno.....	45
5.11.	Análise e Processamento de Imagens .....	46
5.11.1.	IHQ FOXO3 – Classificação Folicular e Extrusão Nuclear de Foxo3 .....	47
5.11.2.	IHQ Caspase-3 Clivada - Apoptose .....	47
5.11.3.	Quantificação de Apoptose no Estroma – IHQ.....	47
5.11.4.	Quantificação de Colágeno – PSR .....	48
5.12.	Análises Estatísticas .....	49
6.	RESULTADOS .....	51
6.1.	Classificação morfológica de oócitos e extrusão nuclear de Foxo3 .....	53
6.2.	Apoptose folicular .....	53
6.3.	Apoptose de células do estroma .....	53
6.4.	Perfil de espessura das fibras colágenas .....	53
7.	DISCUSSÃO .....	57
8.	CONCLUSÃO .....	62
9.	REFERÊNCIAS.....	64
10.	ANEXOS.....	73

# 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Oncofertilidade

Embora as transformações no estilo de vida e na estrutura social tenham gerado novas expectativas e ideais de autorrealização, a concepção continua a ser uma das principais, se não a principal aspiração de casais em todo o mundo. Mais recentemente, mesmo indivíduos fora de relações conjugais têm manifestado interesse na possibilidade de se tornarem mães ou pais solteiros.

As Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs) revolucionaram o planejamento familiar, proporcionando mais flexibilidade e precisão de escolha nas mais variadas composições ou estruturas desses núcleos. Além disso, as TRAs têm desempenhado um papel crucial na adaptação a mudanças que a vida moderna impõe, como a crescente tendência de adiamento da gravidez devido a questões socioeconômicas e a possibilidade de planejar o número de filhos com maior exatidão.

A superação da infertilidade é a mais proeminente faceta e principal força motriz para o avanço das TRAs. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade afeta até 17,5% dos indivíduos em idade reprodutiva globalmente (COX *et al.*, 2022), independente da sua etiologia. Nas últimas décadas, um amplo espectro de opções terapêuticas tem surgido e se consolidado a fim de possibilitar a concretização do desejo de conceber, com tratamentos que incluem desde intervenções minimamente invasivas a procedimentos cirúrgicos e laboratoriais mais complexos (CHAMBERS *et al.*, 2021).

Além das causas genéticas e ambientais, intervenções médicas podem provocar infertilidade. A ação gonadotóxica direta de regimes quimio e/ou radioterápicos, procedimentos cirúrgicos e desdobramentos sistêmicos de doenças a longo prazo são possíveis causadores de danos permanentes às estruturas germinativas e endócrinas (BLUMENFELD, 2012; VELEZ; OHLANDER, 2021).

Nos anos recentes, o aumento considerável das taxas de sobrevivência após os tratamentos oncológicos, sobretudo em países desenvolvidos, tem fomentado discussões e estudos acerca das opções de preservação da fertilidade para os pacientes curados em idade reprodutiva ou mesmo antes da puberdade (DONNEZ; DOLMANS, 2017; JENSEN; MORBECK; CODDINGTON, 2011; JERUSS; WOODRUFF, 2009).

Além de uma abordagem voltada à remissão das doenças, cresce a demanda por tratamentos que promovam qualidade de vida com a redução dos danos aos pacientes, inclusive da sua fertilidade. A *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* recomenda que os pacientes sejam informados dos riscos e alternativas para salvaguarda da sua competência reprodutiva tão logo o diagnóstico e tratamento de neoplasias sejam discutidos (OKTAY *et al.*, 2018). Portanto, é fundamental a democratização do acesso à informação e, principalmente, às intervenções para a preservação da fertilidade humana, bem como a constante adaptação médico-hospitalar para atender estas demandas.

Para além dos aspectos clínicos, é importante que sejam considerados fatores sociais, etários e psicológicos dos pacientes no momento da definição de estratégias de preservação de fertilidade, abrangendo de maneira tão eficaz quanto possível suas necessidades e aspirações a curto e longo prazo.

O dano sobre as gônadas causado por tratamentos citotóxicos pode resultar em amenorreia durante -ou pouco tempo após- a terapia, caracterizando a Falência Gonadal Aguda (NAKAYAMA *et al.*, 2008). Em alguns casos esta condição é temporária e depende de fatores como a idade no momento da exposição, dose de radiação ou do agente quimioterápico, além do uso de proteção das gônadas por agentes físicos ou químicos (RIVKEES, 1988).

Ovários irradiados são muito susceptíveis a danos permanentes mesmo com uso de pequenas doses ( $\geq 2\text{Gy}$ ), com consequências na quantidade e qualidade do *pool* de reserva ovariana, que corresponde ao estoque de folículos primordiais disponíveis para recrutamento e desenvolvimento em toda a vida fértil da mulher. Os danos da irradiação podem levar a falência ovariana precoce, marcada pelo esgotamento do *pool* de reserva e chegada precoce da menopausa. O momento no qual ocorrerá este esgotamento segue uma relação dose-dependente na qual, quanto maior e mais direta a exposição das gônadas à irradiação, mais precoce tende a ser a menopausa (WALLACE *et al.*, 2005).

A irradiação total ou sítio-específica pode ser considerada um ponto definidor da preservação da fertilidade aos pacientes submetidos à radioterapia, principalmente de jovens pré-púberes sem possibilidade de coletar gametas. Para pacientes do sexo feminino submetidas a irradiação pélvica, é possível o transplante ortotópico das gônadas para fora do centro do campo de irradiação (GUBBALA *et al.*, 2014).

Dentre a ampla gama de quimioterápicos hoje disponíveis, agentes alquilantes são os principais causadores de gonadotoxicidade. Fármacos como a ciclofosfamida, busulfan, ifosfamida e lomustine, primeira linha de tratamento para algumas malignidades, são conhecidos causadores de Insuficiência Ovariana Precoce (IOP) (BLUMENFELD, 2012; GUBBALA *et al.*, 2014). Desta forma, seja pela irradiação ou pela quimioterapia, o dano gonadal é certo, podendo levar perda de função gonadal total ou parcial.

A ciclofosfamida provoca o chamado “*burnout*” do *pool* de reserva ovariana. Mais que o simples recrutamento dos folículos primordiais, neste caso, mediado pela ativação global da via PI3K (ver adiante) que resultaria em atresia de todos ou quase todos os folículos recrutados, o agente quimioterápico tem ação especialmente tóxica sobre células em crescimento e proliferação. Assim, o efeito *burnout* pode ser entendido como o resultado de uma ação paralela de recrutamento e destruição massiva de toda a população de folículos ovarianos (JERUSS; WOODRUFF, 2009; RONESS *et al.*, 2013).



## 1.2. Preservação de fertilidade

Em um cenário ideal, deve-se evitar a ocorrência de danos diretos às gônadas. A ação dos agentes alquilantes na destruição de folículos parece ter relação direta com o grau de atividade gonadal e inversa ao tamanho do *pool* de reserva, assim, em meninas pré-púberes os impactos imediatos da administração desses agentes têm menor extensão (RIVKEES, 1988).

Neste contexto, já há algumas décadas, estratégias para a preservação de gametas (isolados ou inclusos do tecido ovariano), têm sido propostas com taxas de sucesso variáveis. Dentre estas estratégias estão a utilização de fármacos gonadoprotetores, a exemplo, agonistas da liberação de GnRH administrados dias antes e durante o tratamento com agentes alquilantes, com resultados controversos, mas que alguns autores demonstram efeitos positivos em alguns estudos clínicos, em teoria pela redução da atividade ovariana, tornando-o menos sensível aos danos dos quimioterápicos (ABDEL-RAZEQ, 2019). A inibição farmacológica da via PI3K em associação ao tratamento quimioterápico também parece ter um efeito gonadoprotetor.

### 1.2.1. Criopreservação de Gametas

A coleta e criopreservação de gametas é, notavelmente, a principal, mais acessível e mais eficaz estratégia de preservação de fertilidade para pacientes em idade reprodutiva. Os gametas podem ser preservados por tempo indefinido e utilizados em qualquer momento de escolha dos pacientes.

Apesar da eficácia do método, mulheres que desejam coletar oócitos para criopreservação precisam passar por ciclo (ou ciclos) de estimulação ovariana, e a recuperação dos oócitos é feita por punção folicular guiada por ultrassom. Assim, a própria coleta dos gametas femininos para criopreservação demanda de procedimentos clínicos e laboratoriais mais complexos, dispendiosos e com chances maiores de insucesso, uma vez que o número de oócitos recuperados é limitado e ainda precisa apresentar algum grau de qualidade.

Outra importante limitação da coleta de gametas femininos é o tempo disponível para o procedimento, uma vez que os ciclos de estimulação ovariana duram pelo menos duas semanas entre o início da administração hormonal e a aspiração folicular. Este tempo pode não estar disponível dependendo do estágio e tipo de doença. Além disso, algumas malignidades como o câncer de mama, o mais recorrente em pacientes do sexo feminino em idade reprodutiva, podem ser especialmente responsivas aos hormônios utilizados nos ciclos de estimulação ovariana, aumentando as chances de agravo.

### 1.2.2. Criopreservação de tecido ovariano

Dadas as dificuldades da coleta de gametas, a criopreservação de tecido de córtex ovariano, apesar de ainda ser considerada experimental em alguns países, já possui aplicações clínicas como o implante orto ou heterotópico, com dezenas de nascimentos reportados mundialmente como resultado desses procedimentos (DEMEESTERE *et al.*, 2015; DONNEZ *et al.*, 2011). As principais vantagens do reimplante de tecido ovariano são a possibilidade de recuperação das funções reprodutivas e endócrinas da paciente, pois o tecido implantado permite que a foliculogênese ocorra em condições tão próximas do fisiológico quanto possível (SMITZ *et al.*, 2010; SONMEZER; OKTAY, 2010). O implante ortotópico realizado na parede da cavidade pélvica e, portanto, próximo à posição original do ovário, viabiliza a retomada da ovulação e do ciclo menstrual, com chances de gravidez natural.

A principal preocupação associada ao implante de tecidos ovarianos criopreservados é a reinserção de células malignas com potencial reincidência para a paciente. Este risco é extremamente alto em (mas não restrito a) neoplasias do sangue e/ou com alto potencial metastático, portanto, não é recomendada nestes casos (DOLMANS *et al.*, 2013). Considerando que as leucemias são o tipo mais comum de câncer entre crianças pré-púberes, é razoável entender que este público permanece como o mais carente de novas opções para preservação da sua fertilidade.

Ainda, o tempo necessário para revascularização de fragmentos criopreservados de tecido ovariano varia entre pacientes, e esta é uma outra limitação do reimplante. A ocorrência de hipóxia resulta em perda de folículos e danos importantes ao estroma dos tecidos implantados (KOLIBIANAKIS, 2015). Sendo assim, o cultivo *in vitro* do tecido criopreservado passa a ser uma estratégia interessante, mas que ainda carece de aprimoramento.

O preparo dos fragmentos de tecido para a criopreservação envolve a retirada de parte considerável do tecido em sua face medular, restando apenas uma fina camada da porção mais externa do córtex. Este procedimento tende a destruir/retirar folículos em estágios mais adiantados do desenvolvimento e o AMH liberado por esses folículos seria um importante fator de controle do recrutamento de folículos primordiais (MOOLHUIJSEN; VISSER, 2020). Como consequência, observa-se em fragmentos reimplantados ou mesmo cultivados *in vitro*, um efeito semelhante ao *burnout* (causado pelos quimioterápicos) com recrutamento e ativação expressiva de folículos, mas a destruição desses folículos se dá por atresia e não por citotoxicidade (KOLIBIANAKIS, 2015; SMITZ *et al.*, 2010; SONMEZER; OKTAY, 2010).

Após algum tempo, os folículos que iniciaram seu crescimento passam a secretar AMH e há uma tendência de retomada do controle da foliculogênese. Os danos ao número de folículos nos fragmentos, no entanto, são permanentes, e esta perda (associada aos danos da hipóxia até a revascularização do implante) podem resultar numa expressiva redução da vida útil do tecido implantado (NOVELLA-MAESTRE *et al.*, 2015).

### 1.2.3. Cultivo *in vitro*

Novas estratégias de cultivo *in vitro* vem sendo propostas para corresponder à demanda de pacientes que, por qualquer limitação, não tenham acesso às alternativas já estabelecidas no campo da preservação de fertilidade (ROY; TREACY, 1993). A combinação sequencial de diferentes etapas de cultivo para cada fase da foliculogênese é conhecida como cultivo *multistep*. Este é o método mais plausível para sustentar as diferentes demandas bioquímicas e estruturais do folículo desde a Ativação Folicular Inicial (AFI), passando pelo isolamento e crescimento de folículos pré-antrais, formação dos complexos cumulus-oócitos (COCs) e MIV (PICTON *et al.*, 2008).

O cultivo *multistep* foi inicialmente proposto há três décadas por Eppig e Telfer (1993) e nos primeiros trabalhos com modelo murino foram obtidos oócitos MII competentes, inclusive com um nascimento, através de folículos cultivados *in vitro* desde a fase primordial em duas etapas (EPPIG; O'BRIEN, 1996; TELFER *et al.*, 2008). Por conta do tempo necessário para o desenvolvimento folicular de mamíferos maiores bem como para corresponder às diferenças fisiológicas das diferentes espécies, o sistema foi aperfeiçoado e novas etapas foram incluídas até que McLaughlin *et al.* (2018) tivessem sucesso na obtenção de oócitos MII competentes a partir de folículos primordiais humanos.

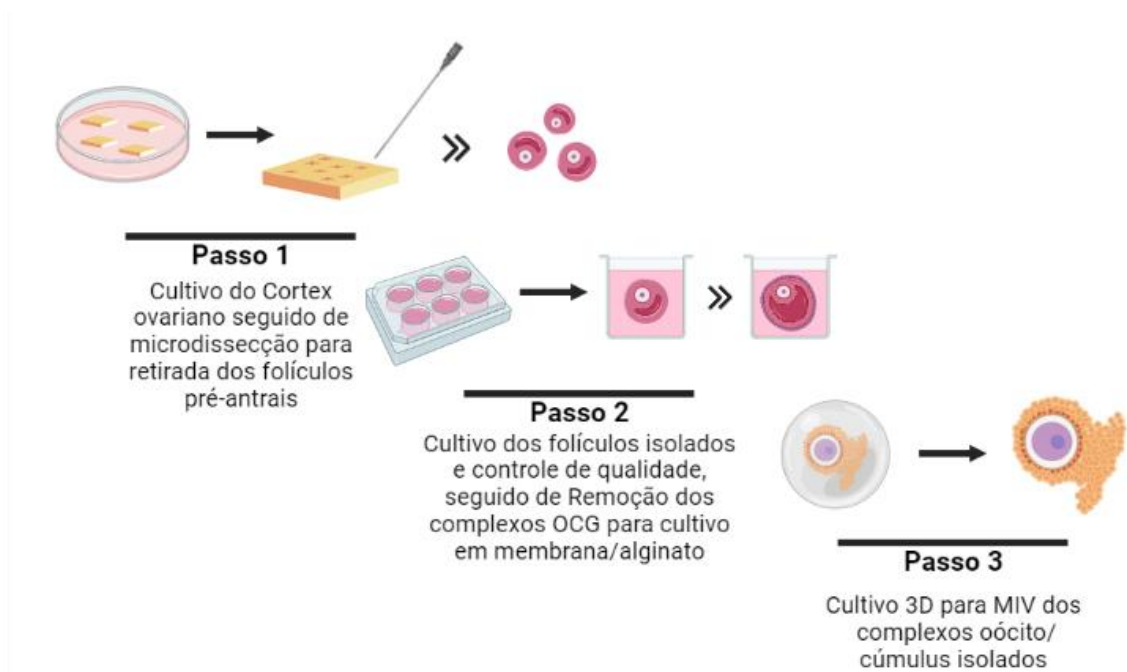


Figura 1 - Representação do Cultivo Multistep.

Legenda: Modificado de Smitz *et al.* 2010. Fonte: Imagem do autor criada no BioRender.com (2023)

Na primeira etapa do sistema de cultivo *multistep*, fragmentos do córtex ovariano são cultivados *in vitro* objetivando a Ativação Folicular Inicial (AFI) e crescimento folicular. A

segunda fase consiste no isolamento e cultivo dos folículos pré-antrais até a formação da cavidade antral. Na terceira etapa, os COCs são separados e cultivados até que, por fim, sigam para a Maturação *in vitro* (quarta etapa) (BERTOLDO *et al.*, 2018). Apesar de provada conceitualmente a possibilidade de se obterem oócitos MII provenientes de folículos em quiescência, os gametas obtidos, até então, foram em número reduzido e baixa qualidade. Assim, o principal desafio da atualidade com relação ao cultivo *multistep* é o aperfeiçoamento individual das etapas 1, 2 e 3 principalmente (Figura 1). A Maturação *in vitro* é um procedimento bem estabelecido, inclusive na clínica reprodutiva.

O interesse pela recuperação dos folículos em estágio primordial é justificado por duas principais razões. O alto número de folículos neste estágio em relação aos demais por toda a idade reprodutiva, inclusive no ano que antecede a menopausa e a alta resistência dessas estruturas ao processo de criopreservação, que se dá pelo pequeno tamanho, ausência de zona pelúcida e baixa atividade metabólica dos folículos primordiais (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000). Em contextos de preservação de fertilidade, esta característica é muito atrativa, pois, frequentemente há pouco tempo para tomada de decisão e a possibilidade de se utilizar o material criopreservado em momento oportuno (social, emocional e financeiramente) é determinante para a aplicação clínica da técnica (DONNEZ *et al.*, 2011; PICTON; KIM; GOSDEN, 2000; WALLACH ASSOCIATE EDITOR *et al.*, 1998).

A Ativação Folicular *in vitro* (AIV) é um desafio à parte, pois este processo dura meses em mamíferos superiores e depende de uma complexa rede de sinalizações inter e intracelulares (KIM, 2012). Esta é, notavelmente, a principal razão pela qual a primeira etapa dos sistemas de cultivo *multistep* moderno utiliza fragmentos ovarianos e não folículos primordiais isolados. A relação com o estroma circundante é fundamental para a saúde dos folículos nas fases mais tardias de crescimento. Por esta razão, estudos têm sido direcionadas a compreender e reduzir os efeitos danosos do cultivo sobre os folículos, propondo, por exemplo, a utilização de matrizes tridimensionais e levitação magnética, mas com um olhar também voltado ao tecido circundante que dá sustentação à foliculogênese (GROSBOIS *et al.*, 2023; KINNEAR *et al.*, 2020; VANACKER; AMORIM, 2017; XU *et al.*, 2013).

### 1.3. Foliculogênese

O ovário é um órgão de função endócrina e germinativa. É dividido em uma região medular, onde perfundem vasos sanguíneos em tecido conjuntivo, e um córtex de tecido conjuntivo rico em colágeno com uma vasta população de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. Estes folículos correspondem às unidades funcionais dos ovários. O córtex ovariano é coberto pela túnica albugínea, uma fina camada de tecido conjuntivo pouco vascularizado (FORABOSCO *et al.*, 1991; GOUGEON, 2011).

Em humanos, os folículos ovarianos são formados entre o segundo e quinto mês de desenvolvimento embrionário, quando atingem o número de aproximadamente 7 milhões, este número é reduzido nos meses subsequentes até cerca de 2 milhões ao nascimento (BLOCK, 1953). No momento da menarca, estima-se que haja cerca de 300 a 400 mil folículos no ovário (OKTEM; URMAN, 2010).

Inicialmente, a composição dos folículos ovarianos primordiais consiste em um oócito em meiose I interrompida na fase de diplóteno da prófase I circundado por uma monocamada de células epiteliais pavimentosas, as células da pré-granulosa (Figura 2). Esses folículos que compõem o *pool* de reserva ovariana podem permanecer em estado de latência por meses, anos ou décadas (GOUGEON, 2011; MCGEE; HSUEH, 2000).

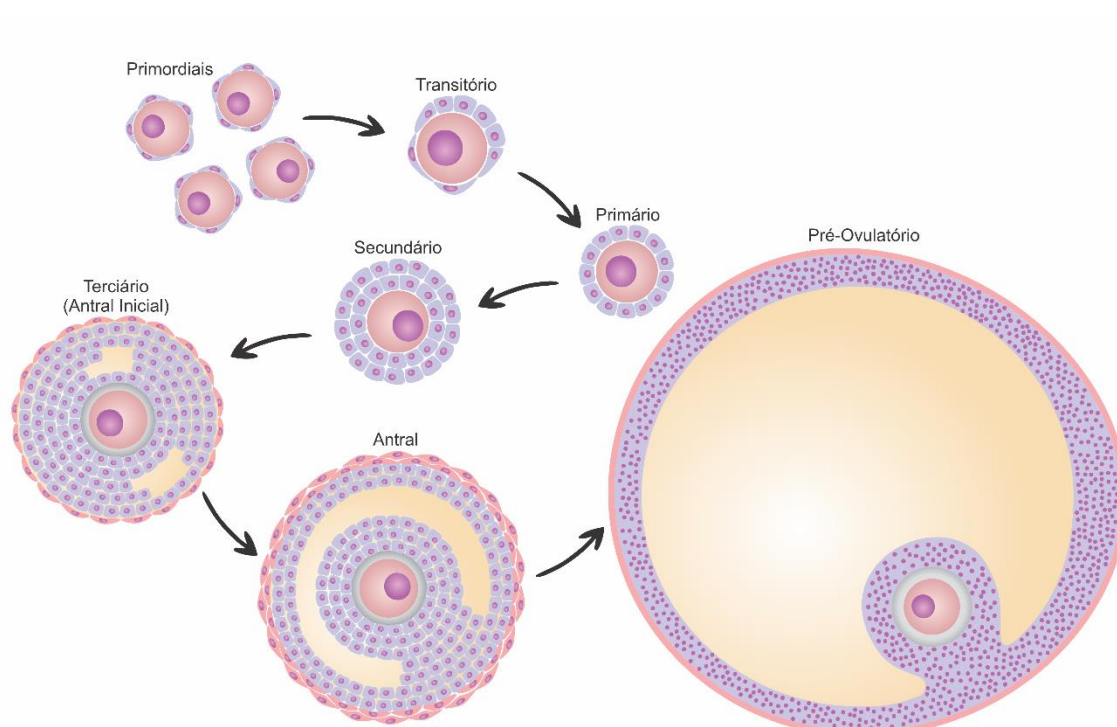


Figura 2 - Desenvolvimento folicular

Legenda: Folículos primordiais do pool de reserva podem ser ativados para formar folículos primários e secundários. Os folículos pré-antrais podem, ao receber sinalização endócrina, formar o antro e, se selecionados dentre os folículos antrais, evoluírem para a ovulação. Fonte: Imagem do autor (2023).

Dezenas de folículos primordiais são continuamente recrutados e a maior parte deles entrará em processo de atresia em algum momento da foliculogênese, ao passo que a cada ciclo menstrual em humanos um único folículo crescerá até que se torne ovulatório. Há, portanto, um processo contínuo de crescimento e seleção, que dependerá de diferentes estímulos e obstáculos em cada fase do crescimento folicular.

A AFI, processo em que os folículos primordiais são recrutados é, notavelmente, a etapa mais longa da foliculogênese. Em humanos e mamíferos superiores este processo dura

meses e seu gatilho de iniciação parece envolver um conjunto sincronizado de sinalizações bioquímicas e até mecânicas. Uma vez que todos os folículos se encontram num mesmo tipo de tecido e próximos uns aos outros, a seleção daqueles que entrarão em processo de AFI parece seguir uma lógica de aleatoriedade, mas é determinada pelo balanço sensível de diversos fatores intra-ovarianos de ativação e inibição (HSUEH *et al.*, 2015; KIM, 2012; OKTEM; URMAN, 2010).

Uma vez que ocorre a AFI, observa-se uma alteração morfológica em que as células da granulosa (CG) passam a apresentar um formato cuboide e alta atividade mitótica ainda em monocamada, tornando-se um folículo primário. Este processo de transição é independente de gonadotrofinas e os mecanismos moleculares que selecionam os folículos a serem recrutados ainda não estão completamente elucidados (Figura 2).

Seguindo o seu desenvolvimento, os folículos primários ganham novas camadas de CG e o ovócito aumenta em volume. Os folículos secundários, com duas ou mais camadas de CG, passam a recrutar células da matriz extracelular circundante que irão se diferenciar para compor a teca, neste momento, ocorre a formação de um pequeno espaço precursor do antro preenchido por fluido no epitélio folicular (HSUEH *et al.*, 2015). Os folículos antrais iniciais (ou terciários) passam a expressar receptores de FSH e LH. A partir deste momento, a foliculogênese torna-se altamente dependente de gonadotrofinas (Figura 2) (KISHI *et al.*, 2018; OKTAY; BRIGGS; GOSDEN, 1997)..

Ao final do crescimento folicular, já na fase de dependência de LH, ocorre um pico de liberação de LH que desencadeiam uma série de modificações estruturais e metabólicas ligadas à maturação folicular e extrusão oocitária. Após a ovulação, as células remanescentes do folículo se diferenciam para a formação do corpo lúteo, que produz hormônios esteroides durante toda a gravidez ou entra em atresia, enquanto novos folículos são selecionados para se desenvolver num novo ciclo (GOUGEON, 2011; HSUEH *et al.*, 2015; MATSUDA *et al.*, 2012; OKTEM; URMAN, 2010).

#### **1.4. Sinalização da AFI**

AAFI vem sendo estudada nos últimos anos e cada vez mais mecanismos moleculares parecem estar envolvidos. A via Hippo, o Hormônio Anti-Mülleriano e o PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*) exercem uma função inibitória sobre o recrutamento de folículos primordiais para AFI, ao passo que fatores de crescimento e alterações estruturais do estroma parecem ativar vias de sinalização que promovem crescimento e proliferação celular. A seguir, serão discutidas algumas dessas vias de sinalização (GOUGEON, 2011; GROSBOIS; DEVOS; DEMEESTERE, 2020; HSUEH *et al.*, 2015; JOHN *et al.*, 2008; NILSSON; ROGERS; SKINNER, 2007).

- Via Hippo e Arcabouço Estrutural

A via e sinalização Hippo é um conservado e bem conhecido mecanismo de regulação estrutural de tecidos e órgãos, sendo modulado por alterações que ocorram a nível de citoesqueleto e/ou matriz extracelular. Ativada a nível basal, a via hippo atua impedindo a transcrição de genes comprometidos com o ciclo celular, sendo um importante controlador tumoral. Quando ocorre rearranjo dos filamentos de actina, seja por lesões, remodelação ou alterações fisiológicas no gradiente de densidade tecidual, a via hippo é desativada, permitindo a transcrição de vários genes que promovem proliferação e diferenciação celular (MENG; MOROISHI; GUAN, 2016).

Muitas hipóteses têm sido levantadas acerca do papel da via hippo na AFI fisiológica, uma vez que a localização e rigidez do estroma circundante pode ter alguma relação ou até mesmo, ser determinante de quais folículos do *Pool* de reserva ovariana iniciarão o seu desenvolvimento enquanto outros devem permanecer em latência (CLARK *et al.*, 2022; GROSOIS; DEMEESTERE, 2018). A fragmentação ovariana *in situ* vem sendo utilizada como estratégia para a promoção de ativação e crescimento folicular de pacientes com Insuficiência Ovariana, e a via hippo é a principal responsável por esta ativação mediada por rompimento intencional do tecido (KAWAMURA *et al.*, 2013).

- O AMH Mantém o *Pool* de Reserva

O Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) é um regulador da população folicular ovariana pela inibição da AFI. O AMH é liberado pelas CG de folículos em crescimento (primários até pré-antrais) e pode ser o mais importante fator inibitório de sinalização parácrina intra-ovariana que regula o *pool* de reserva (MOOLHUIJSEN; VISSER, 2020; WEENEN *et al.*, 2004a).

A dosagem sérica do AMH vem sendo utilizada, com algum grau de predictibilidade, como indicador da extensão do pool de reserva ovariana. A liberação do hormônio sofre pouca variação ao longo da vida e permanece dentro de uma faixa basal até cerca de 30 anos de idade, quando sofre uma redução importante dos seus níveis séricos. A principal hipótese para esta redução é que um grupo maior de folículos primordiais deve ser recrutado, de modo a compensar a menor qualidade folicular por consequência da idade da mulher (PANKHURST, 2017).

- Via PI3K | AKT – O Centro da AFI

A relação da via da PI3K (do inglês *phosphoinositide 3-kinases*) (Figura 3) com o processo de AFI vem sendo estudado há pelo menos três décadas e seu papel é crucial na expressão de genes relacionados ao crescimento, proliferação e controle anti-apoptótico.

A ativação da via da PI3K nos folículos ocorre mediante a ligação do KIT-ligante liberado pelas CG ao c-Kit (receptor KIT) na superfície do ovócito primordial. A fosforilação

das tirosinas na porção citosólica do c-Kit recruta as subunidades p85 e p110 da PI3K, e a principal função do heterodímero é a fosforilação da proteína de membrana PIP2 (fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato). A PDK1 (do inglês *Phosphoinositide-dependent kinase-1*) é recrutada e ativada graças à ação de PIP3, e é responsável pela ativação de AKT (Proteína Quinase B) via fosforilação. AKT possui vários alvos nucleares e citoplasmáticos, podendo ser considerado o efetor central da via PI3K no gatilho de iniciação da AFI (MANNING; TOKER, 2017).

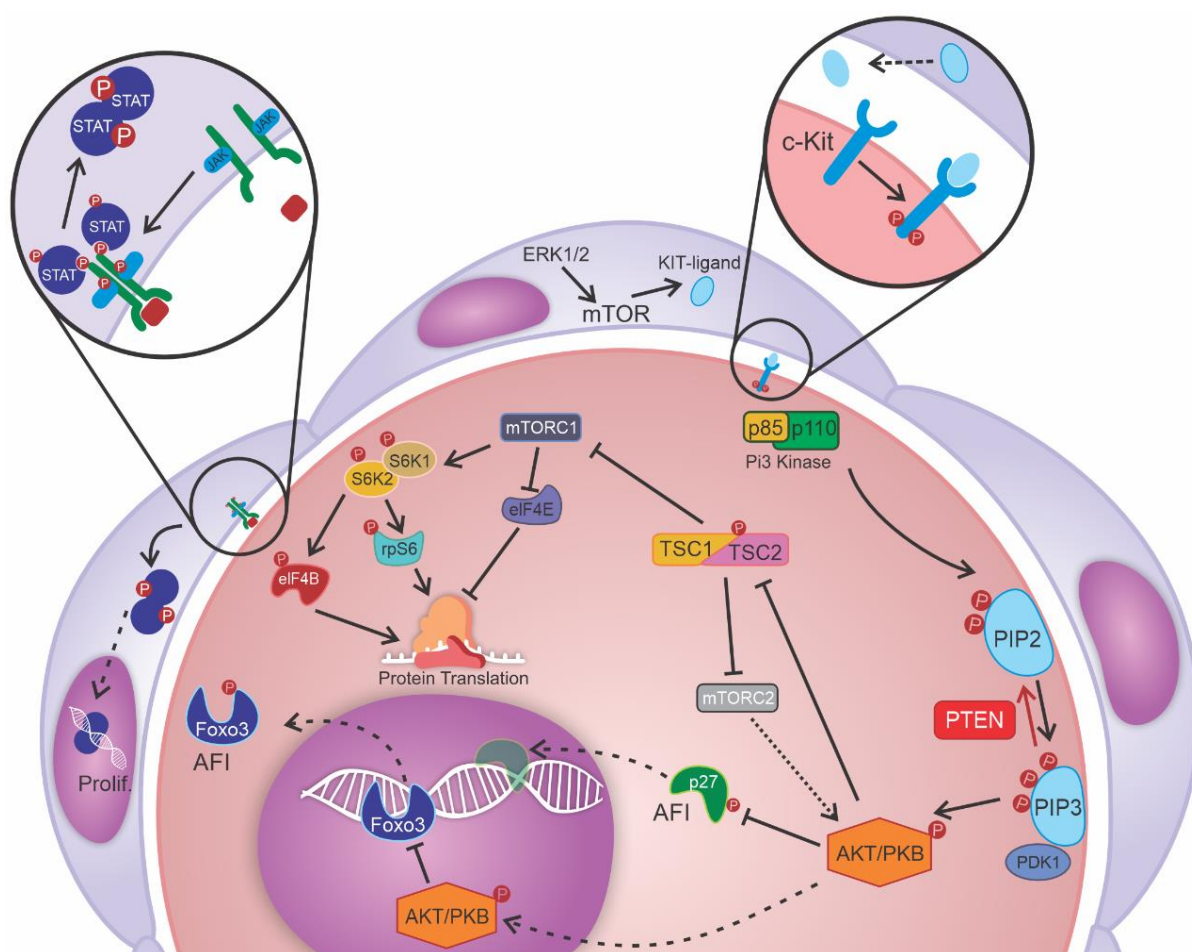


Figura 3 - Sinalização Intracelular da Ativação Folicular Inicial (AFI)

Legenda: Representação de vias de sinalização intracelular envolvidas. JAK-STAT pathway representado na célula da granulosa e ênfase à lateral esquerda. Via de Ativação da PI3K, inicia-se com a liberação do KIT-ligante pelas células da granulosa (superior) e sua ligação no receptor c-KIT da membrana do oócito (ênfase à direita). PTEN exerce ação inibitória reconvertendo PIP3 em PIP2 (seta vermelha), interrompendo toda a cascata de sinalização iniciada por PI3K. Linha tracejada indicam translocação. Fonte: Imagem do autor (2023)

A via da PI3K é constitutivamente inibida pela ação de PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*) que reconverte PIP3 em PIP2, impedido o recrutamento de PDK1 e consequente fosforilação de AKT. Alguns estudos demonstraram que a ativação de PI3K



associada à inibição farmacológica ou ausência de PTEN (em camundongos *knockout*) promove o recrutamento massivo de folículos primordiais (LI *et al.*, 2010).

- AKT – Foxo3

Ao ser fosforilada, AKT migra para o núcleo e inibe a ação de Foxo3 (*Forkhead Box Protein O3A*), um fator de transcrição que, quando ativo, se liga ao DNA e impede a transcrição de genes de crescimento e proliferação. A fosforilação de Foxo3 por AKT resulta na sua extrusão do núcleo e consequente expressão dos genes regulados pela proteína (JOHN *et al.*, 2008).

- AKT – mTOR

O complexo TSC1/2 (do inglês *Tuberous Sclerosis Complexes 1/2*) é outro importante alvo da AKT no citoplasma do oócito. A fosforilação de TSC2 leva à desestabilização com o complexo TSC1/2 que perde a atividade inibitória sobre mTORC1 (do inglês *mamalian Target Of Rapamycin Complex 1*). Os complexos mTORC1 e mTORC2 são importantes reguladores que, quando ativados, promovem síntese proteica, crescimento e proliferação celular e a sua desregulação pode levar ao surgimento de tumores e outras doenças ligadas ao metabolismo (HUANG; MANNING, 2008).

A perda da ação inibitória de TSC1/2 sobre mTORC1 resulta na fosforilação das kinases ribossomais S6 (S6K1 e S6K2) e eIF4E (do inglês *eukaryotic translation initialization factor 4E* ao passo que mTORC2 ainda fosforila AKT, numa espécie de *feedback* positivo. As S6K têm como alvo a eIF4B e S6 ribossomal, que, quando fosforiladas, promovem a tradução de RNAs mensageiros. A proteína eIF4E se encontra na região cap de mRNAs e funciona como acoplador das proteínas 4E-BP1 e 4E-BP2 (do inglês *eIF4E-binding proteins 1 and 2*), deste modo, há inibição de tradução pelos ribossomos. Uma vez que as 4E-BPs são fosforiladas por mTORC1, há uma separação de eIF4E, liberando o sítio de ligação ribossomal. Assim, ambos os alvos *downstream* de mTORC1 nos oócitos são reguladores de expressão genica a nível da tradução de mRNAs (GHEZELAYAGH *et al.*, 2022; HUANG; MANNING, 2008; MCLAUGHLIN *et al.*, 2011).

- AKT – p27/p21

As proteínas p27Kip1 e p21Cip1, quando em atividade, são transportadas ao núcleo e exercem função de manutenção da célula em G1. A fosforilação por AKT retém estes reguladores no citoplasma impedindo a formação dos complexos ciclina-CDK (do inglês *ciclin dependent kinase*). Assim, a ação direta de AKT em p27 e p21 no oócito primordial leva ao comprometimento com o ciclo celular (MAIDARTI; ANDERSON; TELFER, 2020).

- Outras Vias de Sinalização

Nos últimos anos, a relação de algumas outras vias de sinalização com o processo de AFI tem sido investigada, destacando a importância das interações intercelulares, com destaque nas CG. A sinalização por membros da superfamília TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) com ação intermediada por SMAD2/3, assim como a via de JAK/STAT (*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*), ambos ocorrendo em CG, mediam o processo de proliferação celular e transição primordial/primária (Figura 4). A sinalização por MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) também tem papel no recrutamento e AFI (GRANADOS-APARICI *et al.*, 2019; GROSBOIS; DEVOS; DEMEESTERE, 2020; ROSAIRO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2018).

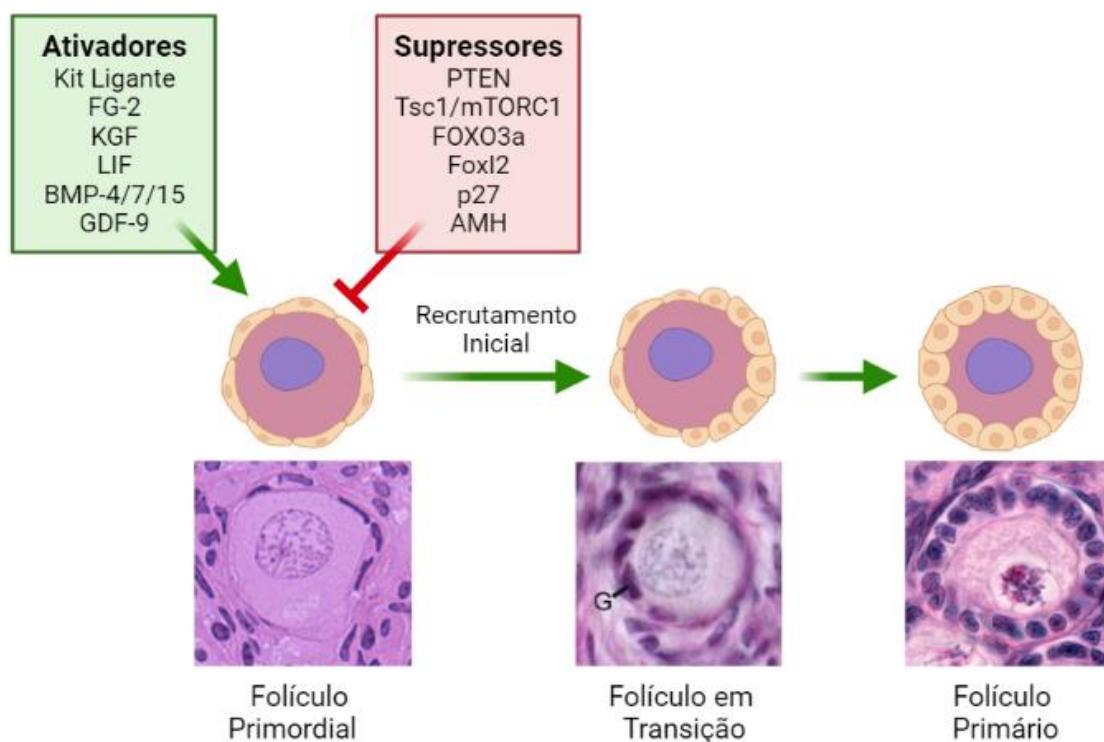


Figura 4 – Sinalizações Envolvidas na Ativação Folicular Inicial (AFI)

Legenda: Moléculas, fatores de crescimento, hormônios e demais sinalizadores inter e intracelulares envolvidos na regulação do recrutamento folicular inicial. Fonte: Imagem do autor (2023).

A intensa atividade ovariana que envolve recrutamento, crescimento, atresia e ovulação não pode ser compreendida como um conjunto de eventos isolados, mas que se conectam, inclusive por regulação mútua. O extenso elenco de sinalizações parácrinas, autócrinas e justácrinas envolvido no processo de AFI se relaciona com o arcabouço ovariano e, mais que isso, é influenciado intrinsecamente por ele.

É fundamental a compreensão do ambiente fisiológico no qual os folículos iniciam e completam o seu desenvolvimento. Os efeitos gonadotóxicos de origem iatrogênica muito frequentemente se dão pelo comprometimento direto ou indireto de ao menos um dos

mecanismos de sinalização que participam da AFI. Além disso, muitas das intervenções atualmente propostas para a preservação da fertilidade feminina envolvem a modulação (ativação/inibição) desses processos moleculares direta ou indiretamente (MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014; SUN *et al.*, 2015).

### **1.5. Ativação Folicular *in vitro* (AIV)**

Em condições fisiológicas, a AFI é um processo biológico que dura até quatro meses para se completar. Propor uma redução desse tempo para uma ou duas semanas de cultivo é uma empreitada, no mínimo, ambiciosa, e muito ainda precisa ser feito. Trabalhos mais recentes têm buscado prover condições físicas e bioquímicas que sustentem a manutenção de tecidos ovarianos em cultivo por até duas semanas, ainda assim, para a utilização em um sistema de cultivo *multistep* é necessário que os folículos recebam estímulos para seu crescimento até que tenham, pelo menos duas ou mais camadas de células da granulosa, viabilizando o seu isolamento e crescimento *in vitro* (EPPIG; TELFER, 1993; HERTA; LOLICATO; SMITZ, 2018; ROY; TREACY, 1993).

Tendo em vista que desregulações da via PI3K são os principais mecanismos moleculares que levam à ativação folicular global, é razoável que os principais alvos para a intervenções farmacológicas visando a AIV sejam os componentes desta via, por ativação direta ou por bloqueio dos intermediários inibitórios (DE FELICI; KLINGER, 2021; MAKKER; GOEL; MAHDI, 2014; SUN *et al.*, 2015).

O papel de PTEN enquanto um fator de regulação central da AFI foi primeiramente demonstrado pela ablação oócito-específica da proteína, onde foi observada a ocorrência de fosforilação massiva de AKT e consequente extrusão nuclear de Foxo3 em folículos primordiais de tecido ovariano murino (JOHN *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2008). Desde então, a inibição de PTEN, eventualmente associada à ativação de PI3K também por via farmacológica, se tornou uma estratégia recorrente na busca por um sistema capaz de promover a AFI em um curto tempo de cultivo (CHENG *et al.*, 2015; GROSOBOIS; DEVOS; DEMEESTERE, 2020).

O efeito dos compostos bisperoxovanadium e das suas modificações (ex. bpV(bipy); bpV(phen); bpV(pic) e bpV(HOpic)) na inibição de PTEN, foram descritos no início dos anos 2000 (SCHMID *et al.*, 2004). A utilização desses compostos vem sendo amplamente estudada em diversos tecidos e células, em intervenções onde o crescimento e/ou proliferação celular podem ser vantajosos, como em processos de regeneração tecidual (PULIDO, 2018). No entanto, é fundamental a compreensão dos efeitos sistêmicos que a modulação desta fosfatase pode promover.

Ao interagir com o sítio catalítico de PTEN, os compostos bpv promovem a inibição da sua atividade catalítica, provavelmente ao induzir alterações conformacionais e,

possivelmente, por efeitos alostéricos onde a ligação em um sítio (o sítio ativo) afeta a função da enzima em outro sítio. À medida que a atividade da fosfatase do PTEN é inibida, a enzima é menos eficaz na desfosforilação do PIP3, levando ao acúmulo de PIP3 na célula e à regulação positiva da via PI3K.

Ao utilizar 100 $\mu$ M de Dipotassium Bisperoxo (picolinato) oxovanadate V (bpV(pic)), Li et al. (2010) demonstraram pela primeira vez, o potencial da inibição farmacológica de PTEN para promoção de ativação folicular *in vitro* e em 2014, McLaughlin et al. foram capazes de ativar folículos humanos *in vitro* com o mesmo fármaco que evoluíram até o estágio secundário de desenvolvimento, no entanto, com comprometimento da capacidade de sobrevivência quando isolados.

Uma forma análoga do bpV(pic), o Dipotassium Bisperoxo (5-hydroxypyridine-2-carboxyl) oxovanadate V (bpV(HOpic)) vem sendo mais frequentemente utilizada para este fim, pois promove o aumento das taxas de AFI em concentrações de até 1 $\mu$ M. Este aumento está, eventualmente, associado a danos estruturais e moleculares ou comprometimento da capacidade de crescimento folicular, e estes efeitos parecem ter relação direta com as doses utilizadas e/ou tempos de exposição (ADIB; VALOJERDI; ALIKHANI, 2019; MAIDARTI *et al.*, 2019; RAFFEL *et al.*, 2019).

Para além, pouco se sabe sobre a ação desses fármacos no estroma do córtex ovariano, tanto na preservação das células que o compõem quanto na manutenção do arcabouço estrutural do tecido. Dada a íntima relação das células foliculares com o ambiente ovariano, é fundamental a otimização do uso dos inibidores de PTEN para se preservar, tanto quanto possível, folículos e estroma ovariano (COURTNEY B. BERKHOLTZ; LONNIE D. SHEA; TERESA K. WOODRUFF, 2006; GROSBOIS *et al.*, 2023).

## 1.6. Modelo Experimental

Dado o íntimo compartilhamento de características fisiológicas, histológicas e anatômicas entre o sistema reprodutor de humanos com primatas não humanos, ovinos e bovinos, pesquisas realizadas com estes modelos podem trazer importantes *insights* na pesquisa em fertilidade humana. Além disso, frequentemente, avanços importantes na área da fertilidade se dão pela sua aplicabilidade na prática veterinária e vice-versa (BAERWALD, 2009).

A fisiologia da foliculogênese bovina é muito semelhante à de humanos, inclusive no tempo de ativação folicular inicial. Estas semelhanças podem ser observadas, ainda, a nível anatômico, já que o tamanho, formato e rigidez do ovário bovino se assemelham aos das gônadas de mulheres, tornando-o um dos modelos mais apropriados para se estudar a estrutura e função ovariana prospectando aplicações clínicas. Estes fatores, associados à maior disponibilidade de ovários bovinos em frigoríficos, tornam este modelo adequado para

a realização de estudos preliminares sobre a IVA com potencial de futura extrapolação para a pesquisa em modelo humano.

## 2. JUSTIFICATIVA

A ativação da Akt promove processos celulares essenciais para o crescimento folicular, incluindo aumento da sobrevivência celular, proliferação e resistência à apoptose. As células da granulosa que circundam o ovócito sofrem alterações na morfologia e função, passando do formato escamoso para o cuboidal, indicando a transição dos folículos primordiais para os primários. Ainda, a ativação da via PI3K facilita o início da foliculogênese, promovendo o crescimento e desenvolvimento do folículo primário. A ativação da via PI3K nos folículos ocorre através da ligação do KIT ligante liberado pelas células da granulosa ao c-Kit (receptor KIT) na superfície do ovócito primordial. Este processo facilita os estágios subsequentes do desenvolvimento folicular, incluindo a formação de folículos secundários e antrais.

Dada a abundância de estudos utilizando bpV(HOpic) para a promoção de ativação folicular inicial, pouco ainda se sabe sobre o real potencial de utilização do seu análogo, o bpV(pic) em cultivo de córtex ovariano de mamíferos superiores, sobretudo quanto à citotoxicidade versus a capacidade de promover o recrutamento de folículos primordiais. Utilizando células NIH3T3, Schmid et al. (2004) observaram uma ação citotóxica dos compostos Bisperoxovanadium em 100 $\mu$ M por apenas duas horas de exposição. Curiosamente, esta é a concentração do fármaco empregada em trabalhos que utilizam o bpV(pic) e com tempos de exposição de, pelo menos, 24 horas.

O grau de citotoxicidade de determinados componentes químicos é diretamente relacionado à sua concentração. Num contexto de cultivo tecidual há, naturalmente, maior sensibilidade associada à perda do ambiente e trocas fisiológicas. Desta forma, são necessários estudos de otimização das condições de tratamentos de qualquer natureza aos quais os tecidos cultivados serão submetidos.

Para além, dados obtidos de experimentos que utilizam o bpV(HOpic) podem resultar em diferenças de citotoxicidade e/ou eficiência pois, mesmo pequenas alterações estruturais das moléculas administradas podem implicar em desfecho diferente. Assim, este trabalho se propõe a avaliar, os efeitos do inibidor de PTEN, bpV(pic), sobre tecidos ovarianos cultivados *in vitro* em diferentes concentrações e tempos de exposição fármaco, avaliando as taxas de AFI e danos sobre os folículos, bem como às células e matriz extracelular do estroma cultivado.

### 3. OBJETIVOS



### **3.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho tem o objetivo de analisar os efeitos da exposição do tecido de córtex ovariano bovino ao fármaco bpV(pic) em diferentes concentrações e tempos de exposição, avaliando a ocorrência de ativação folicular inicial, degeneração folicular e qualidade do estroma tecidual.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar a Ativação Folicular Inicial por classificação histomorfométrica associada à marcação de imuno-histoquímica (IHQ) da proteína FOXO3;
- Quantificar a apoptose folicular por marcação de IHQ da Caspase-3 Clivada;
- Quantificar a apoptose no estroma do tecido ovariano pela área marcada por IHQ da Caspase-3 Clivada;
- Caracterizar a espessura das fibras colágenas do estroma através de marcação por Picrossírius Red (PSR) sob microscopia de luz polarizada.

## 4. HIPÓTESES

- a. O tratamento com bpV(pic) promoverá aumento das taxas de ativação folicular em tecido de córtex ovariano bovino em cultivo *in vitro*;
- b. O tratamento com bpV apresentará citotoxicidade variável aos folículos ovarianos nas diferentes concentrações e
- c. O tratamento com bpV em concentrações mais baixas não afetará a qualidade do tecido cultivado nas células estromais nem na matriz extracelular.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

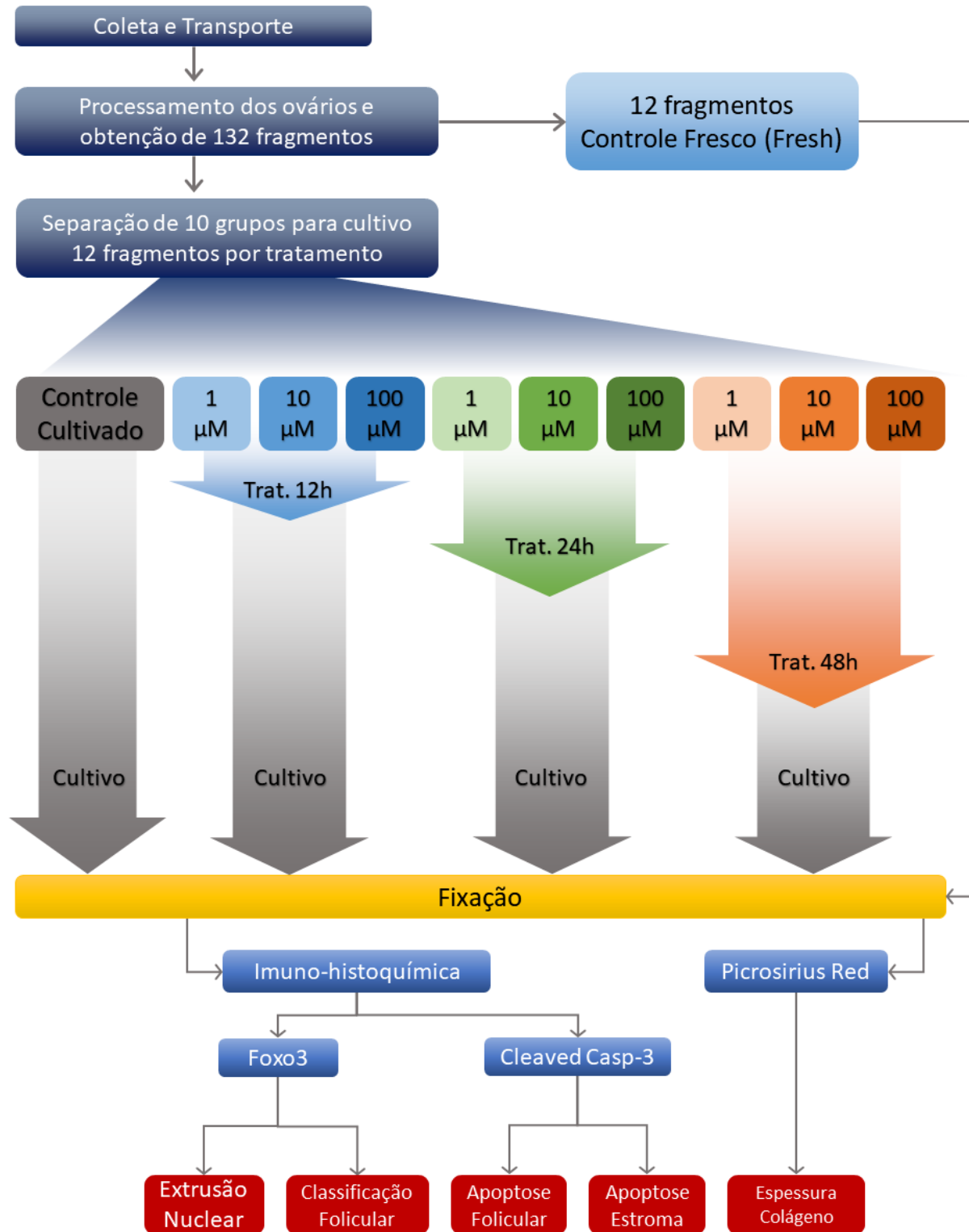


Figura 5 – Desenho Experimental

### 5.1. Aspectos Éticos

O estudo foi conduzido seguindo estritamente as recomendações do ARRIVE guideline (DU SERT *et al.*, 2020) e a sua execução foi aprovada pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

### 5.2. Grupos Experimentais e n amostral

O estudo foi realizado pela comparação de 11 grupos experimentais (Figura 5) divididos em:

- um grupo “Controle Fresco” (Fresh), cujos fragmentos foram fixados imediatamente após o processamento dos ovários;
- um grupo “Controle Cultivado” (Cult.), cultivado por seis dias na ausência do inibidor de PTEN, e
- nove grupos “Tratados”, submetidos a três diferentes concentrações de bpV(pic) e, para cada concentração, três diferentes tempos de exposição ao fármaco.

Para análises de contagem e classificação, foi definido o número mínimo de 100 folículos em cada grupo, podendo estar distribuídos entre dois e quatro fragmentos, dada a grande variação do número de folículos entre fragmentos. As análises de quantificação de marcação do estroma foram realizadas em três fragmentos diferentes para cada grupo, independentemente da quantidade de folículos presentes.

### 5.3. Composição dos Meios

- a) Meio de Transporte: Solução salina 0,9%, contendo antibióticos penicilina G (Ref. P3032 - Sigma-Aldrich, EUA) e estreptomicina (Ref. S9137 - Sigma-Aldrich, EUA), ambos na concentração de 100µg/mL;
- b) Meio de Lavagem: Minimum Eagle Medium acrescido de 25mM de HEPES (MEM-HEPES) (Ref. 12360038 - Thermo Fisher Scientific, USA) e antibióticos penicilina G e estreptomicina, ambos na concentração de 100µg/mL;
- c) Meio de Cultivo: Minimum Eagle Medium com modificação alpha (α-MEM) (Ref. 11900024 - Thermo Fisher Scientific, USA), suplementado com 1% de albumina sérica bovina (BSA) (Ref. A9430 – Sigma-Aldrich, USA), antibióticos penicilina e estreptomicina, ambos na concentração de 100µg/mL, ITS – (insulina 10 µg/mL, transferrina 5,5 µg/mL e selênio 4,0ng/mL) (LifeTechnologies Inc., Grand Island, NY, USA), 3 mM de L-glutamina (Ref. G8540 – Sigma-Aldrich, USA) e 2mM de hipoxantina (Ref. H9377 – Sigma-Aldrich, USA);

- d) Meio de Inibição: Composição similar ao Meio de Cultivo, acrescido do inibidor de PTEN bpV(pic) (Ref. SML0885 – Sigma-Aldrich, USA) nas diferentes concentrações de 1, 10 ou 100 $\mu$ M.

Todos os meios foram preparados no dia anterior ao início dos experimentos e armazenados a 4°C ou condicionados em incubadora para ajuste da temperatura e pH.

#### 5.4. Coleta e Transporte do Material Biológico

Os ovários bovinos (n=40) utilizados ao longo dos experimentos foram obtidos em frigorífico na cidade de Morro Agúdo, São Paulo – Brasil, e a coleta foi feita imediatamente após o abate dos animais. Os ovários foram armazenados em recipiente com isolamento térmico e imersos em Meio de Transporte (Figura 6).

Todos as soluções utilizadas nos procedimentos entre a coleta e o início da fragmentação estiveram refrigeradas a  $\approx$ 4°C e mantidas nesta faixa de temperatura com gelox.

Os ovários foram transportados até o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, lavados sequencialmente em água de injeção, álcool 70% por 4 segundos, uma segunda vez em água de injeção e, por fim, reservados em Meio de Transporte.

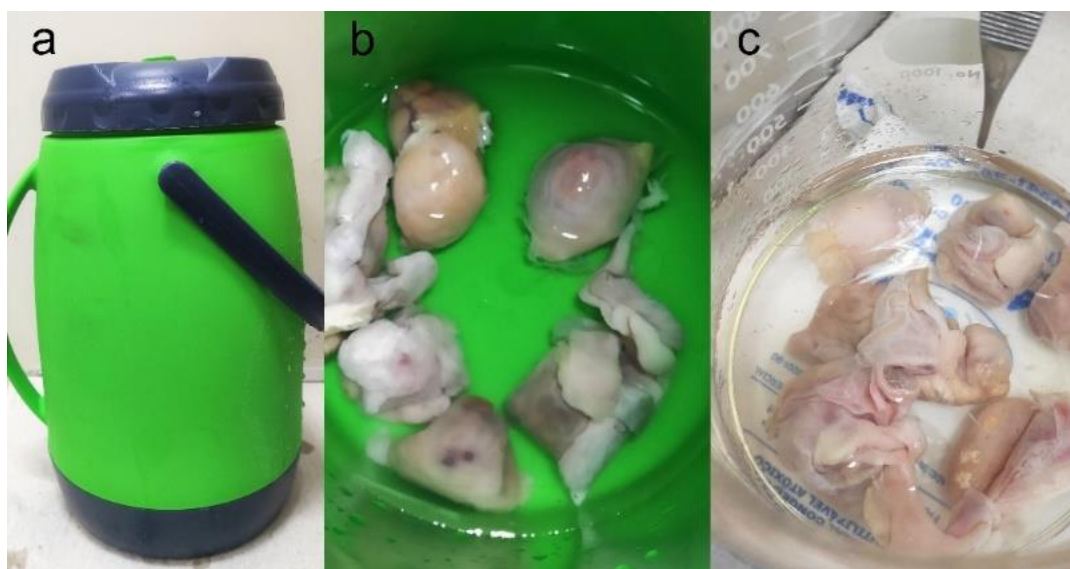


Figura 6 – Transporte e Lavagens

Legenda: Os ovários são transportados em recipiente térmico (a e b) e lavados com água de injeção e reservados em soro fisiológico contendo antibióticos sobre gelo (c).

#### 5.5. Processamento e Fragmentação

O córtex dos ovários foi dissecado utilizando bisturi cirúrgico. Foram produzidos cortes de aproximadamente 1,5cm<sup>2</sup>, sendo reservados em placas de Petri sob refrigeração contendo meio de lavagem (Figura 7 a, b e c).

Com o auxílio do aparelho *Thomas Stadie-Riggs Tissue Slicer* (Thomas Scientific®, NJ, USA) foram realizadas dissecções de 0,5 mm de espessura da porção mais cortical do ovário (Figura 7 d, e, f).

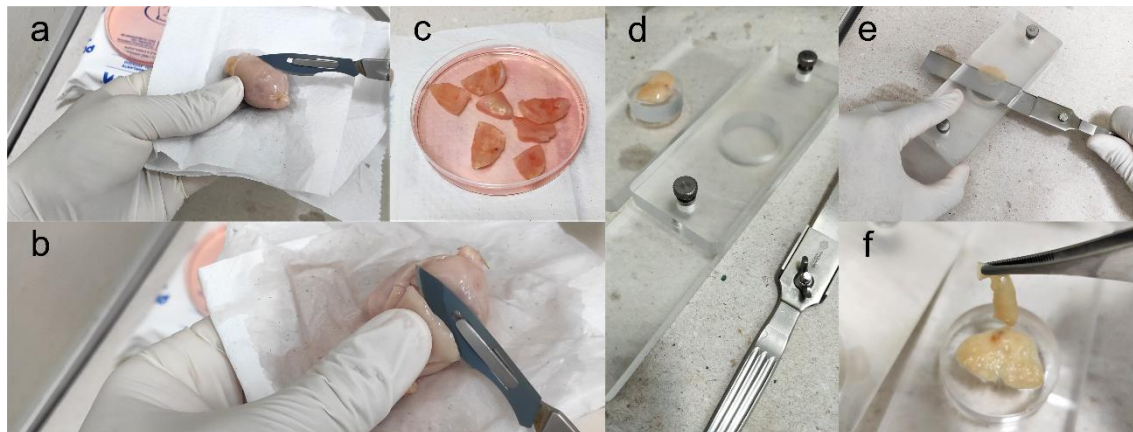


Figura 7 – Dissecção e fatiamento do córtex ovariano

Legenda: Corte (a, b) e dissecção do córtex ovariano. Os cortes medindo cerca de 1,5cm<sup>2</sup> (c) são posicionados no Tissue Slicer (d, e) para a obtenção de fragmentos medindo 0,5 mm de espessura (f)

A seleção dos fragmentos foi realizada sob estereomicroscópio em aumento de 40x (Olympus, Tóquio, Japão) para identificação dos fragmentos com maior número de folículos visíveis (CHAMBERS *et al.*, 2010). Os fragmentos medindo  $\approx 5 \times 5 \times 0,5$  mm foram seccionados manualmente com auxílio de bisturi. Folículos em estágio avançado de desenvolvimento foram removidos manualmente com agulha de insulina (Figura 8).

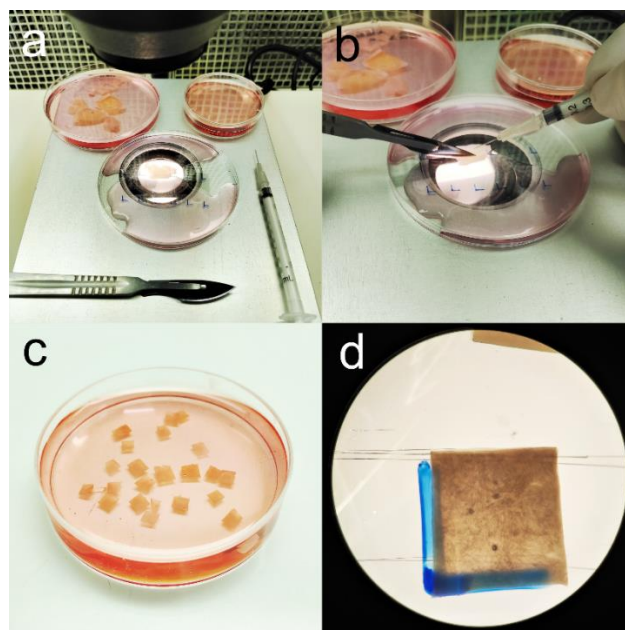


Figura 8 – Fragmentação do córtex ovariano

Legenda: Com auxílio de um bisturi, agulha de insulina e placas de petri com marcações em sua base (a), as peças de cortex medindo 0,5mm de espessura são cortadas em pequenos quadrados de 5x5mm (b, c), a seleção dos fragmentos e remoção de folículos maiores é feita em estereomicroscópio (d).



### 5.6. Inibição de PTEN *in vitro* e Cultivo Tecidual

As incubações foram realizadas em estufa úmida a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> (SUTTON *et al.*, 2021). Os fragmentos foram condicionados na incubadora por duas horas em placa de Petri contendo Meio de Cultivo, até a transferência para as placas de inibição de PTEN (Figura 9). Um grupo de 12 fragmentos foi fixado para o Controle Fresco.

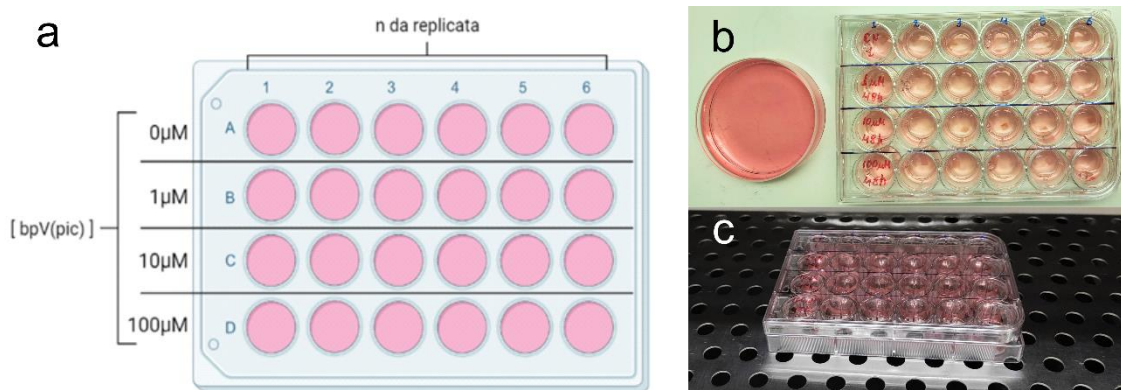


Figura 9 – Placas de tratamento e cultivo

Demonstração esquemática da distribuição dos fragmentos na placa de 24 poços (a), cada uma das fileiras A, B, C e D é preenchida com 1mL de meio de inibição nas diferentes concentrações.

A etapa de inibição *in vitro* de PTEN é procedida pela exposição dos fragmentos a 1, 10 ou 100µM do fármaco Bisperoxovanadium Dipotassium (picolinato) (bpV(pic)) e para cada concentração, 12 fragmentos foram tratados por 12, 24 e 48 horas. Para o controle do cultivo, um grupo de 12 fragmentos foi incubado em meio sem a presença do bpV(pic).

Após o tratamento, os poços das placas foram esvaziados, lavados com 300µL do meio de cultivo e novamente preenchidos com e 1000µL do mesmo meio. Foram realizadas trocas diárias de 50% do meio previamente condicionado à temperatura e pH de incubação até completarem sete dias de cultivo (SUTTON *et al.*, 2021).

### 5.7. Fixação e Histotecnologia

Ao fim do cultivo, os fragmentos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 2 horas e imersos em álcool etílico 70% para hidratação, onde permaneceram armazenados em temperatura ambiente.

Para a inclusão em parafina, os fragmentos foram inicialmente desidratados em banhos consecutivos em álcool 80%, 95% e 100%, submersos na parafina aquecida *overnight*, em seguida, os fragmentos foram emblocados em cassetes plásticos para corte histológico.

Utilizando micrótomo, foram feitas microdissecções de 5µm, posicionadas em lâminas de vidro silanizado em banho maria.

Considerando o diâmetro médio de 30-50 $\mu$ m dos folículos primordiais e primários, bem como o diâmetro do núcleo dos oócitos não superior a 15 $\mu$ m, foi estabelecido um intervalo de três secções, para a distribuição dos cortes nas lâminas, cada uma contendo de quatro a seis secções (Figura 10). Esta configuração visa a não contagem de um mesmo folículo em uma mesma análise histológica.

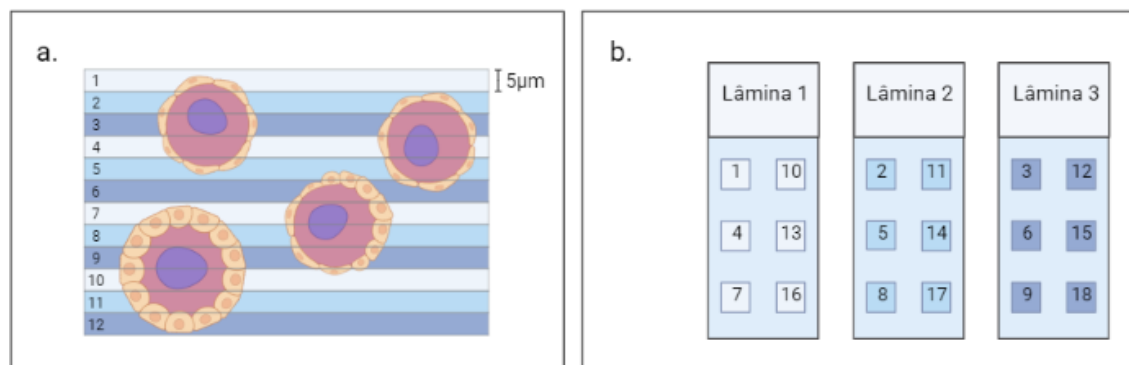


Figura 10 – Seccionamento e distribuição nas lâminas

Legenda: Demonstração esquemática da distribuição de cortes histológicos medindo 5 $\mu$ m de espessura. Os folículos se distribuem em diferentes alturas do fragmento (a) e os núcleos não se distribuem por mais que três cortes, assim, a distribuição nas lâminas com intervalos a cada suas secções garante a não contagem de um mesmo folículo em dois cortes de uma mesma lâmina

Visando a identificação prévia das amostras com maior número de folículos, foi utilizada coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). As amostras contendo o maior número de folículos foram utilizadas para as reações de imuno-histoquímica.

## 5.8. Imunoensaios

Para a reação de IHQ da Caspase-3 Clivada, foi utilizado o anticorpo primário *Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody* (Ref. #9661, Cell Signaling). Para a IHQ e Imunofluorescência (IF) da FOXO3 foi utilizado o anticorpo primário *FOXO3A Polyclonal Antibody* (Ref. # PA5-27145, Invitrogen). Os Anticorpos Secundários utilizados foram o *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)* (Ref. Ab205718, Abcam) para IHQ e *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)* (Ref. Ab150077, Abcam) para a IF.

### 5.8.1. IHQ - FOXO3 e Caspase-3 Clivada

Para a realização das reações de imuno-histoquímica as lâminas foram desparafinadas dois banhos em xilol por 15 min cada, seguido de cinco incubações de dois min em álcool para reidratação sendo três em álcool absoluto uma em álcool 95% e uma em álcool 70%. As lâminas foram lavadas, incubadas por dois minutos em água destilada e depois incubadas em tampão citrato em temperatura de fervura no banho maria por 10 minutos para recuperação antigênica.

Foi realizada uma incubação em solução de Peróxido de Hidrogênio 3% em metanol por 30 min para o bloqueio da peroxidase endógena seguida de 3 lavagens com água destilada e 3 lavagens em PBS por 5 min cada. Para o bloqueio de interações inespecíficas dos anticorpos foi feita a incubação das lâminas em PBS contendo 3% de detergente Triton e 2% de BSA por 30 minutos.

As lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C com cada uma das secções histológicas cobertas por solução PBS contendo 1% de BSA e anticorpo primário na proporção de 1:400. As lâminas passaram por 6 lavagens de 5 min em PBS e foram novamente incubadas por 1h a 4°C em solução PBS contendo 1% de BSA e o anticorpo secundário na proporção de 1:2000.

Após novas lavagens, as lâminas foram incubadas por 30 min protegidas da luz em solução PBS contendo 1mg/mL de 3,3' diaminobenzidina (DAB) e 0,01% de peróxido de hidrogênio para a reação de peroxidação. A reação foi interrompida por 3 lavagens de 5 minutos em PBS.

As lâminas foram incubadas em hematoxilina por 2 minutos para a contra coloração. A finalização das lâminas foi feita utilizando-se resina *permount* e posicionando-se uma lamínula sobre os tecidos a serem observados.

### 5.8.2. IF - FOXO3

Para a realização da técnica de IF foram utilizadas as mesmas etapas de desparafinização, hidratação, recuperação antigênica e bloqueio de interações inespecíficas citados anteriormente. Seguindo, foram realizadas duas lavagens em PBS, três lavagens em PBS + Glicina 0,1M e duas lavagens em PBS + BSA 2% por 10 e 30 segundos, respectivamente.

Em seguida, é realizada a incubação a 4°C com o anticorpo primário na concentração de 1:100 *overnight*. As lâminas são lavadas em PBS + BSA 1%, seguidas de outras cinco lavagens em PBS, seguindo para a incubação com o anticorpo secundário na concentração de 1:1000 em PBS + BSA 0,1% por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, lavagem em PBS por cinco minutos, com agitação por dois minutos.

Foi feita uma incubação por cinco minutos com o corante *sudan black* para redução de *background* fluorescente na visualização das lâminas.

Para a finalização das lâminas, foi aplicada a solução *antifading* contendo DAPI, e uma lamínula foi posicionada sobre os fragmentos para a análise em microscópio confocal. O armazenamento é feito em geladeira ou congelador.

### 5.9. Coloração com *PSR*

As lâminas foram desparafinadas, hidratadas como descrito previamente e foram coradas com hematoxilina por 8 min, lavadas em água corrente por 10 min e incubadas em solução de *PSR* por 1h. Após duas lavagens em solução 0,5% de ácido acético glacial e novamente desidratadas em três incubações em etanol 100%. Por fim, as lâminas foram limpas com xileno e finalizadas com o posicionamento de lamínulas com resina.

### 5.10. Aquisição de Imagens

#### 5.10.1. *IHQ* – *Contagem e Classificação Folicular*

Todas as lâminas obtidas pelos protocolos de *IHQ* foram escaneadas em sistema VS120 5.1, acoplado em microscópio Olympus BX61 (Olympus Corporation, Japão) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em objetiva de 40x, foram obtidas quatro ou cinco imagens por lâmina correspondendo ao número de cortes (Figura 11).

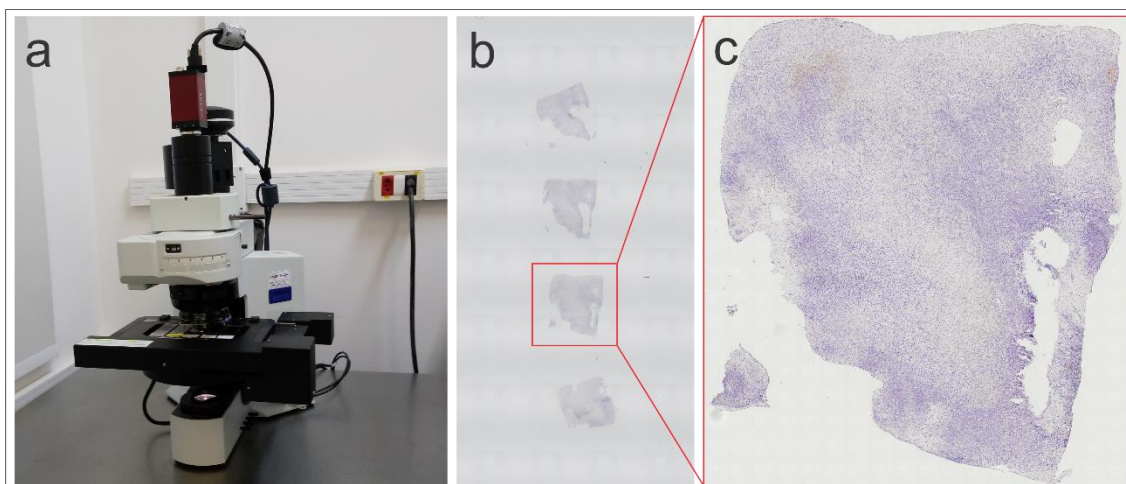


Figura 11 – Escaneamento de lâminas histológica

Legenda: Microscópio utilizado para aquisição das imagens (a). A lâmina é escaneada em sua totalidade assim como os cortes individualmente (b e c).

#### 5.10.2. *IHQ* – *Quantificação de Estroma Marcado*

Os campos analisados para a quantificação de estroma marcado pelo anticorpo 1º *Anti-Cleaved Caspase-3* tiveram medida fixa de 400x400µm e foram selecionados utilizando o software OlyVIA V. 4.1 (EVIDENT Technology Center, Europe) sem ajuste de brilho ou contraste em acordo ao seguinte protocolo:

- 1º Seleção das três melhores secções de cada lâmina (maior área de tecido e menor ocorrência de sobreposições).
- 2º Seleção sob menor magnificação de dois campos laterais inferior e superior e três campos aleatoriamente distribuídos no centro das imagens, totalizando 15 campos para cada uma das lâminas (fragmentos).

- 3º Os campos selecionados sob menor magnificação e que, quando vistos sob maior aumento, apresentavam áreas sem tecido, ocupadas por folículos ou com artefatos foram ajustados para posições adjacentes.
- 4º Os campos foram salvos em formato tif. para processamento posterior.

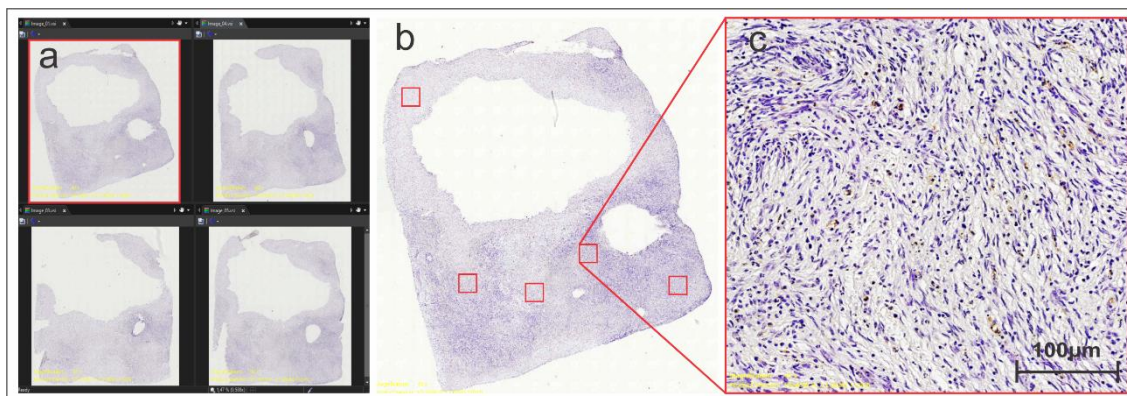


Figura 12 – Aquisição de imagens do estroma ovariano

Legenda: Demonstração das etapas de obtenção das imagens de estroma ovariano para quantificação de área marcada. Escolha das melhores secções para captura (a), posicionamento dos campos de captura (b) e imagem medindo 400x400μm (c).

### 5.10.3. Lâminas Coradas com PSR – Colágeno

As imagens das lâminas marcadas com PSR foram obtidas na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP em microscópio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Germany) acoplado a câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss, Germany) e utilizando o Software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Germany). Todos os campos tiveram medida fixa de 1795,34x1345,21μm, potência da luz ajustada em 50% e aquisição com tempo de exposição de 250,0ms. Cada campo foi posicionado sob luz óptica (para evitar áreas sem tecido ou com grandes folículos) e são feitas duas capturas, uma em luz óptica e outra sob filtro de polarização (Figura 13). Foram capturados 20 campos de cada uma das lâminas distribuídos aleatoriamente entre as secções.



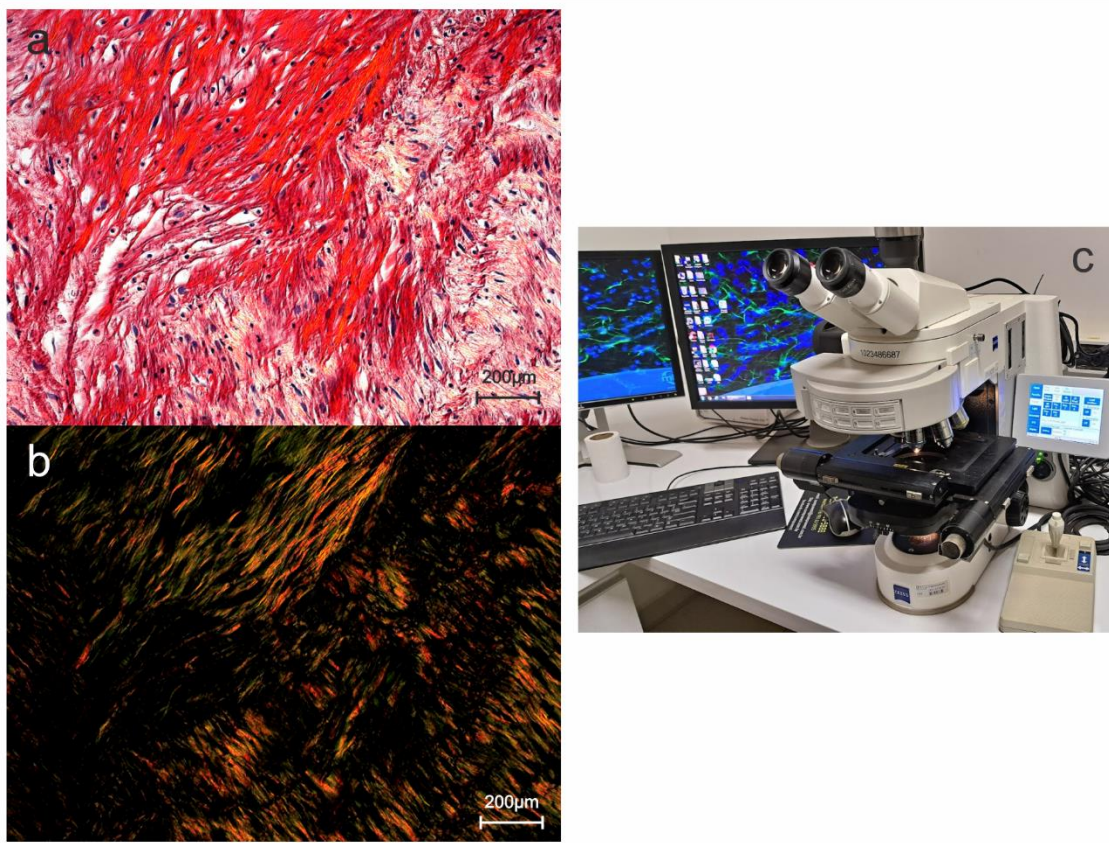


Figura 13 – Captura de imagens para análise de colágeno

Legenda: Fragmento de córtex ovariano cultivado corado com *Picrosirius red*. Mesmo campo capturado sob luz óptica (a) e com filtro de luz polarizada (b). Sistema de microscopia de luz polarizada (c).

### 5.11. Análise e Processamento de Imagens

Para as contagens e classificações foliculares utilizou-se o sistema OlyVIA V. 4.1 (EVIDENT Technology Center, Europe). Todas as secções escaneadas em cada lâmina foram percorridas em sua totalidade. Para leitura das imagens foi padronizado o ajuste de contraste na opção “Fixed Scaling” nos valores 130 Left e 230 Right (Figura 14).

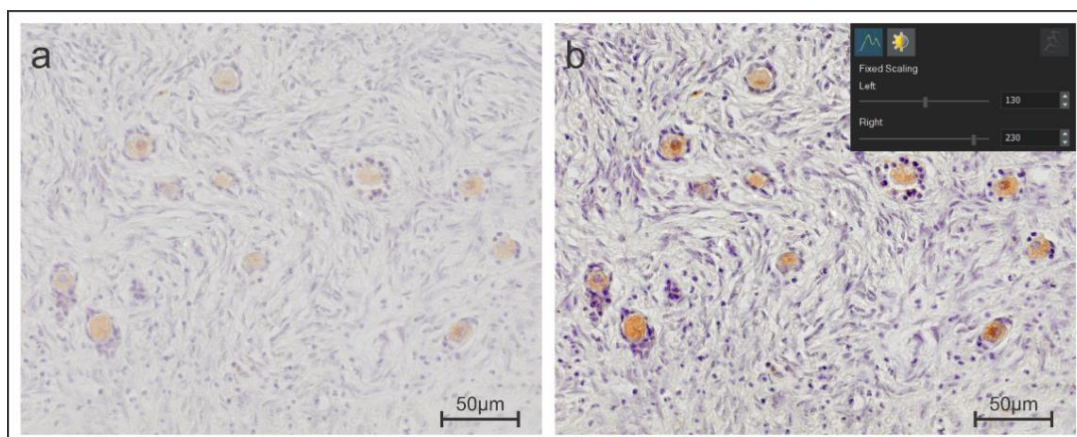


Figura 14 – Ajuste linear de brilho e contraste

Legenda: O mesmo campo visto antes (a) e após (b) o ajuste linear de brilho e contraste para melhor visualização das marcações de IHQ.

### 5.11.1. *IHQ FOXO3 – Classificação Folicular e Extrusão Nuclear de Foxo3*

As lâminas marcadas por IHQ para a proteína FOXO3 foram utilizados tanto para classificação histomorfométrica (dos estágios de desenvolvimento folicular) quanto para a avaliação de extrusão nuclear da Foxo3.

Critérios de classificação do estágio de desenvolvimento (Figura 17 a - b):

- Primordial – folículo com oócito circundado por uma monocamada pavimentosa de células da granulosa;
- Transitório – folículo com oócito circundado por uma monocamada de células da granulosa em ambos os formatos pavimentoso e cuboide;
- Primário – folículo com oócito circundado por uma monocamada de células cuboides e
- Secundário – folículo com oócito circundado por duas ou mais camada de células da granulosa em formato cuboide sem ocorrência de cavidade antral.

Critérios de classificação da extrusão nuclear de Foxo3 (Figura 17 a - b):

- Negativo (Foxo3-) – núcleo do oócito em coloração roxo-azulada e citoplasma marcado em marrom claro e
- Positivo (Foxo3+) – núcleo e citoplasma do oócito em coloração marrom-acastanhada, indicando marcação por DAB.

Os folículos com citoplasma colapsado, núcleo picnótico ou outras alterações morfológicas que indicam degeneração não foram contabilizados.

### 5.11.2. *IHQ Caspase-3 Clivada - Apoptose*

- Os folículos das lâminas marcadas por IHQ para a proteína Caspase-3 Clivada foram classificados enquanto:
- Normais/Vivos: ovócito não marcado E, no máximo, 40% de células da granulosa com marcação (Figura 18 a) ou
- Apoptóticos: ovócito marcado OU mais de 40% das células da granulosa marcadas (Figura 18 b).

### 5.11.3. *Quantificação de Apoptose no Estroma – IHQ*

A marcação das imagens de IHQ da Caspase-3 Clivada foi medida para a quantificação de área em apoptose do estroma através do software FIJI (ImageJ) (Figura 15). Utilizou-se a extensão “Colour Deconvolution” para a separação dos canais H (hematoxilina) e DAB em configurações padrão da ferramenta. A imagem resultante do canal DAB foi filtrada

com a ferramenta “Threshold” ajustada ao intervalo de 0 (min) a 190 (max), assim, pixels dentro de uma faixa de intensidade foram destacadas e, com a ferramenta “Measure”, a porcentagem de área marcada na imagem foi calculada. Para cada lâmina, 15 imagens foram analisadas, totalizando 45 imagens para cada grupo experimental.

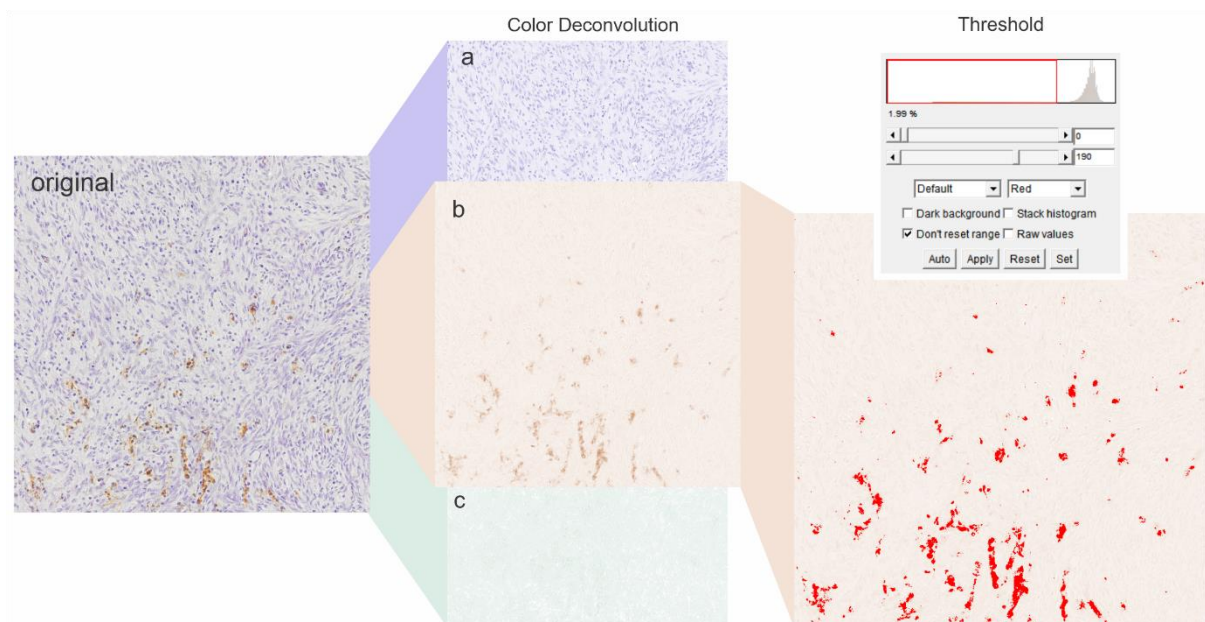


Figura 15 – Quantificação de apoptose do estroma ovariano

Legenda: Três canais de cores das imagens capturadas são separados, sendo hematoxilina (a), DAB (b) e background (c). A intensidade de cor marcada nos canais DAB (apoptose) é delimitada em um valor padrão para quantificação de área.

#### 5.11.4. Quantificação de Colágeno – PSR

As imagens das lâminas coradas com PSR e obtidas sob luz polarizada também foram processadas no software FIJI (ImageJ) para quantificação do colágeno (Figura 16). As diferentes cores da imagem, vermelho, amarelo e verde indicam espessura maior, intermediária ou menor das fibras colágenas, respectivamente. Para a separação e quantificação das fibras colágenas foi utilizado o seguinte protocolo:

- 1º Inicialmente, utilizou-se o macro “*Threshold Colour*” para separação dos pixels dentro de um intervalo, sendo 2-9 para canal vermelho, 10-38 para os canais laranja/amarelo e 24-135 para o canal verde (GROSBOIS *et al.*, 2023; OUNI *et al.*, 2020). Em todas as separações o threshold do brilho foi ajustado entre 30-255 para evitar a quantificação de áreas escuras.
- 2º As imagens resultantes são convertidas em imagens de 8-bits
- 3º Utiliza-se a Ferramenta “*Analyse Particles*” para se obter a área e porcentagem marcadas



4º O processo é repetido para cada uma das imagens para as três cores avaliadas, assim, foi elaborado um macro de automatização das etapas 2 e 3.

Somente foram incluídos nas análises estatísticas as imagens com marcação superior a 0,5% da área total. A Razão da composição de diferentes espessuras do colágeno foi calculada utilizando a fórmula: área marcada (vermelho OU amarelo OU verde) / área TOTAL marcada (vermelho + amarelo + verde).

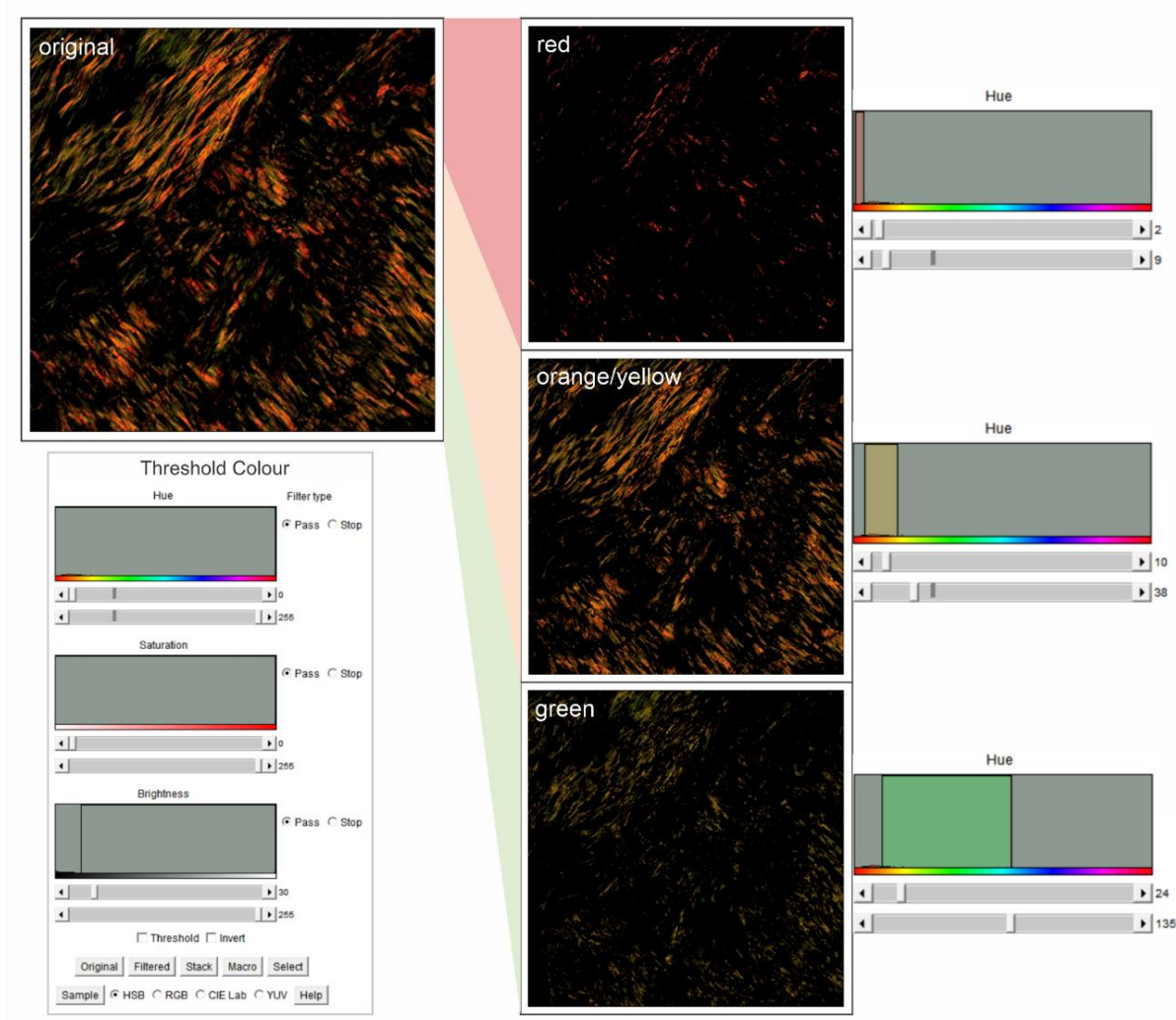


Figura 16 – Processamento das imagens de PSR em microscópio de luz polarizada

Legenda: Pixels da imagem capturada em microscópio de luz polarizada são separados em vermelho, amarelo/laranja e verde para medição da área de cada uma das cores.

## 5.12. Análises Estatísticas

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados, considerando as medidas de posição central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão, intervalo interquartil e valores mínimos e máximos).

Foram feitos gráficos de colunas para verificar a distribuição dos dados em cada grupo. Para a apresentação dos resultados de marcação da Caspase3-Clivada no estroma foi considerada uma transformação logarítmica.

Para verificar se existe uma diferença estatística variável entre os grupos estudados foi aplicada uma análise de variância. Uma análise de resíduos foi realizada para verificar se o modelo estatístico estava bem ajustado aos dados. As análises foram implementadas no programa SAS versão 9,4.

## 6. RESULTADOS

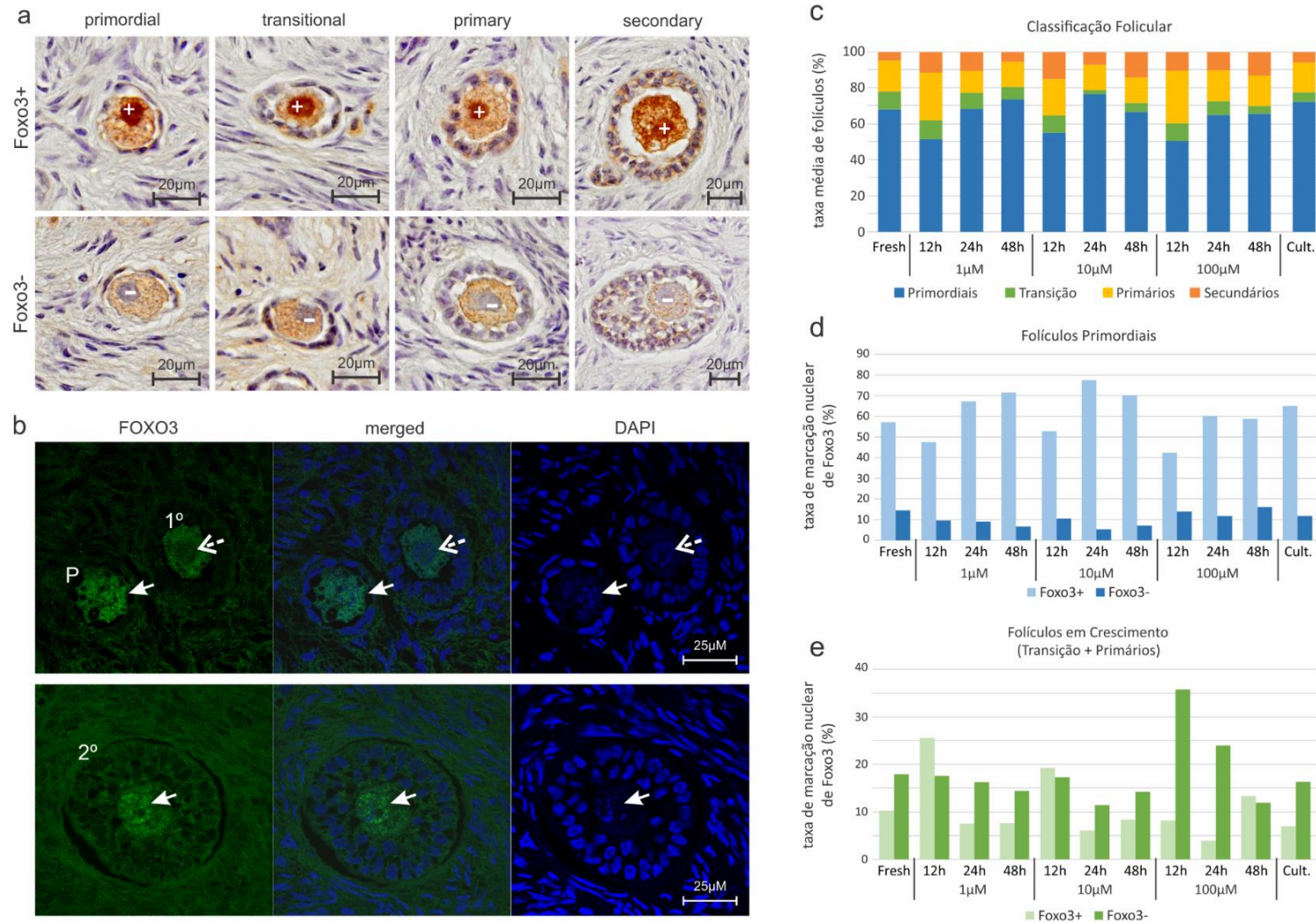


Figura 17 – Classificação folicular e imunolocalização de Foxo3

Legenda: Folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (a) com ou sem núcleo marcado para a Foxo3 (sinal de + e -, respectivamente). Em b é possível observar um folículo primordial (P) e secundário (2°) com marcação nuclear positiva para Foxo3 (seta contínua) enquanto um folículo primário (1°) apresenta extrusão nuclear de Foxo3 (seta tracejada). As taxas de desenvolvimento folicular (c) bem como de extrusão nuclear da Foxo3 em folículos primordiais (d) ou em crescimento (e) não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

### **6.1. Classificação morfológica de oócitos e extrusão nuclear de Foxo3**

Um total de 3.839 folículos foram classificados como primordiais, transicionais, primários ou secundários distribuídos em 11 grupos. Para quantificar a extrusão nuclear de Foxo3, excluímos os folículos secundários e foram avaliados 3.516 folículos ovarianos, mas não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhuma das variáveis, mesmo quando comparamos os grupos controle fresco e cultivado (Figura 17).

### **6.2. Apoptose folicular**

Um total de 4.379 folículos foram contados e classificados em lâminas de IHQ para Caspase3-Clivada. Não foram encontrados folículos apoptóticos entre no grupo controle fresco, enquanto os grupos tratados com bpV(pic) 1 e 10 $\mu$ M tiveram um aumento na morte folicular, mas não foram significativamente diferentes do controle cultivado. Por outro lado, os grupos tratados 12h/100 $\mu$ M e 48h/100 $\mu$ M apresentaram maiores taxas de atividade apoptótica (Figura 18).

### **6.3. Apoptose de células do estroma**

A quantificação da marcação no estroma por IHQ da Caspase-3-Clivada mostrou um aumento significativo no dano tecidual causado por altas concentrações de bpV(pic) (100 $\mu$ M), com aumento de duas vezes na atividade apoptótica no grupo tratado por 48h. Os grupos 1 $\mu$ M/24h e 10 $\mu$ M/12 e 48h apresentaram uma melhora das taxas de apoptose quando comparadas ao controle cultivado (Figura 19)

### **6.4. Perfil de espessura das fibras colágenas**

A coloração com *picrosírius red* sob microscopia de luz polarizada mostrou diminuição significativa das fibras colágenas espessas (vermelhas) e intermediárias (amarelas/laranja) nos fragmentos expostos ao bpV(pic) em 24 e 48h. No geral, existe uma relação inversamente proporcional entre a intensidade do tratamento com inibidor de PTEN e a espessura das fibras de colágeno, mas um equilíbrio intermediário parece levar a um efeito protetor do arcabouço do estroma (Figura 20).

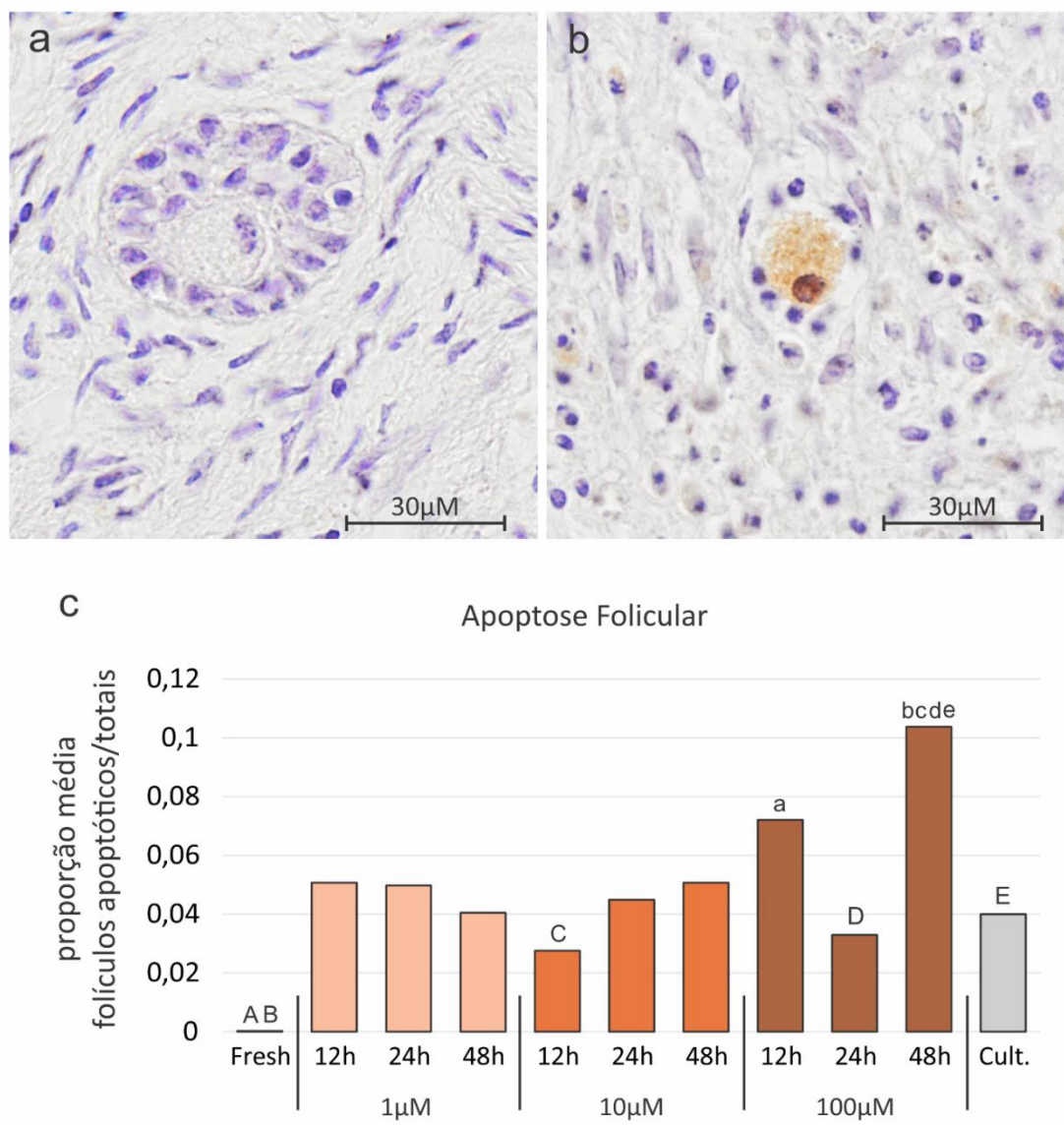


Figura 18 – Apoptose Folicular por Imunohistoquímica de Caspase3-Clivada

Legenda: Exemplos de folículo ovariano vivo (a) e apoptótico (b) em lâminas de IHQ para Caspase3-clivada. Gráfico indicando a proporção média de folículos apoptóticos. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença estatística (ex. A  $\neq$  a) com  $p < 0,05$ . A proporção média de perda folicular foi quantificada pela contagem de folículos totais e apoptóticos (c).



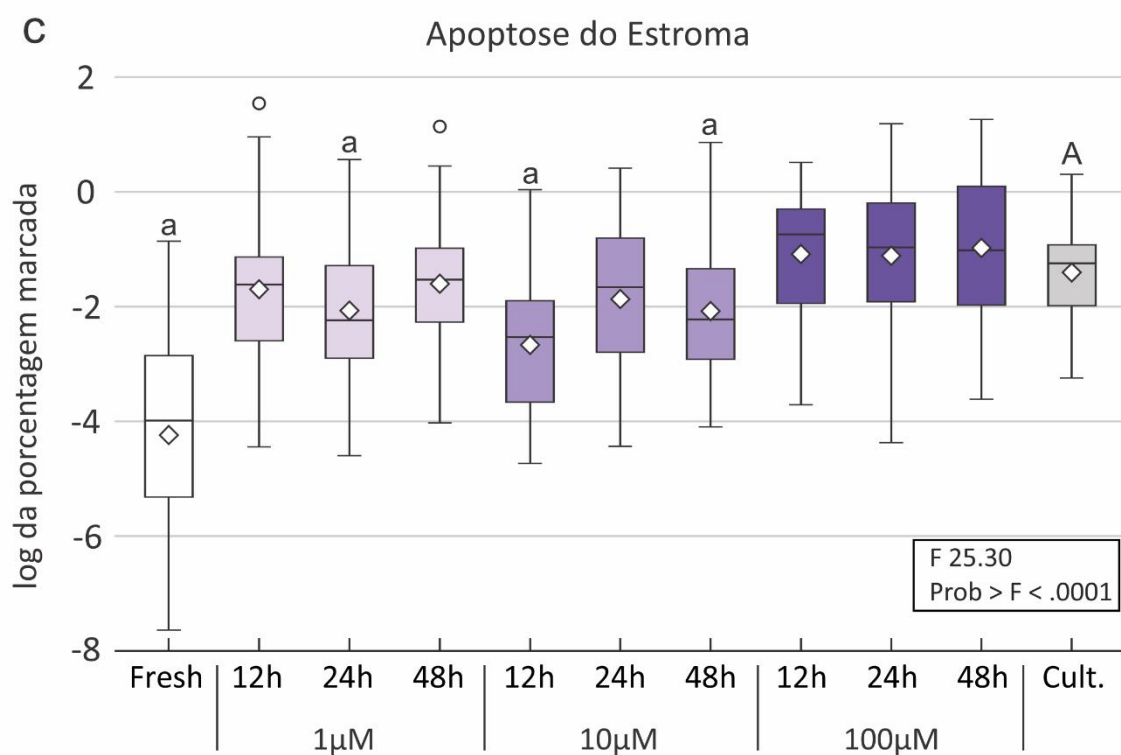
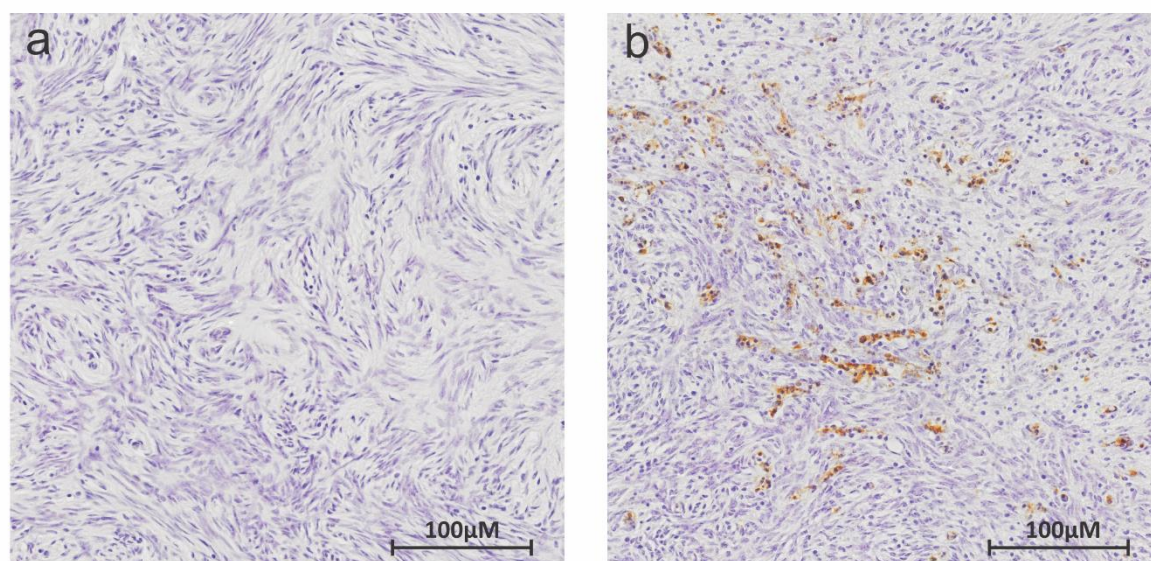


Figura 19 – Apoptose de Células do Estroma por Imunohistoquímica de Caspase3-Clivada  
 Legenda: Amostras dos grupos Controle Fresco (a) e tratado 100µM/48h (b) ilustrando diferentes perfis de marcação e apoptose de células do estroma antes e após o tratamento e cultivo. Em c, os losangos indicam o log das percentagens médias de marcação de cada grupo. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença estatística (ex. A ≠ a) com  $p < 0,05$ . (Tabela com valores de p na seção de anexos)

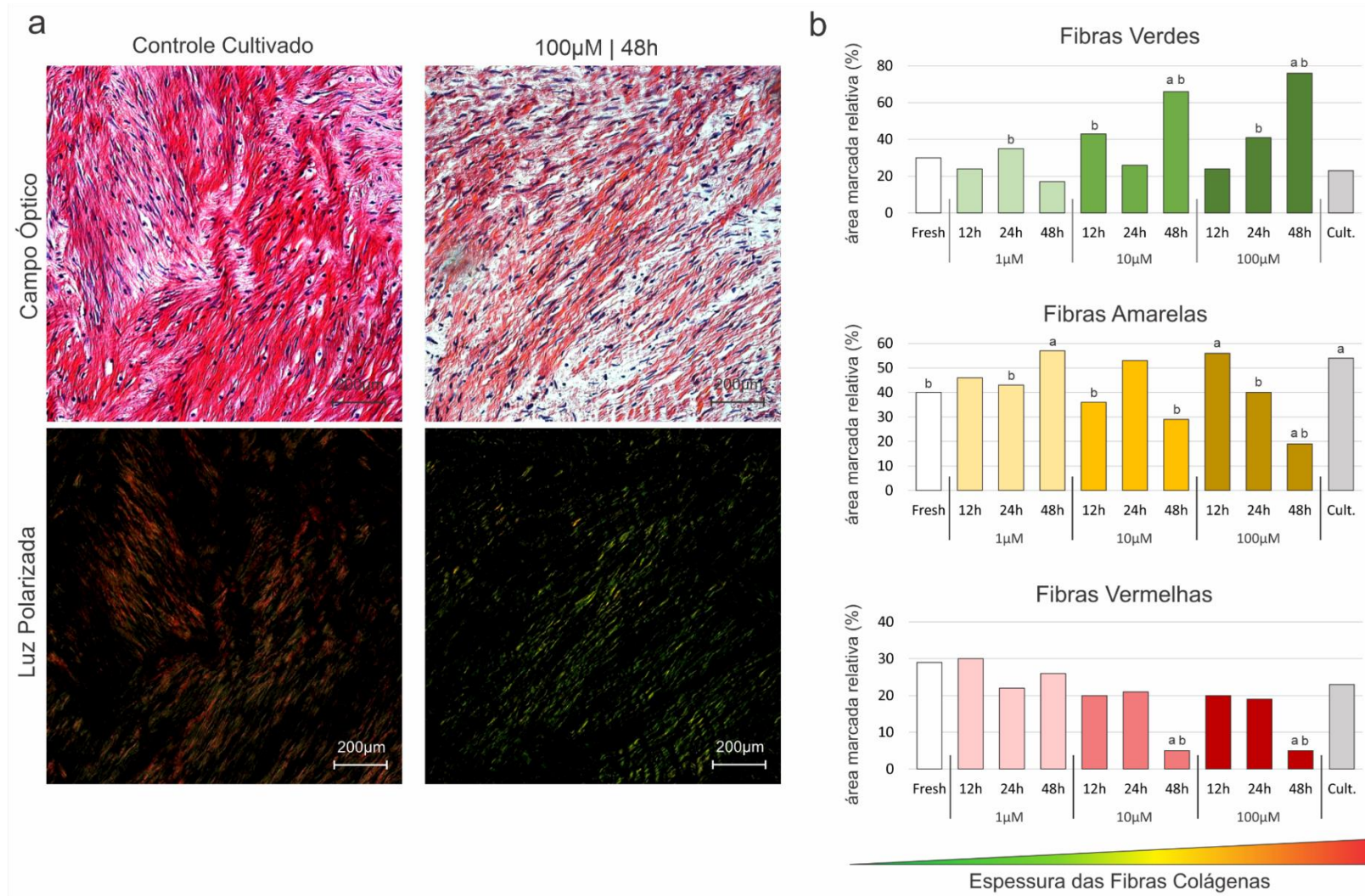


Figura 20 – Espessura de fibras colágenas por coloração de *picrosirius red* sob luz polarizada

Legenda: Amostras dos grupos Controle Cultivado e 100 $\mu$ M/48h sob Microscopia Óptica e de Luz Polarizada (a). Gráficos de barra (b) da razão de diferentes cores e, portanto, da espessura de fibras colágenas nos grupos experimentais. Letra “a” nos gráficos indica diferença estatística em relação ao Controle Fresco e “b” indica diferença estatística em relação ao Controle Cultivado.



## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve os efeitos foliculares e estromais da inibição farmacológica do PTEN em tecido ovariano bovino cultivado *in vitro* tratado com bpV (pic) em três diferentes concentrações e intervalos de exposição. Observou-se que a ativação folicular ocorreu em aproximadamente 30 a 40% dos folículos, com ou sem inibição do PTEN, indistintamente. No entanto, apesar das taxas inalteradas de crescimento folicular, a inativação farmacológica do PTEN parece comprometer o estroma ovariano de forma diferente de acordo com a concentração e tempo de exposição ao fármaco, com efeito protetor em concentrações mais baixas (1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) e efeito prejudicial quando altas concentrações (100 $\mu$ M) foram aplicadas.

A ativação de folículos primordiais em tecido cortical ovariano fragmentado e cultivado *in vitro* sem qualquer intervenção foi descrita em muitas espécies, incluindo vacas (ARAÚJO *et al.*, 2014), com média variando de 40-70% segundo diferentes autores (ABIR *et al.*, 2006). O status de folículo inativo durante toda a vida, antes do ciclo em que o folículo é destinado ao crescimento, é mantido por inúmeros hormônios, fatores de crescimento e estímulos mecânicos que compõem a complexa sinalização inibitória e a rede estrutural que impede o recrutamento maciço dos folículos primordiais (ADHIKARI *et al.*, 2010; ADHIKARI; LIU, 2009; CLARK *et al.*, 2022).

O hormônio antimulleriano (AMH) é uma das substâncias mais importantes na manutenção da quiescência dos folículos primordiais e é produzido pelas células da granulosa dos folículos secundários, pré-antrais e antrais pequenos (WEENEN *et al.*, 2004b). Durante o preparo do tecido ovariano para o cultivo, os folículos mais desenvolvidos são perdidos ou removidos, o que reduz a secreção de AMH, resultando em perda dos estímulos inibitórios. A adição de AMH na concentração de 100ng/ml ao meio de cultura de tecido ovariano humano preservou parcialmente a proporção de folículos primordiais no tecido após o cultivo (CARLSSON *et al.*, 2006).

Assim, era esperado que a simples retirada do tecido do contexto fisiológico ovariano promovesse a ativação folicular, mas não necessariamente a manutenção do seu crescimento e viabilidade. Muitos trabalhos publicados que descrevem diferentes protocolos de maturação folicular têm uma abordagem mais direcionada à viabilidade instantânea dos folículos sobreviventes, porém, poucos deles se propõem a acompanhar o folículo até a formação de um oócito maduro (oócito em metáfase II) e seu potencial para formar um embrião de boa qualidade. Até o momento, ovócitos maduros (metáfase II) inteiramente desenvolvidos em sistema *multistep* de cultivo de tecido ovariano foram obtidos de camundongos (LARONDA *et al.*, 2017), cabras (CADENAS *et al.*, 2017) e mais recentemente, mulheres (MCLAUGHLIN *et al.*, 2018), no entanto, somente em camundongos foram relatados nascimentos (LARONDA *et al.*, 2017).

A extrusão nuclear de Foxo3 é um dos desdobramentos de uma complexa via de sinalização que possui diversos alvos intracelulares assim como a própria ativação folicular (JOHN *et al.*, 2008). Neste estudo pudemos observar que nem todos os folículos classificados morfologicamente como primordiais são realmente inativos, uma vez que 5 a 15% deles apresentaram marcação nuclear de Foxo3 negativa, indicando que o processo molecular de ativação folicular foi iniciado, no entanto, esta observação se deu em todos os grupos experimentais, incluindo o controle fresco e controle cultivado por sete dias. Assim, a realização da imunohistoquímica de Foxo3 permitiu a identificação desses folículos não tão inativos.

Como o PTEN exerce ação inibitória sobre a atividade da via PI3K, espera-se que o tratamento com bpV(pic) possibilite o processo de livre ativação de toda a cascata de sinalização (PULIDO, 2018; REDDY *et al.*, 2008). No entanto, a ativação de PI3K requer essencialmente a ligação do KIT-ligante liberado pelas células da granulosa ao seu receptor (c-kit) na membrana do oócito. Por esse motivo, alguns estudos associaram a inibição do PTEN ao 740Y-P, que mimetiza a porção citoplasmática fosforilada do c-kit, se ligando ao p85 e p110 para formar o complexo ativo PI3-quinase. Em alguns desses estudos, foi observado um aumento nas taxas de ativação folicular (GROSBOIS; DEVOS; DEMEESTERE, 2020). Dado o equilíbrio essencial da via de sinalização PI3K em muitas outras funções celulares para prevenir o crescimento anormal, é importante reduzir, tanto quanto possível, o período de exposição aos inibidores de PTEN, para garantir a eficácia e reduzir os danos celulares e teciduais (BLANCO-APARICIO *et al.*, 2007).

Curiosamente, alguns núcleos de oócitos de folículos em crescimento (transitórios, primários e secundários) foram marcados positivamente para Foxo3, também em todos os grupos experimentais, incluindo controles não tratados, sugerindo que, apesar de seu papel fundamental enquanto gatilho de iniciação da ativação folicular, Foxo3 pode não ser essencial para o crescimento do folículo. Considera-se o próprio processo de seleção folicular caracterizado pelos folículos que iniciam seu crescimento e desenvolvimento; contudo, mais importante ainda, estes folículos podem manter o seu processo de desenvolvimento ou, pelo contrário, parar o seu crescimento e maturação e sofrer atresia. Assim, o retorno do Foxo3 ao núcleo do oócito pode indicar falha na manutenção do processo de crescimento folicular e transcrição de genes pró-apoptóticos. Esta hipótese está de acordo com achados que associam a presença das Foxos no núcleo celular à morte celular (ACCILI; ARDEN, 2004).

Neste estudo, a inibição de PTEN com baixas doses de bpV não promoveu apoptose, porém, quando em maiores concentrações de bpV (100µM), a taxa de apoptose foi aumentada, indicando um efeito deletério desta substância. Esta tendência foi observada não apenas em células foliculares, como também nas células do estroma tecidual. Notoriamente, estudos que investigaram a ação do bpV(pic) na ativação folicular normalmente utilizaram a

concentração de 100 $\mu$ M. Schmid et al. (2004) demonstraram que mesmo em concentrações mais baixas ( $\leq 10\mu$ M) de bpV(pic), há uma ação inibitória sobre PTEN, enquanto concentrações mais altas ( $\geq 100\mu$ M), mesmo que por apenas 2 horas de exposição, tiveram um efeito prejudicial em células NIH3T3 (SCHMID *et al.*, 2004). É evidente que a perfusão do fármaco em tecidos requer um tempo de exposição mais longo, mas é improvável que a administração muito prolongada em sistemas de cultivo acrescente alguma vantagem.

Outras funções foram atribuídas ao Foxo3: é possível que os genes regulados pelo fator de transcrição no oócito atuem como gatilhos (JOHN *et al.*, 2008), iniciando o processo de desenvolvimento folicular e retomando seu papel na retenção transcricional dos genes do ciclo celular, até porque, apesar da intensa atividade de tradução proteica durante o crescimento do folículo, a retomada da metáfase I da meiose só ocorrerá no momento do pico de LH do ciclo ovulatório (GOUGEON, 1986; OKTEM; URMAN, 2010). De qualquer maneira, serão necessários estudos mais precisos, associando a localização da Foxo3, a fosforilação de AKT/PKB e a atividade proliferativa das células da granulosa para uma compreensão mais precisa do papel de Foxo3 na ativação folicular.

O dano às células do estroma foi descrito por outros estudos do nosso grupo (Antonino et al, 2023, dados não publicados). Neste trabalho, as menores concentrações de bpV e o tempo de cultivo intermediário (até 24 horas de exposição) não afetaram as taxas de apoptose folicular ou estromal e permitiram a manutenção da espessura, composição e características das fibras colágenas, assim como as amostras do controle cultivado. As alterações significativas observadas nos grupos 10 e 100 $\mu$ M, com exposição prolongada (48h), puderam ser observadas até mesmo por microscopia óptica, onde o estroma ovariano adquiriu uma morfologia em forma de rede.

O efeito da inibição farmacológica de PTEN na apoptose depend do contexto e da atividade relativa das vias de sinalização nos ambientes celulares do estroma e dos folículos ovarianos. Diferentes resultados podem ser obtidos a depender da efetividade da modulação de PTEN e da toxicidade excessiva em altas concentrações do fármaco.

A redução da espessura das fibras colágenas no cultivo do tecido cortical ovariano é esperada e, considerando a participação da matriz extracelular no controle da via de sinalização do hipotálamo, essas alterações poderiam ser úteis na promoção da ativação folicular. A perfusão tecidual também é favorecida, permitindo trocas mais eficientes de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento para as células. (GROSBOIS *et al.*, 2023; OUNI *et al.*, 2020). No entanto, quando a textura do estroma é mais fortemente comprometida, as comunicações celulares ou outras junções estruturais também são afetadas, levando a altos níveis de estresse tecidual e degeneração acelerada (COURTNEY B. BERKHOLTZ; LONNIE D. SHEA; TERESA K. WOODRUFF, 2006; KINNEAR *et al.*, 2020; SUTTON *et al.*, 2021).

Em conjunto, nossos resultados mostram que a inibição do PTEN pelo tratamento com bpV(pic) não é suficiente para promover alterações significativas nas taxas de desenvolvimento folicular e altas concentrações e tempo de exposição parecem ser mais prejudiciais para a estrutura e composição do estroma, sem apresentar aumento dos níveis de ativação folicular. Assim, a inibição do PTEN com bpV não parece melhorar a obtenção de ativação folicular em cultivo *in vitro* de tecido ovariano.

## 8. CONCLUSÃO

- O acréscimo do inibidor de PTEN (bpV(pic)) ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino não aumentou a ativação folicular, em nenhuma das concentrações testadas.
- O uso da imunomarcagem para Foxo3 na análise de classificação folicular permitiu identificar a existência de folículos morfologicamente primordiais, porém com sinais moleculares de início do processo de ativação, sendo estes cerca de 5 a 15% dos folículos primordiais.
- Altas concentrações e exposição prolongada ao bpV(pic) não só não aumentaram a ativação de folículos primordiais, como foram deletérias para a integridade de folículos e estroma do tecido ovariano cultivado.
- Os tecidos ovarianos submetidos a maior dano pela ação do cultivo e pelas altas concentrações de bpV apresentaram degeneração de matriz extracelular após sete dias de cultivo, com significativa alteração da espessura das fibras colágenas do estroma.

## 9. REFERÊNCIAS



ABDEL-RAZEQ, H. Gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy for ovarian function and fertility preservation for patients with early-stage breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 4273–4282, 2019.

ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. **In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation***Histology and Histopathology* jul. 2006.

ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 421–426, maio 2004.

ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 5, p. 438–464, 1 ago. 2009.

ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HAMALAINEN, T.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, I.; LAN, Z.-J.; LIU, K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 3, p. 397–410, 1 fev. 2010.

ADIB, S.; VALOJERDI, M. R.; ALIKHANI, M. Dose optimisation of PTEN inhibitor, bpV (HOpic), and SCF for the in-vitro activation of sheep primordial follicles. **Growth Factors**, v. 37, n. 3–4, p. 178–189, 4 jul. 2019.

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*2014.

BAERWALD, A. R. **Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models***Anim. Reprod.*, v. [s.l: s.n.].

BERTOLDO, M. J.; WALTERS, K. A.; LEDGER, W. L.; GILCHRIST, R. B.; MERMILLOD, P.; LOCATELLI, Y. **In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies***Reproductive BioMedicine Online* Elsevier Ltd, 1 maio 2018.

BLANCO-APARICIO, C.; RENNER, O.; LEAL, J. F. M.; CARNERO, A. **PTEN, more than the AKT pathway***Carcinogenesis* jul. 2007.

BLOCK, E. A QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF THE FOLLICULAR SYSTEM IN NEWBORN FEMALE INFANTS. **Cells Tissues Organs**, v. 17, n. 3, p. 201–206, 1953.

BLUMENFELD, Z. Chemotherapy and fertility. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 26, n. 3, p. 379–390, jun. 2012.

CADENAS, J.; LEIVA-REVILLA, J.; VIEIRA, L. A.; APOLLONI, L. B.; AGUIAR, F. L. N.; ALVES, B. G.; LOBO, C. H.; RODRIGUES, A. P. R.; APGAR, G. A.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R.; MASIDE, C. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early

antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. **Theriogenology**, v. 87, p. 321–332, 1 jan. 2017.

CARLSSON, I. B.; SCOTT, J. E.; VISSER, J. A.; RITVOS, O.; THEMME, A. P. N.; HOVATTA, O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. **Human Reproduction**, v. 21, n. 9, p. 2223–2227, 2006.

CHAMBERS, E. L.; GOSDEN, R. G.; YAP, C.; PICTON, H. M. In situ identification of follicles in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and developmental potential in strategies to preserve female fertility. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 2559–2568, 2010.

CHAMBERS, G. M.; DYER, S.; ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; DE MOUZON, J.; ISHIHARA, O.; BANKER, M.; MANSOUR, R.; KUPKA, M. S.; ADAMSON, G. D. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014†. **Human Reproduction**, v. 36, n. 11, p. 2921–2934, 1 nov. 2021.

CHENG, Y.; KIM, J.; LI, X. X.; HSUEH, A. J. Promotion of ovarian follicle growth following mTOR activation: Synergistic effects of AKT stimulators. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 24 fev. 2015.

CLARK, K. L.; GEORGE, J. W.; PRZYGRÓDZKA, E.; PLEWES, M. R.; HUA, G.; WANG, C.; DAVIS, J. S. Hippo Signaling in the Ovary: Emerging Roles in Development, Fertility, and Disease. **Endocrine Reviews**, v. 43, n. 6, p. 1074–1096, 25 nov. 2022.

COURTNEY B. BERKHOLTZ, B. A.; LONNIE D. SHEA, Ph. D.; TERESA K. WOODRUFF, Ph. D. Extracellular Matrix Functions in Follicle Maturation. **Das Gesundheitswesen**, v. 68, n. 07, jul. 2006.

COX, C. M.; THOMA, M. E.; TCHANGALOVA, N.; MBURU, G.; BORNSTEIN, M. J.; JOHNSON, C. L.; KIARIE, J. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Open**, v. 2022, n. 4, 10 set. 2022.

DE FELICI, M.; KLINGER, F. G. **Pi3k/pten/akt signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, 1 set. 2021.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; DEDEKEN, L.; MOFFA, F.; TSÉPÉLIDIS, S.; BRACHET, C.; DELBAERE, A.; DEVREKER, F.; FERSTER, A. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood: Figure 1. **Human Reproduction**, v. 30, n. 9, p. 2107–2109, set. 2015.

DOLMANS, M. M.; LUYCKX, V.; DONNEZ, J.; ANDERSEN, C. Y.; GREVE, T. **Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue** *Fertility and Sterility* Elsevier Inc., 2013.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Fertility Preservation in Women. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 17, p. 1657–1665, 26 out. 2017.

DONNEZ, J.; SILBER, S.; ANDERSEN, C. Y.; DEMEESTERE, I.; PIVER, P.; MEIROW, D.; PELLICER, A.; DOLMANS, M. M. **Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births** **Annals of Medicine** set. 2011.

DU SERT, N. P.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S.; AVEY, M. T.; BAKER, M.; BROWNE, W. J.; CLARK, A.; CUTHILL, I. C.; DIRNAGL, U.; EMERSON, M.; GARNER, P.; HOLGATE, S. T.; HOWELLS, D. W.; HURST, V.; KARP, N. A.; LAZIC, S. E.; LIDSTER, K.; MACCALLUM, C. J.; MACLEOD, M.; PEARL, E. J.; PETERSEN, O. H.; RAWLE, F.; REYNOLDS, P.; ROONEY, K.; SENA, E. S.; SILBERBERG, S. D.; STECKLER, T.; WÜRBEL, H. **Reporting animal research: Explanation and elaboration for the arrive guidelines 2.0** **PLoS Biology** Public Library of Science, 1 jul. 2020.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. **Development In Vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles** **1BIOLOGY OF REPRODUCTION**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/54/1/197/2761902>>.

EPPIG, J. J.; TELFER, E. E. Isolation and culture of oocytes. **Methods in Enzymology**, v. 225, p. 77–84, 1993.

FORABOSCO, A.; SFORZA, C.; DE POL, A.; VIZZOTTO, L.; MARZONA, L.; FERRARIO, V. F. Morphometric study of the human neonatal ovary. **The Anatomical Record**, v. 231, n. 2, p. 201–208, out. 1991.

GHEZELAYAGH, Z.; ABTAHI, N. S.; REZAZADEH VALOJERDI, M.; EBRAHIMI, B. The effect of mTOR activation and PTEN inhibition on human primordial follicle activation in ovarian tissue culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 39, n. 8, p. 1739–1747, 1 ago. 2022.

GOUGEON, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Human Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 81–87, fev. 1986.

GOUGEON, A. Régulation de l'initiation de la croissance folliculaire. Em: *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 9., 2011, [...]. Elsevier Masson SAS, 2011. v. 39, p. 511–513.

GRANADOS-APARICI, S.; HARDY, K.; FRANKS, S.; SHARUM, I. B.; WAITE, S. L.; FENWICK, M. A. SMAD3 directly regulates cell cycle genes to maintain arrest in granulosa cells of mouse primordial follicles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

GROSBOIS, J.; 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 (Oxford, England)**, v. 38, n. 3, p. 444–458, 1 mar. 2023.

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.

GROSBOIS, J.; DEVOS, M.; DEMEESTERE, I. **Implications of nonphysiological ovarian primordial follicle activation for fertility preservation** *Endocrine Reviews* Endocrine Society, 1 dez. 2020.

GUBBALA, K.; LAIOS, A.; GALLOS, I.; PATHIRAJA, P.; HALDAR, K.; IND, T. Outcomes of ovarian transposition in gynaecological cancers; A systematic review and meta-analysis. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, 25 jun. 2014.

HERTA, A. C.; LOLICATO, F.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle culture in the context of IVF. **REPRODUCTION ANNIVERSARY REVIEW**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1530/REP>>.

HSUEH, A. J. W.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. J. M. **Intraovarian control of early folliculogenesis** *Endocrine Reviews* Endocrine Society, 2015.

HUANG, J.; MANNING, B. D. **The TSC1-TSC2 complex: A molecular switchboard controlling cell growth** *Biochemical Journal* 1 jun. 2008.

JENSEN, J. R.; MORBECK, D. E.; CODDINGTON, C. C. Fertility preservation. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 1, p. 45–49, 2011.

JERUSS, J. S.; WOODRUFF, T. K. **Preservation of Fertility in Patients with Cancer** *N Engl J Med*. [s.l.: s.n.].

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, v. 321, n. 1, p. 197–204, 1 set. 2008.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, C. H.; KAWAMURA, N.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; SUGISHITA, Y.; MORIMOTO, Y.; HOSOI, Y.; YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B.; HSUEH, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17474–17479, 22 out. 2013.

KIM, J. Y. **Control of ovarian primordial follicle activation** *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* mar. 2012.

KINNEAR, H. M.; TOMASZEWSKI, C. E.; CHANG, F. L.; MORAVEK, M. B.; XU, M.; PADMANABHAN, V.; SHIKANOV, A. **The ovarian stroma as a new frontier** *Reproduction* BioScientifica Ltd., 1 set. 2020.

KISHI, H.; KITAHARA, Y.; IMAI, F.; NAKAO, K.; SUWA, H. **Expression of the gonadotropin receptors during follicular development** *Reproductive Medicine and Biology* John Wiley and Sons Ltd, 1 jan. 2018.

KOLIBIANAKIS, S. **Increasing survival of the graft: The way forward in ovarian tissue transplantation** *Reproductive BioMedicine Online* Elsevier Ltd, 1 jan. 2015.

LARONDA, M. M.; RUTZ, A. L.; XIAO, S.; WHELAN, K. A.; DUNCAN, F. E.; ROTH, E. W.; WOODRUFF, T. K.; SHAH, R. N. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. **Nature Communications**, v. 8, 16 maio 2017.

LI, J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; LIU, S.; KLEIN, C.; LIU, S.; DUAN, E. K.; HSUEH, A. J. W. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 22, p. 10280–10284, 1 jun. 2010.

MAIDARTI, M.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. **Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing** *Cells* NLM (Medline), 14 jan. 2020.

MAIDARTI, M.; CLARKSON, Y. L.; MCLAUGHLIN, M.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. **Human Reproduction**, v. 34, n. 2, p. 297–307, 1 fev. 2019.

MAKKER, A.; GOEL, M. M.; MAHDI, A. A. **PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: An update** *Journal of Molecular Endocrinology* BioScientifica Ltd., 13 out. 2014.

MANNING, B. D.; TOKER, A. **AKT/PKB Signaling: Navigating the Network** *Cell* Cell Press, 20 abr. 2017.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. **Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells**. [s.l.: s.n.].

MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. **Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles** *Endocrine Reviews*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article-abstract/21/2/200/2423956>>.

MCLAUGHLIN, M.; ALBERTINI, D. F.; WALLACE, W. H. B.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multistep culture system. **Molecular Human Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 135–142, 1 mar. 2018.

MCLAUGHLIN, M.; INNELL, 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, 2014.

MCLAUGHLIN, M.; PATRIZIO, P.; KAYISLI, U.; LUK, J.; THOMSON, T. C.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E.; JOHNSON, J. MTOR kinase inhibition results in oocyte

loss characterized by empty follicles in human ovarian cortical strips cultured in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 5, 2011.

MENG, Z.; MOROISHI, T.; GUAN, K.-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes & Development**, v. 30, n. 1, p. 1–17, 1 jan. 2016.

MOOLHUIJSEN, L. M. E.; VISSER, J. A. **Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* Endocrine Society, 1 nov. 2020.

NAKAYAMA, K.; MILBOURNE, A.; SCHOVER, L. R.; CHAMPLIN, R. E.; UENO, N. T. **Gonadal failure after treatment of hematologic malignancies: From recognition to management for health-care providers** *Nature Clinical Practice Oncology* fev. 2008.

NILSSON, E.; ROGERS, N.; SKINNER, M. K. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. **Reproduction**, v. 134, n. 2, p. 209–221, ago. 2007.

NOVELLA-MAESTRE, E.; HERRAIZ, S.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, B.; DÍAZ-GARCÍA, C.; PELLICER, A. Short-term PTEN inhibition improves in vitro activation of primordial follicles, preserves follicular viability, and restores AMH levels in cryopreserved ovarian tissue from cancer patients. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 29 maio 2015.

OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. G. **Ontogeny of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Expression in Isolated Human Ovarian Follicles\***. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/82/11/3748/2866050>>.

OKTAY, K.; HARVEY, B. E.; PARTRIDGE, A. H.; QUINN, G. P.; REINECKE, J.; TAYLOR, H. S.; WALLACE, W. H.; WANG, E. T.; LOREN, A. W. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY** Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.2018.>>.

OKTEM, O.; URMAN, B. **Understanding follicle growth in vivo** *Human Reproduction* Oxford University Press, 2010.

OUNI, E.; BOUZIN, C.; DOLMANS, M. M.; MARBAIX, E.; PYR DIT RUYS, S.; VERTOMMEN, D.; AMORIM, C. A. Spatiotemporal changes in mechanical matrix components of the human ovary from prepuberty to menopause. **Human Reproduction**, v. 35, n. 6, p. 1391–1410, 1 jun. 2020.

PANKHURST, M. W. **A putative role for anti-Müllerian hormone (AMH) in optimising ovarian reserve expenditure** *Journal of Endocrinology* BioScientifica Ltd., 1 abr. 2017.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. **The in vitro growth and maturation of follicles** *Reproduction* dez. 2008.

PICTON, H. M.; KIM, S. S.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 603–615, 1 jan. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1258/0007142001903418>>.

PULIDO, R. **PTEN inhibition in human disease therapy**MoleculesMDPI AG, 2018.

RAFFEL, N.; KLEMM, K.; DITTRICH, R.; HOFFMANN, I.; SÖDER, S.; BECKMANN, M. W.; LOTZ, L. The effect of bpV(HOpic) on in vitro activation of primordial follicles in cultured swine ovarian cortical strips. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 8, p. 1057–1063, 2019.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HÄMÄLÄINEN, T.; PENG, S. L.; LAN, Z.-J.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611–613, fev. 2008.

RIVKEES, S. A. The Relationship of Gonadal Activity and Chemotherapy-Induced Gonadal Damage. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 259, n. 14, p. 2123, 8 abr. 1988.

RONESS, H.; GAVISH, Z.; COHEN, Y.; MEIROW, D. **Ovarian follicle burnout: A universal phenomenon?****Cell Cycle**Taylor and Francis Inc., 2013.

ROSAIRO, D.; KUYZNIEREWICZ, I.; FINDLAY, J.; DRUMMOND, A. Transforming growth factor- $\beta$ : Its role in ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 799–809, 2008.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. **Isolation and long-term culture of human preantral follicles**\***The American Fertility Society**. [s.l: s.n.].

SCHMID, A. C.; BYRNE, R. D.; VILAR, R.; WOSCHOLSKI, R. Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. **FEBS Letters**, v. 566, n. 1–3, p. 35–38, 21 maio 2004.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. **Fundamental Cryobiology of Mammalian Oocytes and Ovarian Tissue**. [s.l: s.n.].

SMITZ, I.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. **Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: Implications for fertility preservation**Human Reproduction Update1 fev. 2010.

SONMEZER, M.; OKTAY, K. **Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation**Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecologyfev. 2010.

SUN, X.; SU, Y.; HE, Y.; ZHANG, J.; LIU, W.; ZHANG, H.; HOU, Z.; LIU, J.; LI, J. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. **Cell Cycle**, v. 14, n. 5, p. 721–731, 2015.

SUTTON, C. M.; SPRINGMAN, S. A.; ABEDAL-MAJED, M. A.; CUPP, A. S. Bovine ovarian cortex tissue culture. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2021, n. 167, p. 1–19, 1 jan. 2021.

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.

VANACKER, J.; AMORIM, C. A. Alginate: A Versatile Biomaterial to Encapsulate Isolated Ovarian Follicles. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 45, n. 7, p. 1633–1649, 1 jul. 2017.

VELEZ, D.; OHLANDER, S. **Medical therapies causing iatrogenic male infertility** *Fertility and Sterility* Elsevier Inc., 1 set. 2021.

WALLACE, W. H. B.; THOMSON, A. B.; SARAN, F.; KELSEY, T. W. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 62, n. 3, p. 738–744, 1 jul. 2005.

WALLACH ASSOCIATE EDITOR, E. E.; OKTAY, K.; NEWTON, H.; YVES AUBARD, S.; SALHA, O.; GOSDEN, R. G. **Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology?** [s.l.: s.n.].

WEENEN, C.; LAVEN, J. S. E.; VON BERGH, A. R. M.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; VISSER, J. A.; KRAMER, P.; FAUSER, B. C. J. M.; THEMME, A. P. N. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 2, p. 77–83, fev. 2004a.

WEENEN, C.; LAVEN, J. S. E.; VON BERGH, A. R. M.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; VISSER, J. A.; KRAMER, P.; FAUSER, B. C. J. M.; THEMME, A. P. N. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 2, p. 77–83, fev. 2004b.

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.

ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZHENG, N.; XU, X.; YANG, J.; XIA, G.; ZHANG, M. MAPK3/1 participates in the activation of primordial follicles through mTORC1-KITL signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 226–237, 1 jan. 2018.



## 10. ANEXOS

## TABELAS P VALOR

## P Valor - Apoptose Folicular (Cas3-Clivada)

APOP	Fresh	1µM 12h	1µM 24h	1µM 48h	10µM 12h	10µM 24h	10µM 48h	100µM 12h	100µM 24h	100µM 48h
1µM 12h	0.1402									
1µM 24h	0.1475	0.9741								
1µM 48h	0.2738	0.7647	0.7869							
10µM 12h	0.4118	0.4444	0.4635	0.6974						
10µM 24h	0.1886	0.8469	0.8724	0.8991	0.5653					
10µM 48h	0.1394	0.9972	0.9714	0.7624	0.4424	0.8442				
100µM 12h	0.0416	0.4818	0.4622	0.3562	0.1500	0.3725	0.4840			
100µM 24h	0.3310	0.5530	0.5746	0.8155	0.8615	0.6877	0.5507	0.2017		
100µM 48h	0.0052	0.0888	0.0835	0.0715	0.0183	0.0611	0.0894	0.2966	0.0267	
Cult.	0.2338	0.7340	0.7584	0.9962	0.6678	0.8830	0.7314	0.3012	0.7984	0.0455

## P Valor - Apoptose do Estroma (Cas3-Clivada)

APOP	Fresh	1µM 12h	1µM 24h	1µM 48h	10µM 12h	10µM 24h	10µM 48h	100µM 12h	100µM 24h	100µM 48h
1µM 12h	<.0001									
1µM 24h	<.0001	0.1542								
1µM 48h	<.0001	0.7100	0.0727							
10µM 12h	<.0001	0.0002	0.0233	<.0001						
10µM 24h	<.0001	0.5177	0.4360	0.3085	0.0024					
10µM 48h	<.0001	0.1462	0.9771	0.0682	0.0250	0.4194				
100µM 12h	<.0001	0.0191	0.0002	0.0484	<.0001	0.0029	0.0002			
100µM 24h	<.0001	0.0251	0.0003	0.0615	<.0001	0.0040	0.0002	0.9168		
100µM 48h	<.0001	0.0060	<.0001	0.0172	<.0001	0.0007	<.0001	0.6815	0.6067	
Cult.	<.0001	0.2606	0.0110	0.4511	<.0001	0.0768	0.0101	0.2213	0.2632	0.1026

### Valor - Fibras Verdes (Picrosirius Red)

APOP	Fresh	1µM 12h	1µM 24h	1µM 48h	10µM 12h	10µM 24h	10µM 48h	100µM 12h	100µM 24h	100µM 48h
1µM 12h	0.5256									
1µM 24h	0.6244	0.1436								
1µM 48h	0.1236	0.3300	0.0010							
10µM 12h	0.1514	0.0120	0.1365	<.0001						
10µM 24h	0.5748	0.8158	0.0648	0.0760	0.0013					
10µM 48h	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001				
100µM 12h	0.4903	0.9776	0.0649	0.1972	0.0020	0.7876	<.0001			
100µM 24h	0.2309	0.0215	0.2462	<.0001	0.6678	0.0022	<.0001	0.0036		
100µM 48h	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0658	<.0001	<.0001	
Cult.	0.4044	0.8967	0.0324	0.2579	0.0007	0.6053	<.0001	0.8390	0.0012	<.0001

### P Valor - Fibras Amarelas (Picrosirius Red)

APOP	Fresh	1µM 12h	1µM 24h	1µM 48h	10µM 12h	10µM 24h	10µM 48h	100µM 12h	100µM 24h	100µM 48h
1µM 12h	0.4736									
1µM 24h	0.6749	0.6267								
1µM 48h	0.0156	0.0549	0.0011							
10µM 12h	0.5753	0.1114	0.1381	<.0001						
10µM 24h	0.0567	0.1977	0.0106	0.3038	0.0001					
10µM 48h	0.0900	0.0022	0.0003	<.0001	0.0943	<.0001				
100µM 12h	0.0283	0.0983	0.0048	0.7799	<.0001	0.5077	<.0001			
100µM 24h	0.9750	0.3443	0.5287	0.0001	0.3672	0.0014	0.0036	0.0007		
100µM 48h	0.0023	<.0001	<.0001	<.0001	0.0004	<.0001	0.0157	<.0001	<.0001	
Cult.	0.0495	0.1695	0.0120	0.4696	0.0002	0.8219	<.0001	0.6822	0.0020	<.0001

### P Valor - Fibras Vermelhas (Picrosirius Red)

APOP	Fresh	1µM 12h	1µM 24h	1µM 48h	10µM 12h	10µM 24h	10µM 48h	100µM 12h	100µM 24h	100µM 48h
1µM 12h	0.9369									
1µM 24h	0.3352	0.2058								
1µM 48h	0.6483	0.5120	0.4077							
10µM 12h	0.2448	0.1405	0.7125	0.2659						
10µM 24h	0.2618	0.1393	0.8219	0.2613	0.8454					
10µM 48h	0.0008	<.0001	<.0001	<.0001	0.0013	<.0001				
100µM 12h	0.2147	0.1144	0.6350	0.2109	0.9350	0.7629	0.0010			
100µM 24h	0.1520	0.0683	0.4392	0.1128	0.7389	0.5363	0.0014	0.7952		
100µM 48h	0.0017	0.0001	0.0005	<.0001	0.0047	0.0004	0.9200	0.0042	0.0063	
Cult.	0.3925	0.2581	0.8681	0.5168	0.6079	0.6887	<.0001	0.5328	0.3554	0.0003