



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



CRIOPRESERVAÇÃO E TRANSPLANTE DE OVÁRIO EM CAMUNDONGOS: ATIVIDADE MITOCONDRIAL OVARIANA E EFEITO DA ERITROPOIETINA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA FOLICULAR

Aline de Queiroz Rodrigues

Dissertação de Mestrado

**Brasília-DF
2021**



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



CRIOPRESERVAÇÃO E TRANSPLANTE DE OVÁRIO EM CAMUNDONGOS: ATIVIDADE MITOCONDRIAL OVARIANA E EFEITO DA ERITROPOIETINA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA FOLICULAR

Aline de Queiroz Rodrigues

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Paulini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Dissertação de Mestrado

Brasília-DF

DEDICATÓRIA

À minha querida família, que tanto amo e admiro, dedico o resultado do esforço realizado ao longo deste percurso. Também dedico este trabalho aos meus pais, a quem agradeço as bases que deram para me tornar a pessoa que sou hoje e a todos os membros do LEFRA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por sempre possibilitar a realização dos meus sonhos. Agradeço por ter me mantido no caminho certo durante este projeto de pesquisa, com saúde e forças para chegar até o final.

Ao meu marido Filipe pelo seu amor incondicional, por sua amizade, companheirismo e por compreender minha dedicação ao trabalho, estando sempre presente nos momentos difíceis com uma palavra de incentivo.

Ao meu filho Raphael por ser minha motivação e meu combustível, que com a sua força e inocência sempre me fortalece e me encoraja a conquistar mais e mais.

Sou grata à minha família pelo apoio concedido durante toda a minha jornada, por todo o esforço investido na minha educação, pelo amor incondicional e pela dedicação. Este trabalho é a prova de que os esforços não foram em vão e valeram a pena.

Deixo um agradecimento especial à minha orientadora Prof^a Fernanda Paulini pela oportunidade, por todo incentivo, auxílio, condições de trabalho e pela dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa. Sou grata pela confiança depositada em mim. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo.

A todos os meus amigos do Laboratório de Endocrinofisiologia e Reprodução Animal (LEFRA), que compartilharam dos inúmeros desafios enfrentados, sempre com o espírito colaborativo. Em especial à Isabella, Beatriz, Luane, Rayane, Yasmin, Juliene, Jéssica e Marcus pelo apoio nos experimentos, essenciais ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à minha amiga Marcella Motta pela amizade construída e por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos desta caminhada.

À professora Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela colaboração na realização das imunohistoquímicas deste trabalho. Assim como a todo o restante do grupo Laboratório de Microscopia Aplicada à Reprodução, pela recepção e auxílio prestado.

À Universidade de Brasília e a todos os professores do PPG em Biologia Animal pela elevada qualidade do ensino oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o período de mestrado. E à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo auxílio destinado ao laboratório.

A vocês minha eterna gratidão!

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”

Henry Ford

RESUMO

Os agentes quimioterápicos e a irradiação utilizados em tratamentos agressivos de combate ao câncer podem levar à insuficiência ovariana prematura. Uma técnica promissora para preservar a fertilidade feminina e restaurar a função endócrina ovariana é a criopreservação do tecido ovariano, antes do tratamento oncológico, seguida de transplante, após a remissão total da doença. No entanto, o estresse decorrente dos processos de criopreservação e descongelamento pode levar a alterações e/ou danos à estrutura e funcionalidade mitocondrial. Além disso, grande parte dos folículos são perdidos ao longo do intervalo isquêmico que ocorre entre o transplante e a neovascularização tecidual. Nesse cenário, o objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade mitocondrial em tecido ovariano de camundongos submetidos à criopreservação de congelamento lento, seguida de transplante e, também, avaliar o efeito da administração de eritropoietina na sobrevivência folicular. Na fase I, amostras de tecido ovariano de camundongos (n=20) (*Swiss nu / nu*) foram submetidas a quatro condições diferentes: Fresco, Transplante Fresco, Criopreservado e Transplante Criopreservado. O tecido ovariano foi criopreservado por congelamento lento e armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C) por 7 dias. Imediatamente após o descongelamento, o tecido ovariano foi transplantado e recuperado após 7 dias. As amostras foram submetidas à análise histológica e as taxas de consumo de oxigênio determinadas por meio de Respirometria de Alta Resolução. Para avaliação do efeito da administração de eritropoietina (EPO), na fase II, os camundongos foram divididos em três grupos: Grupo Controle (n=10), Grupo EPO (n=10) e Grupo Salina (n=10). Cada fêmea do Grupo Controle recebeu o transplante de dois hemiovários criopreservados, na região subcutânea dorsal. As fêmeas do Grupo EPO receberam 500 UI/kg de EPO, via intraperitoneal, administrada em duas doses de 250 UI/Kg cada (12/12 horas, BID), durante cinco dias consecutivos, dois dias antes da ovariohisterectomia (OSH), no dia da OSH e dois dias após a OSH. As fêmeas do Grupo Salina receberam solução fisiológica 0,9% estéril, via intraperitoneal (12/12 horas, BID), no mesmo esquema e no mesmo volume total da EPO recebida pelo Grupo EPO. A retirada dos fragmentos foi realizada aos 7 e 14 dias após o transplante. Os resultados da oximetria demonstraram um consumo de oxigênio relevante em todas as amostras analisadas, responsivo a todos os reagentes utilizados no protocolo SUIT, embora tenha ocorrido uma redução significativa da função mitocondrial em relação ao tecido ovariano fresco. Essa diminuição na atividade mitocondrial se deu conforme o tipo de tratamento a qual o tecido ovariano foi submetido (criopreservação e/ou transplante). O efeito da criopreservação no metabolismo mitocondrial foi menos intenso do que o efeito do transplante, uma vez que o transplante afetou todos os estados mitocondriais. Na fase II, foi demonstrado que a eritropoietina contribuiu para um maior desenvolvimento folicular no D7 pós-transplante, mas que seu efeito não foi prolongado até o D14. Além disso, seu potencial de ação é maior quando administrada após o recebimento dos enxertos. Apesar da diminuição na viabilidade folicular e na atividade mitocondrial, a técnica de criopreservação seguida de transplante de tecido ovariano mostrou-se viável, tanto morfológica quanto metabolicamente, para tentativas de restauração da função ovariana.

Palavras-chave: folículos ovarianos, criopreservação, transplante ovariano, metabolismo mitocondrial.

ABSTRACT

The chemotherapeutic agents and irradiation used in aggressive attempts to combat cancer can lead to premature ovarian failure. A promising technique for preserving female fertility and restoring ovarian endocrine function is cryopreservation of ovarian tissue, before cancer treatment, followed by transplantation after total remission of disease. However, stress resulting from cryopreservation and thawing processes can lead to alterations and/or damage to mitochondrial structure and functionality. In addition, a large part of follicles is lost along the ischemic interval that occurs between transplantation and tissue neovascularization. In this scenario, the aim of this study was to characterize the mitochondrial activity in mice ovarian tissue that underwent slow-freezing cryopreservation, followed by transplantation, and also to evaluate the effect of administration of erythropoietin on follicular survival. In phase I, samples of ovarian tissue from mice (Swiss nu/nu) subjected to four different conditions were analyzed: Fresh, Fresh transplanted, Cryopreserved, and Cryopreserved transplanted. The ovarian tissue was cryopreserved by slow freezing and stored in liquid nitrogen (-196 °C) for 7 days. Immediately after thawing, ovarian tissue was transplanted and recovered after 7 days. Samples were subjected to histological analysis and oxygen consumption rates determined using high-resolution respirometry. In order to evaluate the effect of erythropoietin (EPO) administration, in phase II, the mice were randomly divided into three experimental groups: Control Group (n = 10), EPO Group (n = 10) and Saline Group (n = 10). Each female in Control Group received transplant of two cryopreserved hemi-ovaries in the dorsal subcutaneous region. The females of EPO Group received 500 IU/kg of EPO, intraperitoneally, administered in two doses of 250 IU/Kg each (12/12 hours, BID), for five consecutive days, two days before ovariectomy (OSH), in day of OSH and two days after OSH. The females of Saline Group received 0.9% sterile saline solution, intraperitoneally (12/12 hours, BID), in the same scheme and in the same total volume of EPO received by EPO Group. The retrieval of the fragments was performed at 7 and 14 days after transplantation. The oximetry results showed a relevant oxygen consumption in all analyzed samples, responsive to all reagents used in the SUIT protocol, although there was a significant reduction in mitochondrial function in relation to fresh ovarian tissue. This decrease in mitochondrial activity occurred depending on the type of treatment to which the ovarian tissue was submitted (cryopreservation and/or transplantation). The effect of cryopreservation on mitochondrial metabolism was less intense than observed in transplanted hemi-ovaries since the transplantation affected all the mitochondrial states. In phase II, it has been shown that erythropoietin contributed to greater follicular development in post-transplant D7, but its effect was not prolonged up to D14. Furthermore, its action potential is greater when administered after receiving the grafts. Despite decreased follicular viability and mitochondrial activity, the cryopreservation technique followed by transplantation of ovarian tissue proved feasible, both morphologically and metabolically, for attempts to restore ovarian function.

Key words: ovarian follicles, cryopreservation, ovarian transplantation, mitochondrial metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da foliculogênese em mamíferos 21
- Figura 2.** Desenvolvimento e classificação dos folículos ovarianos 23
- Figura 3.** Representação esquemática do metabolismo energético mitocondrial e da cadeia transportadora de elétrons. (A) Esquema simplificado da respiração celular: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. (B) Complexos enzimáticos localizados na membrana interna da mitocôndria, seus alimentadores (Piruvato/malato, Succinato e ADP) e inibidores (Rotenona, Malonato, Antimicina A e Oligomicina) 35
- Figura 4.** Etapas da eritropoiese. Na medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas pluripotentes se diferenciam em células progenitoras formadoras de crescimento rápido-eritroide (BFU-E = *Burst Forming Unit Erythroid*) e células formadoras de colônia-eritroide (CFU-E = *Colony Forming Unit Erythroid*). Essas células respondem apenas à eritropoietina. A eritropoietina protege os eritroblastos da morte celular programada, facilita a maturação e estimula a sua proliferação. A aquisição de receptores de transferrina conferem a capacidade de incorporação de ferro às células. Ao perder o núcleo, os eritroblastos transformam-se em reticulócitos, ficando na medula óssea até que estejam maduros para serem liberados à circulação, como células vermelhas do sangue (RBCs). O estímulo hormonal continua até que valores normais de oxigenação tecidual sejam atingidos 38
- Figura 5.** Ativação do receptor de eritropoietina (EPOR) pela EPO. Uma única molécula de EPO se liga e estabiliza dímeros do complexo EPOR – JAK2, induzindo uma mudança conformacional que inicia a fosforilação e ativação de JAK2. A JAK2 ativa fosforila resíduos de tirosina em STAT5 e no domínio citoplasmático de EPOR, desencadeando uma cascata de sinalização que ativa várias vias efetoras que contribuem para a atividade biológica. As linhas tracejadas representam a atividade quinase. As principais vias de sinalização ativadas por EPOR incluem MAPK, STAT5 e PI3K/Akt, que conduzem a expressão de genes que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação do progenitor eritroide, bem como, a inibição da sinalização de EPOR. EPO = eritropoietina; EPOR- = receptor de eritropoietina; P = fósforo; JAK2 = Janus quinase 2; MAPK = proteína quinase ativada por mitogênio; PI3K = fosfoinositídeo-3 quinase; STAT5 = transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 40

Figura 6. Curva de congelamento lento utilizada 44

Figura 7. Desenho experimental da fase I - análise da atividade mitocondrial. (A) No dia -14, os animais do Grupo 1 foram submetidos à ovariectomia bilateral (OSH). Os hemiovários foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C). (B) Sete dias após a criopreservação (Dia -7), os hemiovários foram descongelados e transplantados nos animais do Grupo 2. Essas amostras de hemiovários transplantadas formaram o Grupo Transplante Crio. No mesmo procedimento cirúrgico, os animais do Grupo 2 foram submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram imediatamente transplantados nos animais do Grupo 3. Essas amostras de hemiovários formaram o Grupo Transplante Fresco. No mesmo procedimento cirúrgico, os animais do Grupo 3 também foram submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido. Essas amostras de hemiovários foram descongeladas após sete dias e constituíram o Grupo Crio. (C) No dia das análises (Dia 0), os animais do Grupo 4 foram eutanasiados e os hemiovários imediatamente avaliados como tecido fresco (Grupo Fresco). Sete dias após os transplantes (Dia 0), os animais foram eutanasiados e os enxertos recuperados para análises. As amostras de hemiovários de todos os grupos foram distribuídas entre as análises, com metade delas fixadas para análise histológica, e a outra metade usada para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial. OSH = ovariectomia; Crio = criopreservado 47

Figura 8. Desenho experimental da fase II - avaliação do efeito da administração de EPO. (A) Os animais do Grupo Controle foram submetidos à OSH no dia zero do experimento (D0) e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como Controle Fresco e os outros três foram criopreservados. Após sete dias em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados, sendo um imediatamente fixado em paraformaldeído (Controle Crio). No momento cirúrgico da OSH, os animais do Grupo Controle receberam transplante de dois hemiovários (previamente criopreservados e descongelados nas mesmas condições), na região subcutânea dorsal (Tho). (B) Os animais do Grupo EPO receberam 500 UI/kg de eritropoietina (EPO), via intraperitoneal, durante cinco dias consecutivos (D-2, D-1, OSH, D1 e D2). A EPO foi administrada em duas doses de 250 UI/Kg cada (12/12 horas). Após dois dias de administração do hormônio, os animais foram submetidos à OSH e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados. Após sete dias em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados sendo um imediatamente fixado em paraformaldeído (Controle Crio). Na ocasião da OSH, os animais do Grupo EPO receberam transplante dos hemiovários provenientes da OSH realizada nas fêmeas do Grupo Controle (Tho

Grupo Controle). (C) Os animais do Grupo Salina receberam solução fisiológica 0,9% estéril, via intraperitoneal (12/12 horas), durante cinco dias consecutivos (D-2, D-1, OSH, D1 e D2), no mesmo esquema e no mesmo volume total da eritropoietina recebida pelo Grupo EPO. Após sete dias armazenados em nitrogênio líquido, os hemiovários previamente expostos ao hormônio, obtidos através da OSH realizada no Grupo EPO, foram descongelados e transplantados nos animais do Grupo Salina (Tho Grupo EPO). No mesmo cirúrgico, os animais do Grupo Salina foram submetidos à OSH e dos quatro hemiovários obtidos, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados. Após sete dias em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados sendo um imediatamente fixado em paraformaldeído (Controle Crio). Em todos os grupos, os hemiovários transplantados foram recuperados para análise histológica após 7 e 14 dias. Crio = criopreservação, EPO = eritropoietina, Salina = solução fisiológica 0,9%, Tho = transplante dos hemiovários, D = dia, OSH = ovariectomia, h = horas. 51

Figura 9. Resultados da análise da atividade mitocondrial no tecido ovariano. (A-D) Gráfico representativo do consumo de oxigênio do tecido ovariano durante o protocolo de titulação substrato-inibidor-desacoplador (SUIT) (pontas de seta). As taxas de respiração foram medidas a 37 °C. O consumo de O₂ foi medido após adições sequenciais de succinato 10 mM (Succ) e rotenona 0,5 µM (Rot), adenosina difosfato 500 µM (ADP), oligomicina 0,1 µg / ml (Oligo), Cianeto de carbonil-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (0,1 a 0,4 µM) e antimicina A (AA) 1 µM. (E-G) Efeito da criopreservação e/ou transplante no consumo de oxigênio em homogenatos de hemiovários. (E). Taxas médias de consumo de O₂ (OCR) medidas em 5 pontos da avaliação, nomeadamente OCR basal (O₂ consumido devido à oxidação de substratos endógenos); C2-LEAK (O₂ consumido devido à oxidação do succinato exógeno), C2-OXPHOS (OCR relacionado à fosforilação oxidativa), C2-Oligo (OCR não dependente da síntese de ATP), C2-ETS (taxa respiratória máxima resultante da respiração mitocondrial desacoplada). A avaliação da capacidade mitocondrial de reserva (*Spare Capacity*) (F) e do consumo de oxigênio direcionado à síntese de ATP (*ATP-Linked*) (G) também foram avaliadas. Todos os resultados foram expressos como médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/mg, determinado pela massa de tecido. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, em comparação com amostras frescas de tecido ovariano (Grupo Fresco) 53

Figura 10. Folículos morfologicamente normais encontrados no tecido ovariano de camundongos, corados com Hematoxilina/Eosina. (A) Grupo Fresco, (B e E) Grupo Transplante Fresco, (C) Grupo Crio e (D e F) Grupo Transplante Crio. Barra = 100 µm 57

Figura 11. Tecido ovariano corado com Hematoxilina/Eosina. (A) Controle Fresco, (B) Controle Crio, (C) Transplante Grupo Controle, (D) Transplante Grupo EPO, (E) Transplante Salina. Barra = 100µm 62

Figura 12. Principais degenerações encontradas no tecido ovariano criopreservado e transplantado, corado com Hematoxilina/Eosina. (A) ovócito retraído e células da granulosa desorganizadas, (B) ovócito descolado das células da granulosa, (C) estrutura folicular com células da granulosa justapostas e ausência do ovócito. Barra = 100µm 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Resultados estatísticos (*Two-way* ANOVA) dos efeitos da criopreservação e transplante nos estados mitocondriais do tecido ovariano. Uma interação de ambos os tratamentos é observada nos estados mitocondriais Basal, C2-ETS e *Spare Capacity* 55
- Tabela 2. Tabela 2. Número total, número e porcentagem (Média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento em todos os grupos analisados na fase I (análise da atividade mitocondrial) 56
- Tabela 3. Número total, número e porcentagem (média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante dos animais do Grupo Controle 58
- Tabela 4. Número total, número e porcentagem (média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante dos animais do Grupo EPO 59
- Tabela 5. Número total, número e porcentagem (média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante dos animais do Grupo Salina 60
- Tabela 6. Comparação entre os grupos experimentais com relação à porcentagem (média \pm DP) de folículos MN, primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante 60

SIGLAS E ABREVIACOES

AA – Antimicina A

ACPs – Agentes crioprotetores

ADP – Adenosina difosfato

AMH – Hormônio antimülleriano

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BMP15 – Proteína Morfogenética ssea
15

BSA – Bovine Serum Albumin

CEUA – Comissão de Experimentao e
Uso de Animais

CFU-E – Células formadoras de colônia
de eritrócitos

DAB – Diaminobenzidina

DMSO – Dimetilsulfóxido

EG – Etilenoglicol

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

EPO – Eritropoietina

EPOr – Receptor de Eritropoietina

FCCP – Carbonylcyanide-p-
trifluoromethoxyphenyl-hydrazone
concentrations

FCR - Respirometria de alta resoluo

FIV – Fertilizao *in vitro*

FLS – Follicle-like structures

FMN – Folículos morfológicamente
normais

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GDF9 – Fator de Diferenciao do
Crescimento 9

GLI - Glicerol

GnRH – Hormônio liberador de
gonadotrofinas

HE – Hematoxilina e eosina

HEPES – cido 2-[4-(2-hidroxitil)]-
piperazinil] -etanosulfônico

I-M – Intramuscular

IOP – Insuficiência Ovariana Prematura

IR – Isquemia-reperfusão

I-V – Intravenoso

LH – Hormônio luteinizante

M – Molar

MEN – Meio mínimo essencial de Eagle

MIR – Tampão de Respirao

MN – Morfológicamente normais

OCR – O₂ consumption rate

Oligo – Oligomicina

OSH – Ovariohisterectomia

PROH – Propanodiol

ROs – Espécies reativas de oxigênio

ROT – Rotenona

ROX – residual oxygen consumption

SC – subcutânea

SD – Standard deviation

SFB – Soro fetal bovino

SUCC – Succinato

SUIT – Substrate-uncoupler-inhibitor protocol

TGF β – Fator de Crescimento Transformador β

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. | REFERÊNCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1. | Aspectos gerais da foliculogênese em mamíferos | 20 |
| 2.2. | Aspectos gerais da reprodução de camundongos | 25 |
| 2.3. | Métodos utilizados para preservação da fertilidade em mamíferos domésticos | 26 |
| 2.3.1. | Criopreservação | 26 |
| 2.3.1.1. | Criopreservação de tecido ovariano | 29 |
| 2.3.2. | Transplante de tecido ovariano | 31 |
| 2.4. | Considerações metabólicas acerca do tecido ovariano | 33 |
| 2.5. | Principais substâncias utilizadas na manutenção da sobrevivência e funcionalidade folicular no tecido ovariano transplantado | 36 |
| 2.5.1. | Eritropoietina | 37 |
| 3. | JUSTIFICATIVA | 41 |
| 4. | OBJETIVOS | 42 |
| 4.1. | Objetivo Geral | 42 |
| 4.2. | Objetivos Específicos | 42 |
| 5. | MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 5.1. | Animais | 43 |
| 5.2. | Cirurgias e eutanásias | 43 |
| 5.2.1. | Ovariohisterectomia (OSH) | 43 |
| 5.2.2. | Transplante de tecido ovariano | 43 |
| 5.2.3. | Eutanásia | 44 |
| 5.3. | Criopreservação e descongelamento | 44 |
| 5.4. | Análise histológica | 45 |
| 5.5. | Fase I: Análise da atividade mitocondrial | 45 |
| 5.5.1. | Delineamento experimental | 45 |
| 5.5.2. | Consumo de oxigênio mitocondrial | 48 |
| 5.6. | Fase II: Avaliação do efeito da administração de EPO | 49 |
| 5.6.1. | Delineamento experimental | 49 |
| 5.7. | Análise estatística | 52 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 6. | RESULTADOS | 52 |
| 6.1. | Fase I: Análise da atividade mitocondrial | 52 |
| 6.1.1. | Consumo de oxigênio mitocondrial | 52 |
| 6.1.2. | Análise histológica | 56 |
| 6.2. | Fase II: Avaliação do efeito da administração de EPO | 57 |
| 7. | DISCUSSÃO | 63 |
| 8. | CONCLUSÃO | 68 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |

1. INTRODUÇÃO

Os avanços nos tratamentos e prognóstico do câncer aumentaram a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes (MAHMOODI *et al.*, 2014). Entretanto, os agentes quimioterápicos e a irradiação usados em tentativas agressivas de combate ao câncer podem levar à insuficiência ovariana prematura (IOP), que está associada à infertilidade, disfunção endócrina, menopausa precoce e efeitos colaterais, como osteoporose e declínio na qualidade de vida (LEE *et al.*, 2019; SAYAN *et al.*, 2018; revisado por AMORIM *et al.*, 2018; AYUANDARI *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2019).

Diante disso, questões relacionadas à preservação da fertilidade humana têm sido cada vez mais abordadas em todo o mundo, especialmente quando tratamentos oncológicos precisam ser considerados (revisado por LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019). Algumas opções estão disponíveis para o restabelecimento da fertilidade feminina, como a criopreservação de ovócitos, embriões e de tecido ovariano. O uso de ovócitos e embriões é considerado uma excelente alternativa, porém, sua aplicação possui limitações, como a impossibilidade do uso em mulheres pré-púberes, o tempo necessário para a aplicação da técnica, a necessidade de um parceiro fixo ou a doação de esperma e as altas doses de hormônios utilizadas durante a estimulação ovariana (CAMPOS *et al.*, 2016). Assim, uma técnica promissora para preservar a fertilidade feminina e restaurar a função endócrina ovariana é a criopreservação do tecido ovariano, antes do tratamento oncológico, seguida de transplante após a remissão total da doença (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; DOLMANS; DONNEZ; JENSEN; KRISTENSEN; ANDERSEN, 2015). Resultados satisfatórios foram obtidos até o momento, com mais de 200 bebês nascidos vivos (DOLMANS; FALCONE; PATRIZIO, 2020).

Atualmente, o congelamento lento é o método de criopreservação mais utilizado para o tecido ovariano humano (revisado por AMORIM *et al.*, 2018). No entanto, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático rugoso podem ser seriamente afetados durante esse processo (EYDEN *et al.*, 2004; LEN; KOH; TAN, 2019). Vários estudos relataram danos ultraestruturais ao tecido ovariano criopreservado (BORGES *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2020; LUCCI *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004). Em folículos pré-antrais criopreservados de suínos (BORGES *et al.*, 2009), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004) e bovinos (LUCCI *et al.*, 2004), a maioria das mitocôndrias perdeu suas cristas, enquanto algumas continham uma matriz granulada, com uma série de espaços vazios. De acordo com Borges *et al.* (BORGES *et al.*, 2009) o inchaço mitocondrial e a dilatação do retículo endoplasmático podem ser consequências de

modificações no balanço iônico causadas pela alteração da permeabilidade da membrana plasmática, possivelmente resultante de forças osmóticas observadas durante o processo de criopreservação. Embora o edema mitocondrial possa afetar o metabolismo celular, estudos demonstraram que esse processo pode ser revertido (BORGES *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2020).

O estresse decorrente dos processos de criopreservação e descongelamento pode levar a alterações e/ou danos à estrutura e funcionalidade mitocondrial, contribuindo, por exemplo, para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROs) (ACIN-PEREZ *et al.*, 2020; LEN; KOH; TAN, 2019; XU *et al.*, 2010). As ROS podem afetar muitas funções celulares, principalmente por causar danos oxidativos às biomoléculas (ou seja, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) (LEN; KOH; TAN, 2019). Uma vez que o estresse oxidativo determina processos celulares importantes, como apoptose, senescência e sinalização celular alterada (LEN; KOH; TAN, 2019), é importante considerar a análise da atividade mitocondrial como uma das estratégias para medir a eficácia da criopreservação e descongelamento, seguida de transplante.

Além dos danos ultraestruturais, que acometem o tecido ovariano durante a criopreservação, grande parte dos folículos são perdidos ao longo do intervalo isquêmico que ocorre entre o transplante e a revascularização tecidual (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017). Após o transplante, a neovascularização ocorre dentro de 48 horas em camundongos (DISSEN *et al.*, 1994) e, aproximadamente, 5 dias em tecido ovariano humano xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos (VAN EYCK *et al.*, 2010).

As lesões por isquemia-reperfusão (IR), que ocorrem durante esse intervalo, provocam a liberação de citocinas e radicais livres, ativação plaquetária e, conseqüentemente, apoptose. Todos esses eventos ocasionam a perda excessiva de folículos primordiais e a diminuição da sobrevivência do tecido transplantado (COMMIN *et al.*, 2012; KARACA *et al.*, 2009). Fora do seu ambiente natural, os folículos precisam suportar restrições físicas, como o período de isquemia, temperaturas desfavoráveis e a depleção de nutrientes. Assim, a angiogênese também é considerada um fator chave para a sobrevivência dos folículos ovarianos, visto o período de hipóxia que ocorre logo após o transplante (DONFACK *et al.*, 2017).

Nesse cenário, o desenvolvimento de novas abordagens para aprimorar o transplante de tecido ovariano criopreservado, além de minimizar as lesões isquêmicas, pode impactar positivamente o processo, pois apesar dos avanços, ainda há muito a se elucidar a respeito da resposta tecidual (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017; NISOLLE *et al.*, 2000).

A análise de parâmetros metabólicos em tecidos criopreservados e/ou transplantados, como a mensuração do consumo de oxigênio mitocondrial, pode fornecer dados essenciais para

a compreensão do metabolismo celular (ACIN-PEREZ *et al.*, 2020; LEN; KOH; TAN, 2019; NUKALA *et al.*, 2006). Além disso, estudos com antioxidantes tem sido cada vez mais realizados para amenizar o estresse ocasionado pelos procedimentos de criopreservação e transplante, exercendo efeitos através da modulação de genes responsáveis pela sobrevivência celular, apoptose e estresse oxidativo (LEN; KOH; TAN, 2019). Assim, a suplementação com antioxidantes ou fatores que modulam o processo de morte celular podem ser uma solução potencial para reduzir os danos ocasionados ao tecido.

Dessa forma, o hormônio proteico Eritropoetina (EPO) tem sido utilizado por exercer diversos efeitos biológicos, como antioxidante, antiapoptótico e anti-inflamatório (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017). A angiogênese também é indicada como uma das suas funções, sendo observados diversos efeitos protetores sobre o complexo IR, que acontece no tecido ovariano transplantado (KARACA *et al.*, 2009). A EPO atua na prevenção do estresse oxidativo, que ocorre durante o transplante, levando a uma redução da isquemia, auxiliando na revascularização tecidual (SOLEIMANI; HEYTENS; OKTAY, 2011). Entretanto, os resultados não têm um consenso quanto à dosagem, local de aplicação e melhor maneira de administração, sendo ainda incipientes.

Até o momento, a maioria dos estudos estão relacionados à análise morfológica das mitocôndrias e poucos trabalhos consideram a atividade metabólica após a criopreservação (GARCÍA-ROCHE *et al.*, 2018). Além disso, estudos anteriores demonstraram que a EPO reduziu o tempo da neovascularização e promoveu o aumento da sobrevida e funcionalidade tecidual (KARACA *et al.*, 2009; KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017; MAHMOODI *et al.*, 2014). Logo, o objetivo deste estudo foi caracterizar a atividade metabólica do tecido ovariano de camundongos submetidos à criopreservação, seguida de transplante e, também, avaliar o efeito da administração de EPO sobre a sobrevivência folicular, antes ou após a realização do transplante de tecido ovariano criopreservado.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos gerais da foliculogênese em mamíferos

O principal órgão do sistema reprodutor feminino é o ovário. O ovário é constituído por diversos tipos celulares, que desempenham as funções endócrinas e exócrinas do órgão (revisado por FAUSTINO *et al.*, 2011). Com relação à função endócrina, o ovário é uma glândula da qual os esteroides sexuais são liberados no sangue sob a estimulação das

gonadotrofinas hipofisárias, para desempenhar funções muito importantes no corpo feminino, mas também para regular a sequência de processos que levam à ovulação e luteogênese (DEVESA; CAICEDO, 2019). Já a função exócrina do órgão é caracterizada pela produção e liberação dos gametas femininos, os ovócitos (revisado por FAUSTINO *et al.*, 2011).

Em todas as espécies de mamíferos, o ovário é composto por uma região medular e uma cortical. Com exceção dos equinos, que possuem a região cortical na porção central do parênquima, nos demais mamíferos o córtex ovariano está localizado mais externamente (FORTUNE, 2003). É na região cortical que se encontram os folículos ovarianos, em vários estágios de desenvolvimento, e corpos lúteos (FORTUNE *et al.*, 2000). Enquanto, a região medular consiste na porção interna do ovário, sendo caracterizada pela presença de vasos sanguíneos, células musculares, nervos e tecido conjuntivo, tendo como principal função a nutrição e a sustentação do ovário (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

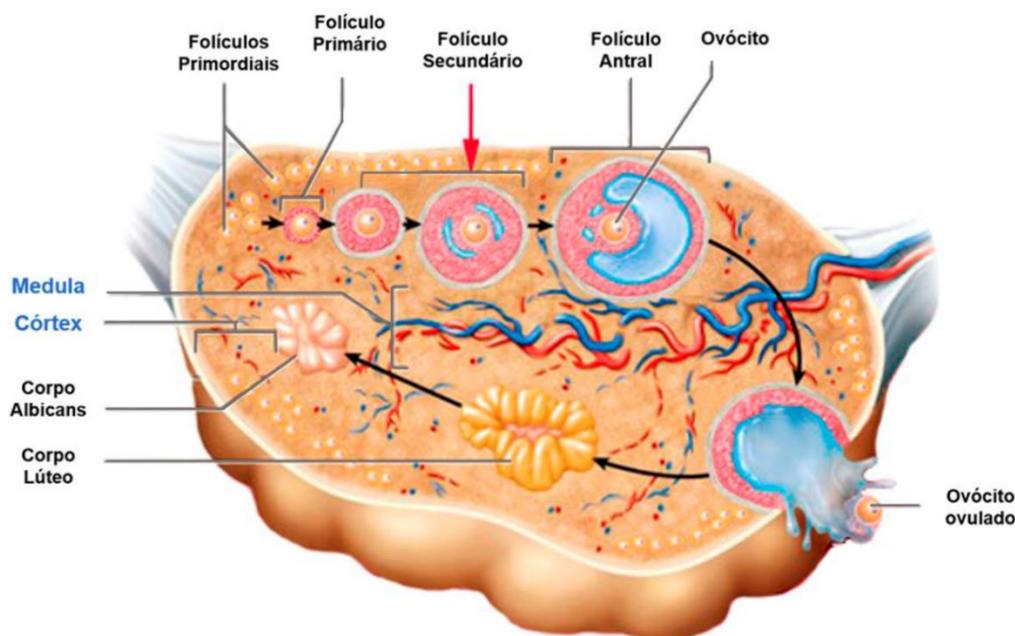


Figura 1. Esquema da foliculogênese em mamíferos.

Fonte: Adaptado de <https://quizlet.com/3675959/anatomy-respiratory-urinary-digestive-reproductive-flash-cards/>

Com relação ao desenvolvimento dos ovócitos, existe um conceito estruturado há décadas na biologia reprodutiva: acredita-se que a produção de ovócitos, na maioria das espécies de mamíferos, cesse antes do nascimento. Ou seja, as fêmeas nascem com um conjunto finito e não renovável de células germinativas, todas estacionadas na meiose I e envolvidas por células somáticas, em estruturas conhecidas como folículos (PEARL; FAIRCHILD, 1921). Assim, ao nascimento, o ovário já contém a reserva de folículos necessários à vida reprodutiva,

sendo constituída por milhares de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e independentes de gonadotrofinas (TELFER; MCLAUGHLIN, 2007).

O que se sabe é que, os folículos primordiais são as principais estruturas funcionais dos ovários e são formados durante o desenvolvimento fetal, sendo compostos por uma única camada de células da granulosa, que circundam o ovócito (DEVESA; CAICEDO, 2019). Entretanto, segundo os autores, mais de 99% dos folículos ovarianos sofrem atresia antes do início da puberdade, sequer atingindo a ovulação. Após a puberdade, em cada ciclo menstrual, um pequeno número de folículos primordiais se desenvolve, até que apenas um folículo, o folículo dominante, libera o ovócito, enquanto os demais folículos, que começaram a se desenvolver junto com o folículo dominante, sofrem um processo de atresia (DEVESA; CAICEDO, 2019).

Diante disso, acredita-se que a atresia folicular está relacionada às baixas concentrações de hormônios hipofisários e, conseqüentemente, de esteroides sexuais, bem como, ao suprimento sanguíneo insuficiente dos folículos em crescimento (DEVESA; CAICEDO, 2019; MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Para que os folículos primordiais passem do estágio quiescente para a fase de crescimento, é necessário que ocorra a ativação folicular (MARTINS *et al.*, 2008), marcando o início do desenvolvimento dos folículos. Entretanto, os mecanismos que controlam o início do crescimento folicular ainda não estão completamente elucidados (FORTUNE, 2003; TELFER; MCLAUGHLIN, 2007). Sabe-se que, em espécies mamíferas, após a ativação o contínuo crescimento folicular é controlado por hormônios gonadotróficos e somatotróficos, como por fatores de crescimento, que agem direta ou indiretamente (FORTUNE, 2003; MARTINS *et al.*, 2008).

Conforme revisado por Yang; Zhu; Jin (2020), ainda não está completamente elucidada a influência da sinalização endócrina e parácrina sobre o crescimento e a diferenciação das células somáticas foliculares, durante a foliculogênese. Porém, sabe-se que o ovócito secreta fatores de crescimento que induzem o desenvolvimento folicular por um processo de sinalização parácrina. Entre os principais fatores de crescimento é possível citar a superfamília do Fator de Crescimento Transformador β (TGF β), que compreende os genes da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP15) e do Fator de Diferenciação do Crescimento 9 (GDF9) (PAULINI; MELO, 2011). Esses fatores são essenciais para a ativação dos folículos primordiais, participando, posteriormente, de todas as etapas do desenvolvimento folicular. Particularmente, o GDF9 é necessário para otimizar o microambiente ovocitário, o crescimento e a atresia dos folículos, a ovulação e a fertilização. Já o BMP15 tem como alvo as células da

granulosa, estimulando a sua proliferação e modulando a expressão de hormônios esteroides (PAULINI; MELO, 2011).

Desta forma, a foliculogênese é definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, a começar pela constituição do folículo primordial, até atingir o estágio de folículo antral, finalizando com a ovulação de um ovócito maduro (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011), como demonstrado na Figura 1. Alguns autores dividem a foliculogênese em duas fases: fase pré-antral, na qual ocorre a ativação dos folículos e o seu crescimento (folículos primordiais, primários e secundários) e fase antral, com o início e finalização do crescimento dos folículos terciários ou antrais (Figura 2) (MARTINS *et al.*, 2008).

Os folículos ovarianos podem ser classificados em estágios de desenvolvimento, conforme o seu tamanho e dependência em relação aos hormônios gonadotróficos (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011). Com relação ao tamanho, os folículos são classificados em: folículos primordiais, são aqueles que contêm um ovócito esférico, com núcleo grande, circundados apenas por uma camada de células pequenas e achatadas, que são precursoras da granulosa, conforme indicado na Figura 2 (PICTON, 2001; PICTON; GOSDEN, 2000). Após a ativação, os folículos primordiais se diferenciam em folículos primários, apresentando semelhantes características aos primordiais, porém, possuem uma única camada de células da granulosa em formato cuboide (PICTON, 2001; PICTON; GOSDEN, 2000). A camada única de células cuboidais entra em divisão e diferenciação, formando várias camadas de células da granulosa e o folículo passa a ser denominado de folículo secundário. A partir do momento que se observa uma área de líquido folicular (antro), os folículos passam a ser classificados como folículos antrais (LEITÃO *et al.*, 2009; PICTON, 2001; PICTON; GOSDEN, 2000).

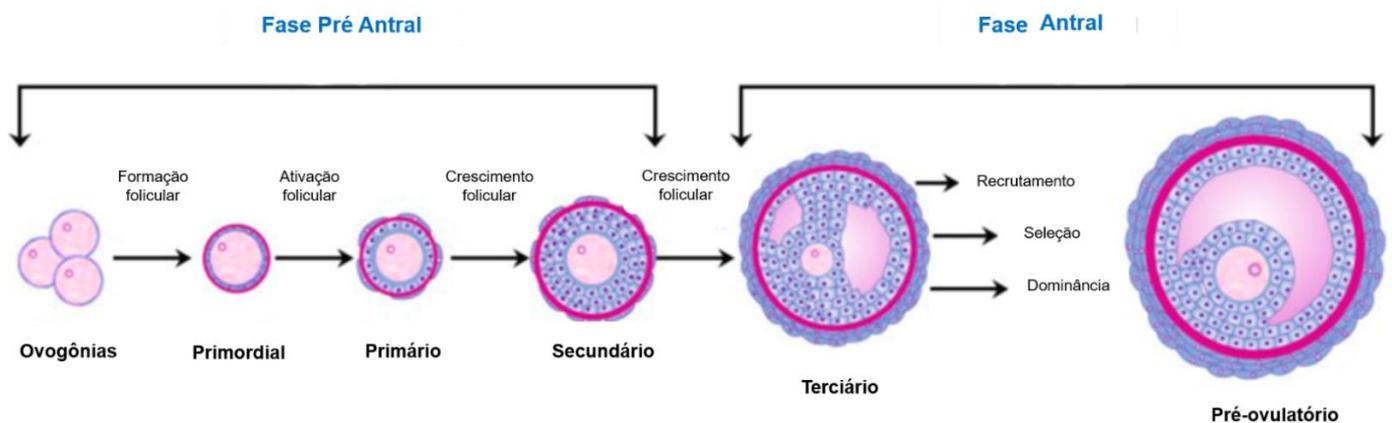


Figura 2. Desenvolvimento e classificação dos folículos ovarianos.

Fonte: Adaptado de (ARAÚJO *et al.*, 2014)

Com relação à dependência aos hormônios gonadotróficos, os estágios iniciais do desenvolvimento folicular são independentes de gonadotrofinas, mas contam com a secreção parácrina e ação intensa de fatores de crescimento e citocinas (FORTUNE, 2003). Neste estágio, há a ativação dos folículos primordiais e sua diferenciação em folículos primários, secundários e antrais iniciais. Os folículos antrais iniciais são responsivos, mas não dependentes de gonadotrofinas (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011). Por fim, no último estágio, os folículos antrais continuam a crescer e se tornam dependentes dos hormônios gonadotróficos, até que ocorra o recrutamento, a seleção, a maturação e a ovulação, como indicado na Figura 2 (MCGEE; HSUEH, 2000).

Conforme revisado por Fortune; Rivera; Yang (2004), havia a concepção de que a regulação da função ovariana seria realizada por fatores endócrinos, principalmente os hormônios gonadotróficos, que estimulam o crescimento e a diferenciação folicular e lútea, incluindo a secreção de hormônios ovarianos (esteroides e inibinas), que atuam em vários órgãos-alvo, envolvidos com funções reprodutivas femininas. Porém, segundo os autores, a descoberta de que a ação hormonal é mediada por receptores específicos e que o tipo e o número desses receptores nas células foliculares variam à medida que os folículos se desenvolvem, elucidou como os folículos em diferentes estágios de desenvolvimento podem responder de maneira distinta ao mesmo estímulo gonadotrófico.

Os sinais que iniciam o crescimento e a ativação folicular ainda são mal compreendidos (EPPIG, 2018). Segundo os autores, a ativação folicular pode ser controlada pelo equilíbrio entre fatores inibitórios e estimuladores. Assim, o início do crescimento pode depender de mudanças nesse equilíbrio dentro do microambiente de um folículo individual. O que se sabe é que a retomada do crescimento das células da granulosa, bem como, o desenvolvimento da zona pelúcida ao redor do ovócito em folículos primários ou secundários, são um dos primeiros sinais da ativação folicular (MARTINS *et al.*, 2008). Além da mudança no formato dessas células, ocorre também um aumento do volume citoplasmático e um aumento considerável do núcleo do ovócito (MARTINS *et al.*, 2008). Contudo, a regulação da proliferação celular, diferenciação e do processo degenerativo de atresia, que ocorre com os folículos ovarianos, é consequência de uma complexa interação entre fatores locais e endócrinos, que ocorre em folículos mais adiantados (SETTI *et al.*, 2004). Fica evidente, assim, o papel das gonadotrofinas e fatores de crescimento no que se refere ao desenvolvimento dos folículos ovarianos (SETTI *et al.*, 2004).

Com relação aos hormônios gonadotróficos secretados pela hipófise, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH) são fundamentais para o processo de foliculogênese e para a produção e secreção dos hormônios ovarianos (estrógeno e progesterona), que irão promover as transformações endometriais durante o ciclo estral (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011). O FSH atua nas células da granulosa estimulando a sua proliferação e diferenciação, bem como, também é responsável pela síntese de esteroides e pela expressão de receptores para o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e LH, sendo crucial para o desenvolvimento dos folículos antrais (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011; MARTINS *et al.*, 2008). O LH é responsável por estimular a esteroidogênese nas células da teca, onde há a conversão do colesterol em testosterona, que sob o efeito do FSH, é convertida em 17 β -estradiol, pelas células da granulosa. Além disso, o LH exerce um papel fundamental na fase final da maturação, estando o seu pico de concentração relacionado à ovulação (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011).

À medida que o crescimento dos folículos antrais progride, aquele com maior resposta ao FSH se torna dominante, inibindo assim, o desenvolvimento concomitante dos folículos ovarianos (TELFER; MCLAUGHLIN, 2011). Ao mesmo tempo, as células da granulosa começam a expressar receptores LH, sob a influência do FSH. Nesse momento, as concentrações de inibina e estradiol aumentam, ocasionando uma diminuição na liberação de FSH pela glândula hipófise. Então, FSH e LH agem em sinergia para apoiar o desenvolvimento folicular e a ovulação (PAULINI; MELO, 2011). Como uma forma de feedback negativo, essa diminuição na disponibilidade de FSH induz os folículos subordinados a sofrer atresia e degeneração. Por fim, o aumento na secreção de estrógeno ocasiona o pico pré-ovulatório de LH, promovendo a ovulação do folículo dominante e a formação do corpo lúteo (TELFER; MCLAUGHLIN, 2007, 2011).

2.2. Aspectos gerais da reprodução de camundongos

Os camundongos são roedores de pequeno porte, com hábitos noturnos, sendo caracterizados como uma espécie cosmopolita. São membros da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*.

A introdução dos camundongos como modelo de experimentação animal nas pesquisas científicas, deve-se, principalmente, ao fato de ser um animal pequeno, de fácil manuseio, ser muito prolífero, com período de gestação curto (cerca de 19-21 dias), fácil domesticação e manutenção (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Conforme os autores, o

camundongo entra na puberdade por volta dos 42 dias de idade, tornando-se capacitado para iniciar a vida reprodutiva aos 60 dias de idade, embora os efeitos hormonais já estejam presentes em ambos os sexos por volta dos 30 dias de idade. O ciclo estral completo desses animais tem a duração de aproximadamente cinco dias, ou seja, a cada cinco dias ocorre a ovulação de um ovócito maduro. Ainda, o ciclo estral divide-se em proestro, fase em que se inicia o desenvolvimento folicular, culminando no estro (cio); metaestro e diestro, representando a fase luteínica do ovário (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Durante décadas, várias espécies de roedores têm sido utilizadas como modelo para o estudo da função reprodutiva em mulheres (MYERS *et al.*, 2004). Nesse contexto, os camundongos *Swiss nu/nu* têm sido utilizados devido à probabilidade reduzida de rejeição dos transplantes (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007), tornando-se ideal para pesquisas que envolvem o transplante de tecido ovariano. Estes animais apresentam o gene recessivo autossômico (*Foxn1*) situado no cromossomo 11 e como consequência, possuem o sistema imune suprimido devido a uma falha na diferenciação do timo, acarretando uma deficiência na produção de linfócitos T (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). A imunodeficiência provocada pelo gene recessivo *Foxn1* tem como efeito a ausência de pelos e a baixa produção de leite nesses animais, consequentemente, sua reprodução é reduzida. Geralmente, os camundongos *Swiss nu/nu* são menores, crescem mais lentamente, são menos férteis e devem ser mantidos em condições livre de patógenos (PRITCHETT; TAFT, 2007).

2.3. Métodos utilizados para preservação da fertilidade em mamíferos domésticos

2.3.1. Criopreservação

Nas últimas décadas, a criopreservação tem ganhado destaque mundial na reprodução assistida (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019). Basicamente, esta técnica consiste no armazenamento e preservação de materiais biológicos sob temperaturas criogênicas (inferiores a -150 °C), nas quais as reações químicas, os processos biológicos e as atividades intra e extracelulares estão substancialmente reduzidas. Porém, a viabilidade e a integridade celular da amostra ainda estão garantidas, para que o seu desenvolvimento normal possa ser restabelecido, após um período de estocagem (ARAV; PATRIZIO, 2019; CARVALHO *et al.*, 2012).

Conforme revisado por Dalcin & Lucci (2010), são consideradas “zonas de perigo” as temperaturas localizadas entre 0 °C e 37 °C, pois podem acarretar danos irreversíveis às amostras biológicas devido à refrigeração, tais como alterações estruturais e funcionais nas

membranas celulares. Em temperaturas entre 0 °C e -25 °C, a atividade enzimática das células ainda está presente, embora reduzida (BAKHACH, 2009). Ainda, conforme Bakhach (2009), em temperaturas entre -5 °C e -80 °C as trocas físico-químicas são minimizadas e correspondem à principal fase de injúrias causadas por cristais de gelo. Diante disso, para maior preservação da amostra biológica, a tempo indeterminado, as temperaturas de estocagem devem estar abaixo de -150 °C, pois correspondem à fase de menor ocorrência de danos (BAKHACH, 2009; DALCIN; LUCCI, 2010).

Sabe-se que, todas as soluções líquidas tendem ao estado sólido quando submetidas às temperaturas abaixo do seu ponto de fusão (BAKHACH, 2009). Nesse sentido, o mesmo autor afirma que em amostras biológicas, a menor temperatura possível na qual um líquido se mantém abaixo do seu ponto de fusão, sem passar para o estado sólido, é o ponto de nucleação homogênea do gelo, em torno de -40 °C. A esta temperatura, as moléculas de água formam um pequeno núcleo de gelo, termodinamicamente capaz de produzir um cristal. Esta situação pode iniciar um processo maciço de agregação das moléculas de água, propagando os cristais de gelo por toda a solução (ARAV; PATRIZIO, 2019; BAKHACH, 2009).

Com exceção das técnicas que utilizam temperaturas de congelamento muito rápidas, a formação de gelo acontece preferencialmente no meio extracelular. Quando o gelo extracelular se forma primeiro, é criado um gradiente osmótico entre o exterior da célula, parcialmente congelado, e o interior descongelado, culminando na migração das moléculas de água para o meio extracelular, na tentativa de reestabelecer o equilíbrio osmótico (BENSON, 2008). A formação de gelo extracelular exerce um efeito crioprotetor, visto que, reduz indiretamente o potencial de nucleação do gelo no interior da célula ao diminuir a quantidade de água disponível nesse compartimento (BAKHACH, 2009). Entretanto, a nucleação do gelo afeta a integridade estrutural, osmótica e coligativa das células, causando rupturas físicas e lesões mecânicas (ARAV; PATRIZIO, 2019; BAKHACH, 2009; DALCIN; LUCCI, 2010).

Em contrapartida, se a taxa de resfriamento for muito lenta, danos coligativos podem ocorrer devido a concentração excessiva de solutos na célula, que comprometem a função celular (BENSON, 2008). Diante disso, a estratégia utilizada para moderar os efeitos deletérios da formação de gelo e os danos coligativos consiste em estabelecer um controle preciso da taxa de resfriamento, além de, utilizar agentes crioprotetores (ACPs) (ARAV; PATRIZIO, 2019).

Além de ocorrer a formação de cristais de gelo, ao se agregarem, as moléculas de água liberam energia na forma de calor, fenômeno denominado calor latente (BAKHACH, 2009; BENSON, 2008). Uma vez liberado, o calor latente é novamente transferido para os cristais

recém-formados e a consequência desse processo é um degelo momentâneo, seguido de novo congelamento, em uma sequência que se estende por toda a espessura da amostra, e que pode provocar graves danos celulares (ARAV; PATRIZIO, 2019). Conforme Arav e Patrizio (2019), os danos oriundos da liberação do calor latente podem ser amenizados reduzindo o tamanho da amostra, mantendo alta a proporção entre superfície e volume, para liberar e remover o calor mais rapidamente.

Diante do exposto, os métodos de criopreservação mais utilizados na atualidade são classificados em congelamento lento e vitrificação. O congelamento lento é considerado o método mais convencional de criopreservação e tem sido amplamente utilizado para a conservação de tecido ovariano em diferentes espécies (revisado por AMORIM *et al.*, 2018). Entretanto, é possível verificar, também, a importância e aplicabilidade da vitrificação para a criopreservação desse tipo de tecido (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019).

No congelamento lento, o tecido é resfriado a temperaturas abaixo do seu ponto de congelamento, com a redução gradual da temperatura, a uma taxa de resfriamento controlada, para que a desidratação da amostra e o congelamento aconteçam lentamente (ARAV; PATRIZIO, 2019). Ainda, são utilizadas baixas concentrações de ACPs e um controlador de temperatura programável (CASTRO *et al.*, 2011). Antes do congelamento, o uso de soluções crioprotetoras capazes de penetrar no tecido, atingindo todas as células, cria uma proteção contra possíveis danos causados pela formação dos cristais de gelo (BENSON, 2008).

Ao contrário do congelamento lento, a vitrificação envolve um processo muito mais rápido, que emprega altas concentrações de ACPs, e é considerada um método relativamente mais barato, uma vez que não requer equipamentos especiais, embora necessite de profissionais qualificados para executar a técnica (BENSON, 2008). Ao passar pelo processo de vitrificação, a célula não sofre desidratação, pois o resfriamento da amostra acontece rapidamente e, devido às altas concentrações de ACPs, a formação de cristais de gelo é evitada, o que ocasiona a indução de um estado vítreo sólido sem cristalização (ARAV; PATRIZIO, 2019).

Em qualquer um dos métodos de criopreservação, é indispensável a presença de ACPs: substâncias orgânicas, com baixa toxicidade, que têm a função de proteger o material biológico contra a desidratação, o resfriamento e os danos causados pela redução extrema da temperatura (SANTOS *et al.*, 2008). Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes.

Os ACPs intracelulares ou penetrantes são substâncias de baixo peso molecular, que reduzem as lesões celulares causadas pelo congelamento (CASTRO *et al.*, 2011). Esses ACPs possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática das células e substituir parte da água intracelular, atuando no processo de desidratação ao se ligar aos átomos de hidrogênio das moléculas de água. Dentre os mais utilizados para a criopreservação de embriões, ovócitos e tecido ovariano, estão o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol (PROH), o etilenoglicol (EG) e o glicerol (GLI), que agem por meio de diferentes mecanismos (revisado por FAUSTINO *et al.*, 2011).

No que se refere aos ACPs extracelulares ou não penetrantes, como, por exemplo, a sacarose, rafinose, trealose, e as proteínas presentes no soro fetal bovino (SFB), são substâncias de alto peso molecular, que não penetram na membrana plasmática (CASTRO *et al.*, 2011). Ao permanecerem no meio extracelular, esses ACPs protegem as membranas ligando-se às cabeças dos grupos fosfolipídicos, além de retirar a água livre, levando à desidratação do meio intracelular por efeito osmótico, evitando a formação de cristais de gelo (DALCIN; LUCCI, 2010; SANTOS *et al.*, 2008).

Assim, a presença de substâncias crioprotetoras aumenta a viscosidade da solução, proporcionando um equilíbrio osmótico que reduz, consideravelmente, os danos causados às células referentes a nucleação e agregação de cristais de gelo, bem como ao choque osmótico (DALCIN; LUCCI, 2010). No entanto, altas concentrações de ACPs podem induzir lesões celulares por efeitos tóxicos. Porém, esse risco pode ser limitado pela redução do tempo de exposição da amostra aos crioprotetores (ARAV; PATRIZIO, 2019).

De forma geral, um bom protocolo de criopreservação compreende a utilização dos dois tipos de ACPs (intra e extracelular) e cinco diferentes etapas: (1) exposição ao agente crioprotetor ou período de equilíbrio; (2) resfriamento; (3) armazenamento; (4) descongelamento ou aquecimento e (5) remoção do agente crioprotetor (revisado por FAUSTINO *et al.*, 2011).

2.3.1.1. Criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação, seguida do transplante de tecido ovariano, vem se tornando uma técnica cada vez mais promissora para a recuperação da fertilidade (revisado por DONNEZ; DOLMANS, 2013; JENSEN; KRISTENSEN; ANDERSEN, 2015). Com estas opções é possível proteger e restaurar a fertilidade feminina, em pacientes adultas ou pré-púberes, além de restabelecer a função endócrina dos ovários (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019). Resultados promissores foram obtidos até o momento, com mais de

200 bebês nascidos vivos (DOLMANS; FALCONE; PATRIZIO, 2020). Neste cenário, cada vez mais evidências apontam para a necessidade de preservação do tecido ovariano, especialmente em pacientes oncológicos (revisado por LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019).

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica de grande potencial na manutenção da funcionalidade do ovário e na conservação dos gametas femininos, com a obtenção de ovócitos viáveis para posterior fertilização (MATOS; BEZERRA; VICENTE, 2011). Em geral, o tecido ovariano é criopreservado em tiras finas ou em pequenos cubos, para que os ACPs possam exercer o seu efeito protetor em todo o tecido. Entretanto, ainda não há um consenso quanto ao melhor método (congelamento lento ou vitrificação), as dimensões dos fragmentos e os agentes crioprotetores, que possam aperfeiçoar ainda mais a técnica (revisado por LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019; MATOS; BEZERRA; VICENTE, 2011).

O primeiro relato de criopreservação e transplante de tecido ovariano com êxito foi descrito em camundongos em 1953 (ARAV; PATRIZIO, 2019). Desde então, isso também pôde ser observado em outras espécies, como em ovinos e humanos (revisado por MATOS; BEZERRA; VICENTE, 2011). Na espécie humana, uma das vantagens de criopreservar o tecido ovariano é que a sua obtenção não depende da idade e fase do ciclo menstrual da mulher, além disso, é possível alcançar o restabelecimento da fertilidade e da função endócrina do ovário, após o autotransplante (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2016). Essas vantagens são importantes para mulheres que precisam iniciar imediatamente o tratamento contra o câncer, para meninas que ainda não tenham atingido à puberdade, para mulheres que não possuem parceiros para a doação dos gametas masculinos e, ainda, para aquelas pacientes que desejam retardar a menopausa (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Entretanto, criopreservar o tecido ovariano possui limitações. Uma delas está relacionada à composição do tecido, que inclui diferentes tipos celulares e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, o que poderia exigir diferentes condições para a técnica (CAMPOS *et al.*, 2016). Além disso, ao criopreservar fragmentos do córtex ovariano, apenas uma fração da reserva ovariana de um indivíduo está sendo considerada, o que pode indicar uma densidade folicular baixa para a restauração da fertilidade (DONFACK *et al.*, 2017).

Conforme Donfack *et al.* (2017), o uso de ovócitos e embriões é uma alternativa estabelecida e padronizada. No entanto, esses métodos são apropriados apenas para mulheres pós-púberes e para aquelas as quais a terapia do câncer pode ser adiada. As principais limitações de criopreservar ovócitos e embriões são o tempo necessário para a aplicação da técnica, as

altas doses hormonais utilizadas durante a estimulação ovariana e a impossibilidade do uso em crianças e adolescentes. Além disso, é necessário que se tenha um parceiro ou então, que aconteça a doação dos gametas masculinos para a fertilização (DONFACK *et al.*, 2017).

Após a criopreservação e o descongelamento do tecido ovariano, há algumas maneiras para a retomada da fertilidade: o transplante e o cultivo *in vitro*. Porém, alguns aspectos não estão completamente elucidados e, devido a isso, novas pesquisas são necessárias para padronizar ambas as técnicas (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; MATOS; BEZERRA; VICENTE, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.3.2. Transplante de tecido ovariano

A conduta dos transplantes é realizada com a retirada de células, tecidos ou órgãos de um indivíduo (doador), com a decorrente inserção no mesmo ou em outro indivíduo (receptor). Esta técnica tem a finalidade de restabelecer uma função do organismo que foi perdida. Nesse sentido, o autotransplante de tecido ovariano é realizado com o objetivo de recuperar as funções endócrinas e exócrinas do ovário, na tentativa de manter a função reprodutiva de mulheres jovens e adultas em tratamento contra o câncer, sendo considerada, atualmente, a única opção disponível para sobreviventes pré-púberes (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2012; DONFACK *et al.*, 2017; DONNEZ; DOLMANS, 2014).

Assim, a função ovariana é mensurada pelo crescimento folicular, recorrência da menstruação e, o mais importante, por gestações bem-sucedidas (revisado por AMORIM *et al.*, 2018). O primeiro nascimento alcançado em humanos decorrente da criopreservação e transplante de tecido ovariano foi relatado por Donnez *et al.* (2004) (DONNEZ, *et al.*, 2004), sendo considerado um marco na medicina reprodutiva. Estudos investigaram a melhor maneira para assegurar a preservação da fertilidade em humanos (DONNEZ; DOLMANS, 2017), primatas não humanos (AMORIM *et al.*, 2013), ovinos (SANTOS, 2005), bovinos (LUCCI *et al.*, 2004) ou em animais de laboratório (DIAZ-GARCIA *et al.*, 2018). Desse modo, o transplante de tecido ovariano é considerado, por alguns autores, como uma técnica viável, embora a estratégia ainda seja vista como experimental (LEE *et al.*, 2019).

De fato, de acordo com Donnez & Dolmans (2015), apesar do número de transplantes realizados em todo o mundo ainda ser desconhecido, excelentes resultados foram observados nos Estados Unidos, Bélgica, França, Espanha, Dinamarca e Israel. Além disso, essa técnica possui uma excelente taxa de restauração da função ovariana (95%) e uma taxa razoável de gestação (23% a 41%), sendo observado, em alguns casos, que a vida útil do enxerto pode ser

superior a 10 anos (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; DONNEZ; DOLMANS, 2013, 2014). Segundo Amorim et al. (2018), é difícil prever com exatidão a vida útil dos enxertos, pois vários aspectos precisam ser considerados, como, por exemplo, as técnicas utilizadas, a idades das mulheres, o tamanho do ovário e da reserva folicular, bem como a existência de comorbidades. Mesmo quando os métodos são eficazes e consistentes, as circunstâncias femininas individuais permanecerão.

Conforme o local do transplante, o procedimento pode ser classificado como ortotópico, quando o transplante acontece no seu local de origem ou muito próximo ao local natural, com condições ambientais semelhantes; ou heterotópico, quando o transplante é realizado em outros locais anatômicos, que não o seu de origem (DEMEESTERE *et al.*, 2009). Devido à plasticidade natural do ovário, os fragmentos de tecido ovariano podem ser transplantados em diferentes locais, tais como a pelve (DEMEESTERE *et al.*, 2009), regiões subcutâneas, cápsula renal e bolsas de gordura (YOUM *et al.*, 2015). De acordo com o receptor do transplante, este ainda pode ser classificado como xenotransplante, quando realizado em espécies diferentes, alotransplante, quando realizado na mesma espécie, porém, em animais distintos, ou ainda, autotransplante, quando realizado no mesmo indivíduo (DONFACK *et al.*, 2017).

Segundo Donnez & Dolmans (2015), a principal vantagem do transplante ortotópico é a possibilidade da concepção natural ocorrer, sem a intervenção de técnicas de reprodução assistida, pois, conforme os autores, o sítio anatômico de origem proporciona o ambiente ideal para o desenvolvimento folicular (temperatura, pressão, fatores parácrinos e suprimento sanguíneo), quando comparados a sítios heterotópicos. Entretanto, o reduzido número de fragmentos que poderiam ser transplantados, devido ao tamanho do ovário e, por ser um procedimento mais invasivo e de difícil acesso, o transplante ortotópico pode acarretar complicações (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; DEMEESTERE *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o transplante heterotópico vem ganhando destaque, pois além de ser viável, ele é considerado um procedimento menos invasivo, aumenta os números de possíveis fragmentos transplantados, promove fácil acessibilidade e remoção dos enxertos (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; DONFACK *et al.*, 2017). Contudo, a concepção natural fica impossibilitada, sendo necessário o uso de técnicas de fertilização *in vitro*.

Conforme revisado por Amorim et al. (2018), a viabilidade positiva do enxerto, incluindo atividades hormonais e o desenvolvimento folicular, já foram relatados em ambos os tipos de transplante. No entanto, a maioria das gestações ocorreram nas pacientes submetidas

ao transplante ortotópico, sugerindo a superioridade desse local para a restauração da fertilidade.

Independentemente do local do transplante, o tecido ovariano passará por um período de isquemia, sendo caracterizado por uma diminuição ou suspensão da irrigação sanguínea local, até que a formação de novos vasos sanguíneos possa ser estabelecida (DONFACK *et al.*, 2017; KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017). Diante disso, lesões de isquemia-reperfusão (IR) podem ocorrer no tecido transplantado, devido à restauração do fluxo sanguíneo após um período de isquemia, processo este, que continua sendo um desafio para o sucesso da técnica. Assim, a escolha do local do transplante é um fator essencial para a viabilidade do enxerto e possível competência ovocitária (DEMEESTERE *et al.*, 2009).

Alguns fatores são cruciais para que o estabelecimento dessa técnica em humanos possa ser, de fato, consolidado. A perda folicular é uma das principais limitações e pode ser ocasionada por diversos motivos, principalmente por lesões de IR (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017). Conforme os autores, essas lesões podem promover a liberação de citocinas, radicais livres, ativação plaquetária e apoptose. Assim, todos esses eventos levam a uma perda dos folículos primordiais e a diminuição da viabilidade do transplante. Além de questões como a espessura ideal dos fragmentos corticais, para garantir uma perfusão adequada dos ACPs e a sobrevivência do enxerto; a utilização de fatores de crescimento, vitaminas e/ou nutrientes que reduzam a isquemia e promovam a revascularização dos transplantes, assim como, o local mais adequado para o transplante, são aspectos que ainda não foram completamente definidos (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017).

Nesse sentido, várias abordagens estão sendo utilizadas para minimizar a lesão isquêmica nos enxertos ovarianos, que ocorre durante o período pós-transplante inicial e o estabelecimento da angiogênese (MAHMOODI *et al.*, 2014). A escolha do local do transplante (SOLEIMANI; HEYTENS; OKTAY, 2011), o uso de antioxidantes (SAYYAH-MELLI *et al.*, 2012), de fatores angiogênicos (COMMIN *et al.*, 2012) e fatores hormonais (revisado por YANG, H. *et al.*, 2008) podem desempenhar um papel importante no sucesso do transplante.

2.4. Considerações metabólicas acerca do tecido ovariano

Considerando que a fertilidade feminina é uma característica complexa, que combina vários processos, tais como, nutrição, estado fisiológico, antecedentes genéticos, idade, dentre outros. Todos esses parâmetros podem influenciar não apenas os processos metabólicos globais na fêmea, mas também afetam a qualidade dos ovócitos e embriões (WARZYCH; LIPINSKA,

2020). Assim, sabendo que o ovócito é a maior célula dos mamíferos, seu desenvolvimento consome mais energia em comparação às células somáticas. No entanto, como vantagem, essa célula é capaz de fornecer substratos suficientes para a produção de energia necessária ao início do desenvolvimento embrionário (WARZYCH; LIPINSKA, 2020). Logo, o metabolismo energético bem equilibrado do ovócito definitivamente afetará o desenvolvimento e a qualidade do embrião.

As mitocôndrias são organelas de dupla membrana, encontradas em células eucarióticas, essenciais para o metabolismo aeróbico, produção de ATP na célula, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), regulação das concentrações intracelulares de cálcio e apoptose (GARCÍA-ROCHE *et al.*, 2018; NUKALA *et al.*, 2006). Importantes reações químicas ocorrem no interior das mitocôndrias, a exemplo do ciclo de Krebs, que transfere elétrons derivados da glicólise (piruvato) para os carreadores NAD⁺ e FAD (Figura 3A) (SANTOS, 2018). Quando são reduzidos (NADH e FADH₂), esses compostos são utilizados como substrato para a fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês oxidative phosphorylation), que ocorre através da cadeia transportadora de elétrons (CTE). A CTE é composta por quatro complexos enzimáticos, que estão localizados na membrana mitocondrial interna (Figura 3B) (SANTOS, 2018). A Figura 3 representa, esquematicamente, o metabolismo energético mitocondrial a partir da quebra da glicose, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, assim como, ilustra a cadeia transportadora de elétrons e a produção de ATP, com seus substratos e inibidores.

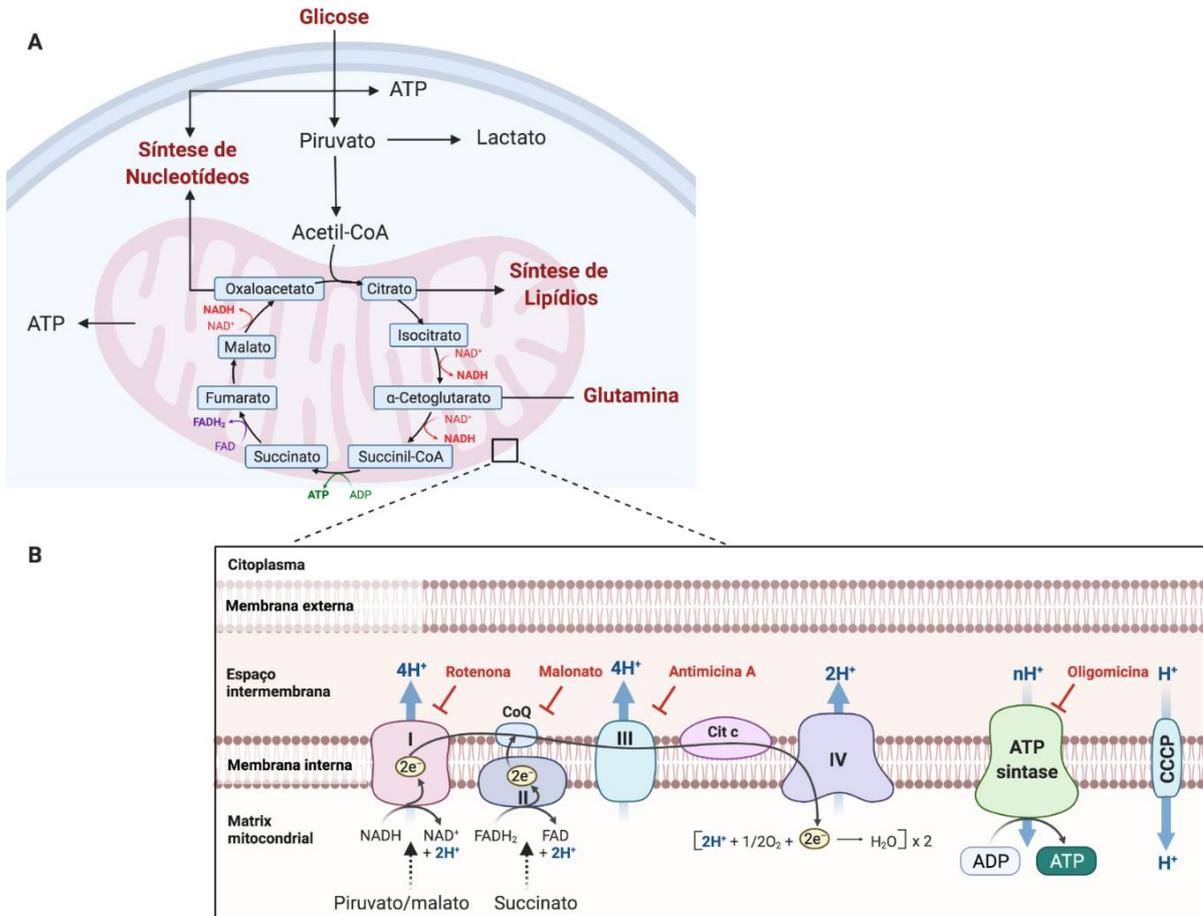


Figura 3. Representação esquemática do metabolismo energético mitocondrial e da cadeia transportadora de elétrons. (A) Esquema simplificado da respiração celular: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. (B) Complexos enzimáticos localizados na membrana interna da mitocôndria, seus alimentadores (Piruvato/malato, Succinato e ADP) e inibidores (Rotenona, Malonato, Antimicina A e Oligomicina).

Fonte: Adaptada de (SANTOS, 2018).

Na CTE, o NADH é oxidado pelo complexo I, enquanto, o FADH₂ é oxidado pelo complexo II (Figura 3B). Os elétrons obtidos são então transferidos entre os complexos, até chegar ao complexo IV, onde o O₂ é reduzido formando H₂O (SANTOS, 2018). O transporte de elétrons ocorre junto ao bombeamento de prótons para o espaço intermembrana, formando um gradiente de prótons. Em seguida, esse gradiente é dissipado em direção à matriz mitocondrial, passando pela ATP-sintase (complexo V), que converte o gradiente eletroquímico em síntese de ATP (Figura 3B). Por meio destas reações são geradas as ROS (SANTOS, 2018).

Os processos que envolvem a produção de energia são precisamente controlados, mas também flexíveis, dependendo das condições ambientais da célula (WARZYCH; LIPINSKA, 2020). Segundo os autores, as principais causas de flutuações metabólicas surgem da disponibilidade de enzimas, substratos e atividade catalítica das enzimas. Assim, estudos com

mitocôndrias isoladas ou biópsias teciduais podem fornecer dados importantes sobre a atividade da CTE, dos complexos que a compõem, do acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP, bem como do estresse oxidativo que acomete o tecido (NUKALA *et al.*, 2006).

Esses dados podem ser adquiridos através da mensuração do consumo de oxigênio mitocondrial, em resposta à diferentes substratos e inibidores (NUKALA *et al.*, 2006). Nesse contexto, a Respirimetria de Alta Resolução (FCR) permite a avaliação da função mitocondrial examinando complexos específicos da cadeia respiratória, sob condições bioquimicamente definidas. As amostras são medidas em câmara fechada e a respiração mitocondrial específica é registrada como taxas de consumo de oxigênio (GRATL *et al.*, 2019).

Sabe-se que a atividade mitocondrial é capaz de se adaptar à demanda metabólica e que essa adaptação é acompanhada de alterações da capacidade oxidativa (GRATL *et al.*, 2019). Por exemplo, após a restauração do suprimento sanguíneo em amostras transplantadas, a função mitocondrial e o seu conteúdo são capazes de se adaptar e normalizar a atividade. Essa adaptação indica um certo grau de flexibilidade das mitocôndrias (GRATL *et al.*, 2019). Porém, há um número limitado de estudos que avaliaram o potencial de regeneração da função mitocondrial no contexto da revascularização.

Uma vez que o estresse oxidativo determina processos celulares importantes, cada vez mais estudos têm tentado aprimorar o transplante de tecido ovariano criopreservado e minimizar as lesões isquêmicas. Assim, a utilização de substâncias antioxidantes, eliminadoras de radicais livres, fatores de crescimento e vitaminas estão se tornando frequentes.

2.5. Principais substâncias utilizadas na manutenção da sobrevida e funcionalidade folicular no tecido ovariano transplantado

Apesar dos avanços, ainda há muito a se elucidar a respeito da resposta tecidual, visto que a taxa de sobrevivência folicular após o transplante ainda é baixa e demonstra uma grande necessidade de aprimoramento (DONFACK *et al.*, 2017; KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017; NISOLLE *et al.*, 2000). Conforme os autores, é conhecido que há uma perda folicular massiva nos primeiros dias pós-transplante, devido ao período de isquemia que acontece até a revascularização do fragmento. Provavelmente, nos primeiros dias após o transplante, esse período de isquemia-revascularização acontece devido à produção de espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (KARACA *et al.*, 2009).

Assim, a angiogênese é considerada um fator chave para a sobrevivência dos folículos ovarianos, visto que logo após o transplante, a ausência de tecido conjuntivo entre o enxerto e

o tecido circundado ocasiona a hipóxia (DONFACK *et al.*, 2017). Pode se considerar que a aplicação de qualquer abordagem para minimizar a lesão isquêmica durante o período pós-transplante inicial e o estabelecimento da angiogênese nos enxertos ovarianos podem desempenhar um papel importante no sucesso do transplante (SUZUKI *et al.*, 2008).

Desta maneira, várias substâncias com ação antioxidante, tais como vitamina E (KALTHUR *et al.*, 2011), melatonina (FRIEDMAN *et al.*, 2012), eritropoietina (KARACA *et al.*, 2009; MAHMOODI *et al.*, 2014), L-carnitina (ZHANG *et al.*, 2015) e N-acetilcisteína (MAHMOODI *et al.*, 2015) tem sido usadas para minimizar os efeitos oriundos do estresse oxidativo e aprimorar a neovascularização tecidual, em modelos com tecido ovariano humano, canino e murino. Estes estudos revelaram efeitos protetores contra as lesões por IR, além de uma diminuição na apoptose folicular e na peroxidação lipídica. Ainda, fatores angiogênicos (COMMINS *et al.*, 2012) e hormonais (YANG, H. *et al.*, 2008) também podem vir a desempenhar um papel importante no sucesso do transplante de tecido ovariano.

2.5.1. Eritropoietina

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico, de baixo peso molecular (30,4 kDa), sintetizada no fígado, durante o período fetal e neonatal, e pelos rins em adultos (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017). Estudos recentes também demonstraram a produção de pequenas quantidades de mRNA da eritropoietina em locais como o baço, pulmão, medula óssea, cérebro e sistema reprodutor feminino e masculino (WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020).

A eritropoietina humana é codificada por um gene com cinco éxons, localizado no cromossomo 7, que codifica um precursor do hormônio formado por 193 aminoácidos. A forma circulante madura consiste em 165 aminoácidos, sendo gerada pela clivagem de um peptídeo sinal composto por 27 aminoácidos e pela perda da arginina C terminal, durante modificações pós-traducionais que acontecem pouco antes de ser secretada (OHANA *et al.*, 2013). Assim, a glicoproteína resultante possui quatro alfa hélices ligadas por duas pontes dissulfeto, que estabilizam e preservam a estrutura molecular (OHANA *et al.*, 2013). Conforme os autores, a sequência proteica da EPO de vários mamíferos possui, aproximadamente, 90% de similaridade com a EPO humana. Além disso, estima-se que a meia-vida da EPO, após lançamento na corrente sanguínea, seja da ordem de seis a oito horas, embora os valores individuais possam variar de quatro a onze horas (ADAMSON, 1996).

A eritropoietina em circulação possui várias isoformas de glicosilação, sendo 40% da molécula composta por carboidrato (MOLE; RATCLIFFE, 2018). A porção de carboidrato, que consiste em três cadeias laterais de oligossacarídeos ácidos ligadas ao N (Asn24, Asn38 e Asn83) e uma cadeia ligada ao O (Ser126), é necessária para a secreção e estabilidade in vivo do hormônio maduro, e pode proteger a molécula dos danos causados pelos radicais de oxigênio (MOLE; RATCLIFFE, 2018).

Os principais indutores da expressão do gene EPO são hipóxia e anemia (WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020). Assim, ao perceber uma redução na taxa de oxigênio circulante ou deficiência na produção de eritrócitos, células especializadas renais iniciam a produção de EPO e o seu lançamento na corrente sanguínea. As moléculas de EPO produzidas são conduzidas pelo sangue até a medula óssea, onde encontram células progenitoras eritrocitárias (WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020). Portanto, a EPO é responsável por estimular a produção de células vermelhas do sangue, processo conhecido como eritropoiese (Figura 4) e, conseqüentemente, aumentar o aporte de oxigênio aos tecidos, além de exercer diversos efeitos biológicos, tais como antioxidante, antiapoptótico e anti-inflamatório (KARACA *et al.*, 2009; WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020). Estudos ainda demonstraram o seu efeito neuroprotetor e citoprotetor (HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; MORI *et al.*, 2008; SPANDOU *et al.*, 2004). Assim, a EPO atua na prevenção do estresse oxidativo, levando a uma redução da isquemia, e promovendo um auxílio à revascularização dos tecidos (SOLEIMANI; HEYTENS; OKTAY, 2011).

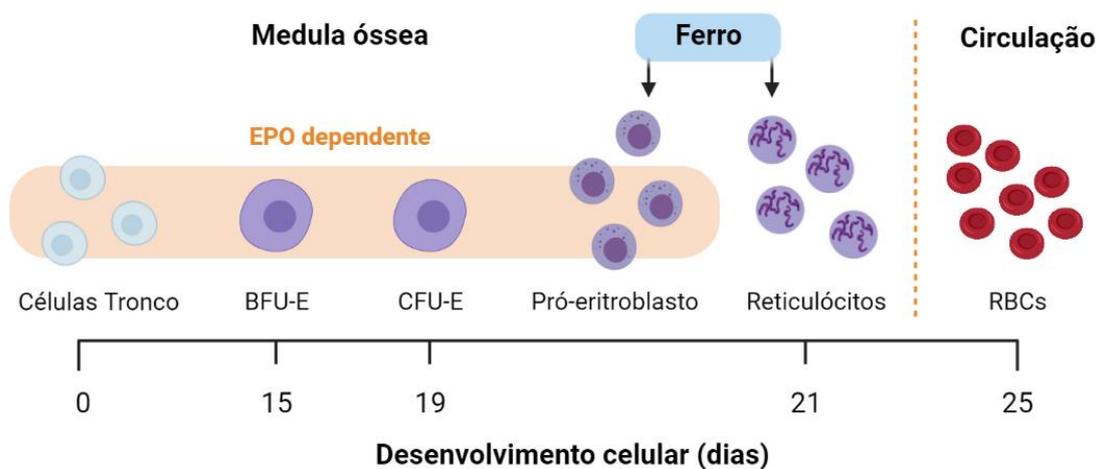


Figura 4. Etapas da eritropoiese. Na medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas pluripotentes se diferenciam em células progenitoras formadoras de crescimento rápido-eritroide (BFU-E = *Burst Forming Unit Erythroid*) e células formadoras de colônia-eritroide (CFU-E = *Colony Forming Unit Erythroid*). Essas células respondem apenas à eritropoietina. A eritropoietina protege os eritroblastos da morte celular programada, facilita a maturação

e estimula a sua proliferação. A aquisição de receptores de transferrina conferem a capacidade de incorporação de ferro às células. Ao perder o núcleo, os eritroblastos transformam-se em reticulócitos, ficando na medula óssea até que estejam maduros para serem liberados à circulação, como células vermelhas do sangue (RBCs). O estímulo hormonal continua até que valores normais de oxigenação tecidual sejam atingidos.

Fonte: Adaptado de (SINGH *et al.*, 2009).

Estudos experimentais revelaram que a EPO participa da promoção de cascatas de sinalização, relacionadas à sobrevivência celular (KARACA *et al.*, 2009; WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020), regulação positiva da expressão de proteínas antiapoptóticas (OHANA *et al.*, 2013), modulação do metabolismo intracelular do cálcio, diminuição da produção de óxidos de nitrogênio (MAHMOODI *et al.*, 2014), além da inibição da liberação de glutamato (COMMIN *et al.*, 2012; KARACA *et al.*, 2009). Ainda, a EPO estimula indiretamente a angiogênese em tecidos isquêmicos, através do aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e do recrutamento de células progenitoras endoteliais, demonstrando assim, que a relação entre EPO e VEGFA pode ser importante no processo de neovascularização (HAMED *et al.*, 2010; KIMÁKOVÁ *et al.*, 2017).

Durante condições de baixo oxigênio, o fator de transcrição induzível por hipóxia é estabilizado, levando à expressão da EPO, que se liga ao seu receptor. O receptor de eritropoietina (EpoR) é uma glicoproteína transmembrana, pertencente à superfamília dos receptores de citocinas, encontrados na superfície das células formadoras de colônia de eritrócitos (CFU-E), na medula óssea (WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020). Além dessas células, o EpoR também é expresso em tecidos não-eritroides, como em células endoteliais vasculares e cerebrais (BENTO; DAMASCENO; AQUINO-NETO, 2003; MOLE; RATCLIFFE, 2018). Quando a EPO se liga à parte extracelular do receptor, ele se dimeriza provocando a autofosforilação e a ativação de proteínas tirosina quinase, como a JAK2 (Janus Kinase 2). Esta, por sua vez, ativa uma série de mediadores transcricionais, como MAP cinase, AKT cinase e STAT5, que vão atuar na ativação e transcrição de genes, promovendo a diferenciação eritroide e a expressão de proteínas antiapoptóticas (OHANA *et al.*, 2013). Vários outros intermediários estão envolvidos na sinalização Epo-R gerando múltiplas interações, que produzem uma complexa cascata de sinalização, ativando no núcleo a transcrição de vários genes, conforme indicado na Figura 5. Na ausência da ativação do EpoR, os precursores eritroides sofrem apoptose (OHANA *et al.*, 2013; WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020).

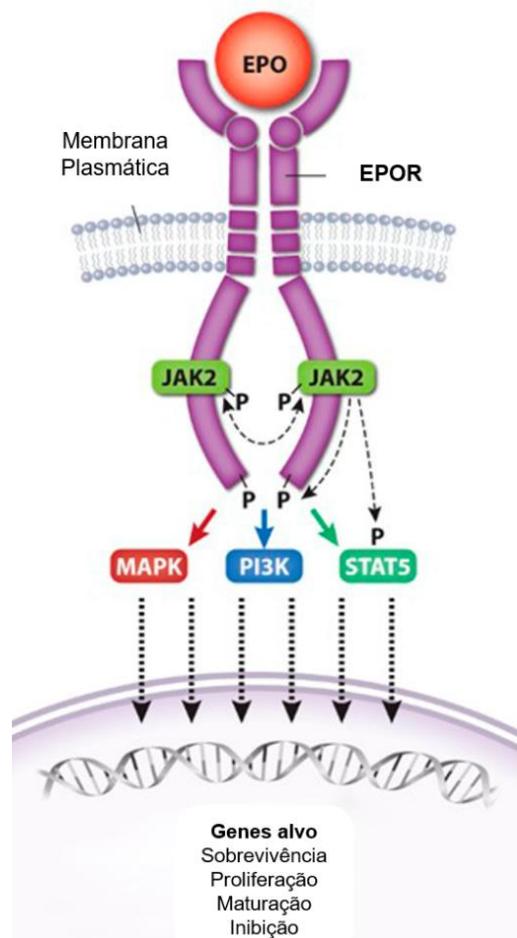


Figura 5. Ativação do receptor de eritropoietina (EPOR) pela EPO. Uma única molécula de EPO se liga e estabiliza dímeros do complexo EPOR – JAK2, induzindo uma mudança conformacional que inicia a fosforilação e ativação de JAK2. A JAK2 ativa fosforila resíduos de tirosina em STAT5 no domínio citoplasmático de EPOR, desencadeando uma cascata de sinalização que ativa várias vias efetoras que contribuem para a atividade biológica. As linhas tracejadas representam a atividade quinase. As principais vias de sinalização ativadas por EPOR incluem MAPK, STAT5 e PI3K/Akt, que conduzem a expressão de genes que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação do progenitor eritroide, bem como, a inibição da sinalização de EPOR. EPO = eritropoietina; EPOR = receptor de eritropoietina; P = fósforo; JAK2 = Janus quinase 2; MAPK = proteína quinase ativada por mitôgênio; PI3K = fosfoinosítideo-3 quinase; STAT5 = transdutor de sinal e ativador de transcrição 5.

Fonte: Adaptado de (WEISS; BHOOPALAN; HUANG, 2020).

Estudos foram realizados para confirmar o papel da EPO na proliferação e diferenciação de progenitores eritroides. Mahmoodi et al. (2014) observou em camundongos a redução das lesões de IR nos ovários enxertados no grupo tratado com EPO, aumento da taxa de sobrevivência do enxerto, maior vascularização nos locais dos enxertos, além da restauração mais rápida da função ovariana. Entretanto, ainda não há um consenso quanto a sua dosagem e local de aplicação ideais, sendo os resultados incipientes. Commin et al. (2012) utilizou a

dosagem de 500 UI/kg, aplicados uma vez por semana, durante três dias. Os autores afirmam que essa dosagem foi escolhida por produzir o efeito máximo na eritropoiese. Assim, alguns estudos também utilizaram a mesma dosagem, na tentativa de melhorar a condição de foliculogênese em transplantes de tecido ovariano (MAHMOODI *et al.*, 2014; TAFTI *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

Os pacientes que passam por tratamentos oncológicos, como a quimioterapia e a radioterapia, enfrentam o risco da infertilidade. No entanto, é encorajador ver o aumento constante da taxa de sobrevivência desses pacientes (revisado por LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019).

Uma estratégia promissora para restaurar a fertilidade feminina é a criopreservação de fragmentos corticais de tecido ovariano, antes do tratamento oncológico, seguida de transplante, após a remissão total da doença (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; DONNEZ; DOLMANS, 2015; JENSEN; KRISTENSEN; ANDERSEN, 2015; LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019). Esta abordagem não só permite a preservação e restauração da fertilidade, em pacientes adultas ou pré-púberes, mas também facilita a retomada da função endócrina ovariana (revisado por AMORIM *et al.*, 2018). Entretanto, é de extrema importância aprimorar os métodos para a conservação das funções endócrinas e exócrinas do ovário.

Atualmente, o congelamento lento é o método de criopreservação mais utilizado para o tecido ovariano humano (revisado por AMORIM *et al.*, 2018). No entanto, a mitocôndria e o retículo endoplasmático rugoso podem ser seriamente afetados durante esse processo, podendo ocasionar diversos danos celulares, entre eles o estresse oxidativo (EYDEN *et al.*, 2004; LEN; KOH; TAN, 2019). Uma vez que o estresse oxidativo determina processos celulares importantes, como apoptose, senescência e sinalização celular alterada (LEN; KOH; TAN, 2019), é importante considerar a análise da atividade mitocondrial como uma das estratégias para medir a eficácia da criopreservação e transplante.

Apesar de bem sucedida, ainda existem muitos obstáculos para tornar a técnica de transplante ovariano um sucesso, visto que o período de IR, que ocorre após o transplante, ocasiona uma perda folicular massiva e uma consequente diminuição da sobrevivência do tecido (CACCIOTTOLA *et al.*, 2018). Assim, uma das abordagens mais utilizadas, atualmente, para prevenir o dano isquêmico é o fornecimento sistêmico ou local de substâncias eliminadoras de radicais livres, vitaminas e fatores que reestabelecem a angiogênese.

Nesse sentido, a hipótese levantada é que, mesmo com os danos mitocondriais e a redução da atividade metabólica tecidual, ocasionada pelos processos de criopreservação e transplante, a integridade e a viabilidade do tecido ainda se mantém. Além disso, o período de isquemia pode ser elevado para um tecido que já sofreu danos causados pela criopreservação e, a EPO poderia incrementar a revascularização dos transplantes, reduzindo o período de IR, minimizando, também, as injúrias no tecido transplantado e promovendo uma maior recuperação folicular (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017; LEN; KOH; TAN, 2019; MAHMOODI *et al.*, 2014).

Sendo assim, um passo inicial, mas de extrema importância para a pesquisa, consiste em avaliar a atividade metabólica do tecido ovariano, a fim de caracterizar o seu metabolismo mitocondrial e, corroborar a sua viabilidade após procedimentos de criopreservação e transplante, além de, avaliar o efeito antioxidante, antiapoptótico e angiogênico da EPO, na tentativa de esclarecer a maneira mais eficaz de utilização da substância.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Caracterizar a atividade metabólica do tecido ovariano de camundongos submetidos à criopreservação seguida de transplante, e avaliar o efeito da administração de eritropoietina (EPO) na sobrevivência folicular.

4.2. Objetivos Específicos

- Analisar a atividade mitocondrial e o metabolismo energético, por meio da mensuração das taxas de consumo de oxigênio mitocondrial, em tecido ovariano fresco, criopreservado e transplantado, a fim de validar a viabilidade tecidual após esses procedimentos;
- Analisar o desenvolvimento folicular do tecido ovariano criopreservado e transplantado, com ou sem a administração de EPO, por meio da histologia clássica;
- Elucidar a maneira mais eficaz para a utilização de EPO, comparando a administração do hormônio antes ou após o transplante de tecido ovariano.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 50 camundongos nude (*Swiss nu/nu*) fêmea, com 8-12 semanas de idade, adquiridos do Biotério Central da Universidade Católica de Brasília. Os animais foram mantidos em mini-isoladores, em grupos de cinco, com temperatura ambiente controlada (24 °C) e ciclos claro-escuro de 12/12 horas. Os camundongos foram alimentados com ração padrão para roedores e acesso *ad libitum* a água autoclavada. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Protocolo nº 2/2018).

5.2. Cirurgias e eutanásias

5.2.1. Ovariohisterectomia (OSH)

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas. Os camundongos foram anestesiados com cetamina 10% (80 mg/kg Cetamin®) e xilazina 2% (10 mg/kg Xilazin® 2%, Syntec, São Paulo, Brasil), via intraperitoneal, com manutenção anestésica realizada por inalação de isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil) vaporizado em oxigênio puro. Meloxicam (5 mg/kg Maxican 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) e cloridrato de tramadol (12,5 mg/kg Tramal, Pfizer, São Paulo, Brasil) foram administrados logo após a cirurgia para analgesia, via subcutânea.

Os ovários foram obtidos por OSH, via incisão dorsal, e imediatamente cortados ao meio, resultando em quatro hemiovários por animal. Destes quatro hemiovários, um foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% por 24 horas (Controle fresco) e os outros três hemiovários restantes foram criopreservados e/ou transplantados, conforme o delineamento experimental de cada fase.

5.2.2. Transplante de tecido ovariano

O tecido ovariano foi transplantado no momento cirúrgico da OSH, enquanto os animais estavam sob efeito anestésico. Cada animal teve incisões cutâneas realizadas na região subcutânea dorsal e um hemiovário inserido em cada incisão, conforme o delineamento experimental de cada fase. Todas as incisões foram fechadas com fio cirúrgico inabsorvível (Nylon 5-0) em condições assépticas.

5.2.3. Eutanásia

Ao final do estudo, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico seguida de deslocamento cervical.

5.3. Criopreservação e descongelamento do tecido ovariano

Os hemiovários foram criopreservados conforme as alterações do protocolo descrito por Liu et al. (2002). Resumidamente, os fragmentos foram colocados em criotubos contendo 1 mL de solução de congelamento lento: MEM tamponado com ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES) a 0,01 M, acrescido com 10% de soro fetal bovino, 0,4% de sacarose e 1,5 M de DMSO, mantidos a 10 °C por 10 min, depois transferidos para um congelador programável (Cryogen-Neovet, Uberaba- Brasil), onde foram resfriados a uma taxa de -2 °C/min até -7 °C. Quando a temperatura atingiu -7 °C, a cristalização foi induzida manualmente (*seeding*) e os criotubos subsequentemente resfriados a -0,3 °C/min a -35 °C (Figura 6). Por fim, os criotubos foram mergulhados e armazenados em tanque de nitrogênio líquido (-196 °C) por 7 dias.

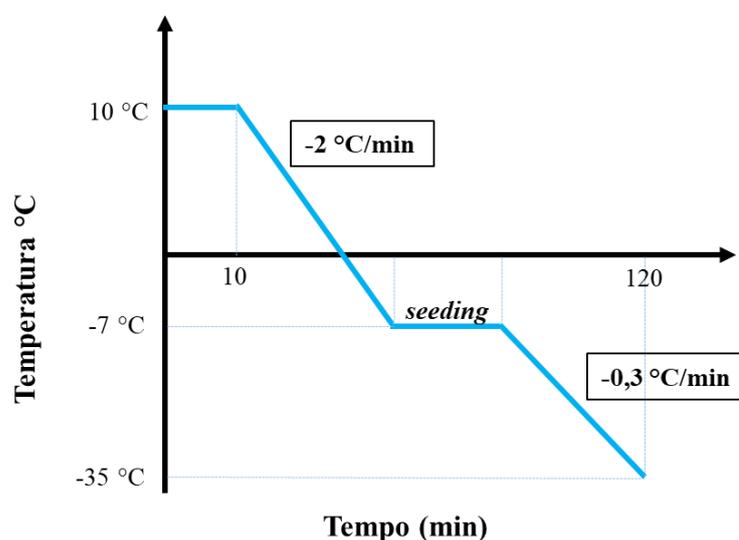


Figura 6. Curva de congelamento lento utilizada.

Fonte: Figura elaborada pela autora.

Antes dos transplantes e/ou análises, os criotubos foram removidos da refrigeração criogênica e descongelados por 1 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram transferidas para um banho-maria a 37 °C, até seu derretimento total. Ademais, três

enxagues sucessivos de 5 min foram realizados em soluções contendo MEM e 10% SFB com concentrações decrescentes de sacarose (0,4%; 0,2%; 0%) e DMSO (0,75 M; 0,375 M; 0 M). Os hemiovários foram finalmente lavados em solução de iodo a 1% e solução salina a 0,9% antes dos transplantes. Os hemiovários não transplantados, submetidos diretamente à análise mitocondrial e histológica, foram lavados apenas em água destilada.

5.4. Análise histológica

Para a análise histológica, os hemiovários foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas, desidratados em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), durante 60 min cada, clarificados em três banhos de xilol durante 60 min cada e incluídos em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O tecido foi seccionado em série (5 µm de espessura) e 1 em cada 5 cortes corado com hematoxilina/eosina (HE).

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz (Leica DM500, Wetzlar, Germany). Os folículos foram contados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (folículos primordiais ou em crescimento) e a integridade do tecido [morfológicamente normal (MN) ou degenerado] (PICTON, 2001; PICTON; GOSDEN, 2000). Os folículos que apresentavam organização uniforme das células da granulosa, ovócito redondo e núcleo evidente foram classificados como MN. Os folículos classificados como degenerados foram aqueles que apresentavam células da granulosa desorganizadas, ovócitos total ou parcialmente descolados da membrana da granulosa, vacúolos no citoplasma, ovócitos com núcleo picnótico ou mesmo folículos descolados do tecido estromal. Foram consideradas apenas as estruturas que apresentavam ovócito circundado por células da granulosa.

5.5. Fase I: Análise da atividade mitocondrial

5.5.1. Delineamento experimental

Os camundongos foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos (n = 5 em cada grupo). De maneira didática, os animais foram nomeados como Grupos 1, 2, 3 e 4, enquanto, o tecido ovariano foi identificado conforme o procedimento ao qual foi submetido: Grupo Fresco, Grupo Transplante Fresco, Grupo Crio e Grupo Transplante Crio.

Quatorze dias antes das análises (Dia -14), os animais do Grupo 1 foram submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram criopreservados. Após sete dias armazenados em nitrogênio líquido (Dia -7), os hemiovários foram descongelados e transplantados nos animais do Grupo 2. No momento do recebimento dos enxertos, os animais do Grupo 2 foram

submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram imediatamente transplantados nos animais do Grupo 3. Na mesma ocasião, os animais do Grupo 3 também foram submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido.

Sete dias após a realização dos transplantes (Dia 0), todos os animais foram eutanasiados e os enxertos recuperados para análises. Assim como, os hemiovários que estavam armazenados em nitrogênio líquido foram descongelados. Por fim, no dia das análises metabólicas e histológicas (Dia 0), o último grupo de animais (Grupo 4) foi eutanasiado, imediatamente antes das avaliações, para análise do tecido ovariano na sua condição fresca, sem passar por qualquer tipo de procedimento anterior.

Dessa forma, metade das amostras de hemiovários, de todos os grupos, seguiram para análise do consumo de oxigênio mitocondrial, enquanto a outra metade de hemiovários foi fixada em paraformaldeído para análise histológica. Amostras de tecido ovariano fresco (Grupo Fresco, n = 20 hemiovários); tecido ovariano criopreservado (Grupo Crio, n = 20 hemiovários); tecido ovariano fresco transplantado (Grupo Transplante Fresco, n = 20 hemiovários) e tecido ovariano criopreservado e transplantado (Grupo Transplante Crio, n = 20 hemiovários) foram analisadas imediatamente após a retirada dos transplantes/descongelamento. Os procedimentos experimentais estão esquematicamente representados na Figura 7.

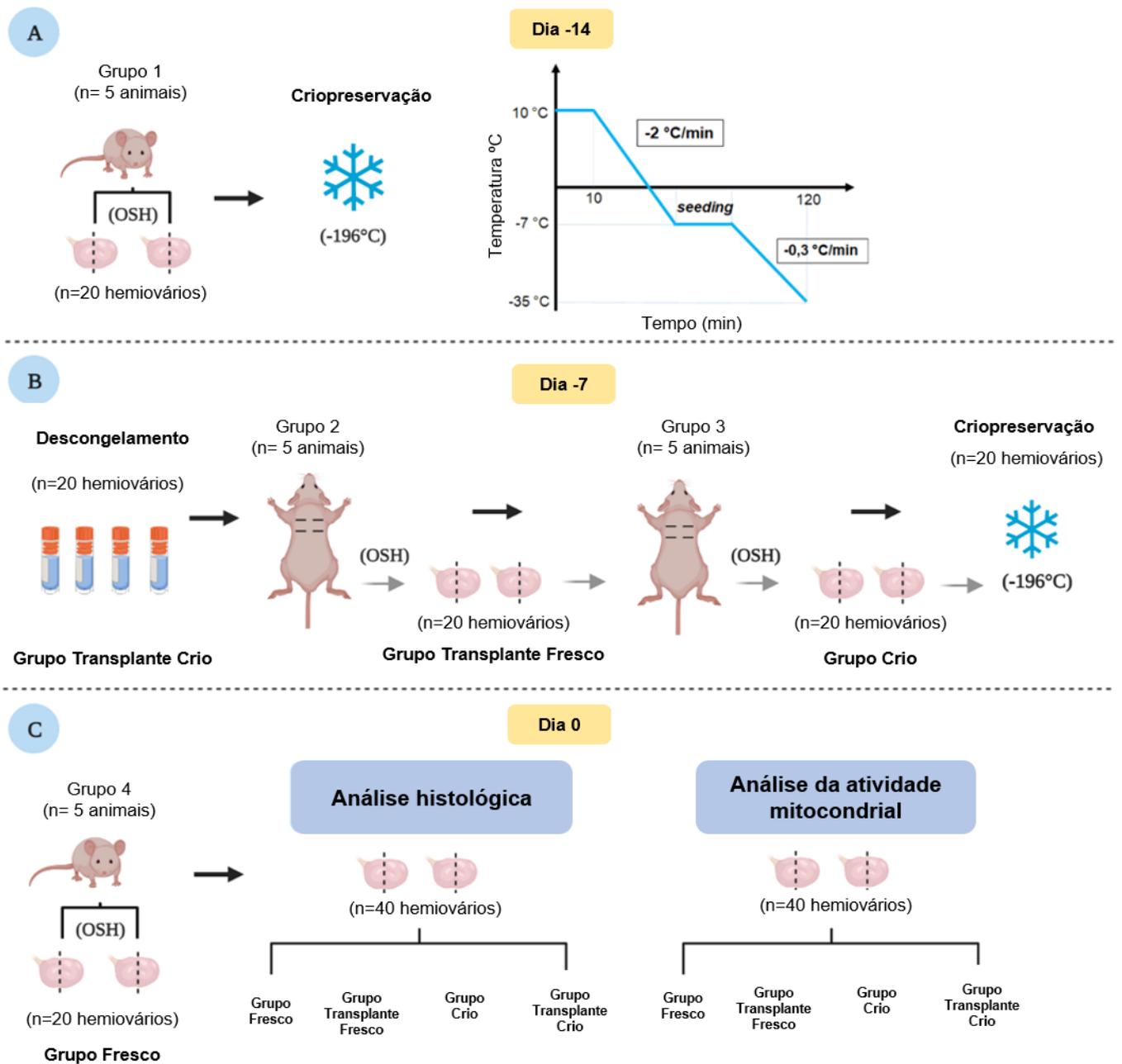


Figura 7. Desenho experimental da fase I - análise da atividade mitocondrial. (A) No dia -14, os animais do Grupo 1 foram submetidos à ovariectomia bilateral (OSH). Os hemiovários foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C). (B) Sete dias após a criopreservação (Dia -7), os hemiovários foram descongelados e transplantados nos animais do Grupo 2. Essas amostras de hemiovários transplantadas formaram o Grupo Transplante Crio. No mesmo procedimento cirúrgico, os animais do Grupo 2 foram submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram imediatamente transplantados nos animais do Grupo 3. Essas amostras de hemiovários formaram o Grupo Transplante Fresco. No mesmo procedimento cirúrgico, os animais do Grupo 3 também foram submetidos à OSH e os hemiovários obtidos foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido. Essas amostras de hemiovários foram descongeladas após sete dias e constituíram o Grupo Crio. (C) No dia das análises (Dia 0), os animais do Grupo 4 foram eutanasiados e os hemiovários imediatamente avaliados como tecido fresco (Grupo Fresco). Sete dias após os transplantes (Dia 0), os animais foram eutanasiados e os

enxertos recuperados para análises. As amostras de hemiovários de todos os grupos foram distribuídas entre as análises, com metade delas fixadas para análise histológica, e a outra metade usada para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial. OSH = ovariectomia; Crio = criopreservado.

Fonte: Figura elaborada pela autora.

5.5.2. Consumo de oxigênio mitocondrial

Para análise do consumo de oxigênio mitocondrial, os hemiovários foram avaliados em um oxígrafo de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k Inc., Áustria). Primeiramente, os hemiovários foram pesados em uma balança microanalítica (Semi-microescala AUW220D, Scientific Mars, Brasil). Os hemiovários foram subsequentemente homogeneizados em 300 μ L de solução tampão de isolamento (sacarose 75 mM, manitol 225 mM, hepes K 10 mM, EGTA 1 mM, BSA livre de ácido graxo 0,1%, pH 7,4), em um homogeneizador de vidro manual. A massa de tecido ovariano utilizada variou entre 1,30 e 5,60 mg, portanto, a taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi normalizada pela massa de tecido ($\text{pmol O}_2/\text{s}/\text{mg}$) e medida em tempo real usando o software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria).

O consumo de oxigênio mitocondrial dependente do complexo II, da cadeia transportadora de elétrons (Succinato desidrogenase), foi avaliado usando o protocolo substrato-desacoplador-inibidor (SUIT). Optou-se por analisar este complexo especificamente, devido às limitações técnicas encontradas nas respostas obtidas pelos demais complexos mitocondriais, assim como, a quantidade de amostra necessária à detecção pelo equipamento que limitou a realização de mais protocolos experimentais.

O OCR basal foi medido sem adição de substratos, após estabilização do fluxo de oxigênio. Adições subsequentes de 10 mM de Succinato (Succ) e 0,5 μ M de rotenona (Rot) foram feitas para alimentar o complexo II e inibir o complexo I, respectivamente; enquanto 50 μ M de adenosina difosfato (ADP; C2-Oxphos) e 0,1 μ g/mL de oligomicina (Oligo; C2-Oligo) foram adicionados para motivar e inibir a atividade da ATP sintase, respectivamente. A taxa máxima de consumo de O_2 foi então determinada por titulação com um desacoplador de fosforilação oxidativa: FCCP - cianeto de carbonila p-trifluorometoxifenilhidrazona [concentrações (C2-ETS) 0,1 a 0,4 μ M]. Finalmente, a atividade do complexo III foi bloqueada pela adição de 1 μ M de antimicina A (AA), a fim de avaliar o consumo residual de oxigênio (ROX). ROX foi subtraído de todas as medições para relatar o consumo de oxigênio mitocondrial. Além dos estados descritos, também foram calculadas a respiração associada à síntese de ATP ($\text{ATP-Linked} = \text{C2-Oxphos} - \text{C2-Oligo}$) e a capacidade reserva respiratória ($\text{Spare Capacity} = \text{C2 ETS} - \text{C2 Oxphos}$).

Os experimentos foram realizados em cinco repetições, cada vez analisando amostras de todos os grupos experimentais para garantir as mesmas condições.

5.6. Fase II: Avaliação do efeito da administração de EPO

5.6.1. Delineamento experimental

Nesta segunda fase, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: Grupo Controle (n=10), Grupo EPO (n=10) e Grupo Salina (n=10). Todos os animais foram submetidos à OSH bilateral no momento do transplante, conforme descrito anteriormente. Os ovários obtidos por OSH foram divididos ao meio, resultando em quatro hemiovários por animal. Destes quatro hemiovários, um foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% por 24 horas (Controle fresco) e os outros três hemiovários foram criopreservados. Após sete dias armazenados em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados, sendo um hemiovário imediatamente fixado em paraformaldeído, por 24 horas (Controle crio), e os outros dois hemiovários restantes transplantados no tecido subcutâneo dorsal dos animais, conforme ilustrado na Figura 8 e descrito abaixo:

Grupo Controle: as fêmeas do Grupo Controle foram submetidas à OSH no dia zero do experimento (D0) e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido por sete dias. No mesmo momento cirúrgico, sob efeito anestésico, cada fêmea recebeu o transplante de dois hemiovários, previamente criopreservados e descongelados nas mesmas condições, na região subcutânea dorsal (Tho). Desta forma, este grupo foi utilizado como controle pois recebeu o transplante de hemiovários criopreservados e descongelados, sem passar por nenhuma exposição prévia a qualquer tipo de fármaco.

Grupo EPO: as fêmeas do Grupo EPO receberam 500 UI/kg de EPO (Hemax Eritron alfaepotina, Biosintética), via intraperitoneal, durante cinco dias consecutivos: dois dias antes da OSH, no dia da OSH e dois dias após a OSH (D-2, D-1, OSH, D1 e D2). Devido à meia vida da alfaepotina (4 a 13 horas após administração intravenosa), a EPO foi administrada em duas doses de 250 UI/Kg cada (12/12 horas, BID), para que se mantivesse o pico de concentração plasmática do hormônio. Após dois dias administrando as doses de EPO, os camundongos deste grupo foram submetidos à OSH e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido por sete dias. Ainda na ocasião da OSH, os animais receberam o transplante de hemiovários criopreservados e descongelados, provenientes da OSH realizada nas fêmeas do Grupo

Controle (The Grupo Controle). Após o recebimento dos enxertos, os animais receberam ainda mais dois dias de administração de EPO.

Grupo Salina: as fêmeas do Grupo Salina receberam solução fisiológica 0,9% estéril, via intraperitoneal (12/12 horas, BID), durante cinco dias consecutivos (D-2, D-1, OSH, D1 e D2), no mesmo esquema e no mesmo volume total da EPO recebida pelo Grupo EPO. Após sete dias armazenados em nitrogênio líquido, os hemiovários obtidos através da OSH realizada nos animais do Grupo EPO foram descongelados e transplantados nos animais do Grupo Salina (The Grupo EPO). Assim como no grupo anterior, após o recebimento dos enxertos, mais dois dias de administração de salina se sucederam nos animais. Ainda, no mesmo momento cirúrgico, os camundongos do Grupo Salina foram submetidos à OSH e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados e armazenados em nitrogênio líquido.

Desta maneira, a partir dos Grupos EPO e Salina seria possível avaliar o efeito da EPO sobre a sobrevivência folicular, antes e após o recebimento do transplante de tecido ovariano: os camundongos do Grupo EPO receberam o transplante de tecido ovariano apenas criopreservado e descongelado, e mais dois dias de administração de EPO. Assim como, o tecido ovariano transplantado nos animais do Grupo Salina já havia sido previamente exposto a dois dias de administração do hormônio, pois são provenientes da OSH dos animais do Grupo EPO.

Ademais, metade dos animais, de cada um dos grupos (n=5), foram eutanasiados e tiveram seus fragmentos retirados para análise sete dias após o transplante (D7), enquanto a outra metade dos animais foram eutanasiados e tiveram seus fragmentos retirados para análise quatorze dias após o transplante (D14).

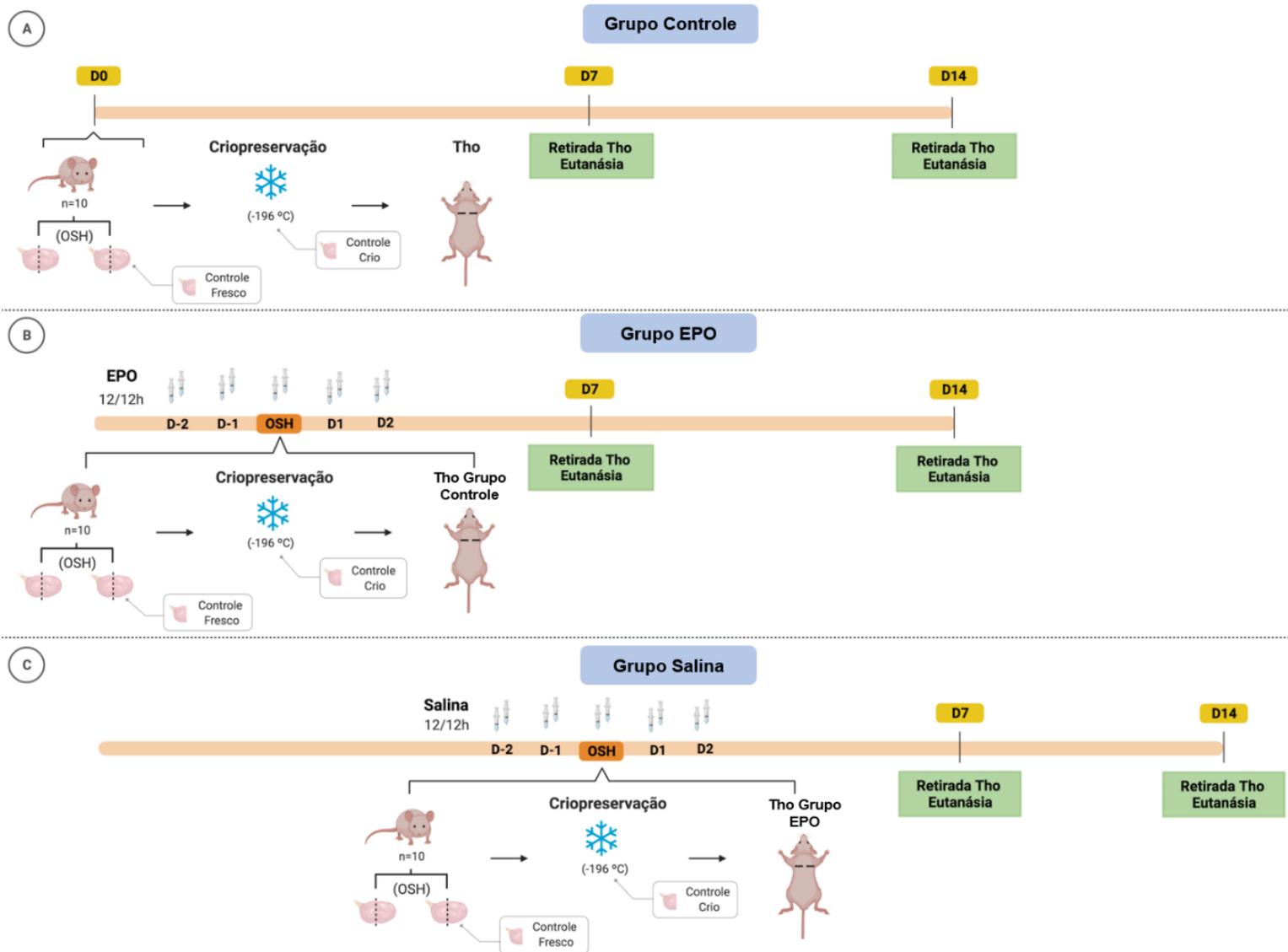


Figura 8. Desenho experimental da fase II - avaliação do efeito da administração de EPO. (A) Os animais do Grupo Controle foram submetidos à OSH no dia zero do experimento (D0) e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como Controle Fresco e os outros três foram criopreservados. Após sete dias em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados, sendo um imediatamente fixado em paraformaldeído (Controle Crio). No momento cirúrgico da OSH, os animais do Grupo Controle receberam transplante de dois hemiovários (previamente criopreservados e descongelados nas mesmas condições), na região subcutânea dorsal (Tho). (B) Os animais do Grupo EPO receberam 500 UI/kg de eritropoietina (EPO), via intraperitoneal, durante cinco dias consecutivos (D-2, D-1, OSH, D1 e D2). A EPO foi administrada em duas doses de 250 UI/Kg cada (12/12 horas). Após dois dias de administração do hormônio, os animais foram submetidos à OSH e dos quatro hemiovários resultantes, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados. Após sete dias em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados sendo um imediatamente fixado em paraformaldeído (Controle Crio). Na ocasião da OSH, os animais do Grupo EPO receberam transplante dos hemiovários provenientes da OSH realizada nas fêmeas do Grupo Controle (Tho Grupo Controle). (C) Os animais do Grupo Salina receberam solução fisiológica 0,9% estéril, via intraperitoneal (12/12 horas), durante cinco dias consecutivos (D-2, D-1, OSH, D1 e D2), no mesmo esquema e no mesmo volume total da eritropoietina recebida

pelo Grupo EPO. Após sete dias armazenados em nitrogênio líquido, os hemiovários previamente expostos ao hormônio, obtidos através da OSH realizada no Grupo EPO, foram descongelados e transplantados nos animais do Grupo Salina (Tho Grupo EPO). No mesmo cirúrgico, os animais do Grupo Salina foram submetidos à OSH e dos quatro hemiovários obtidos, um foi fixado como controle fresco e os outros três foram criopreservados. Após sete dias em nitrogênio líquido, os hemiovários foram descongelados sendo um imediatamente fixado em paraformaldeído (Controle Crio). Em todos os grupos, os hemiovários transplantados foram recuperados para análise histológica após 7 e 14 dias. Crio = criopreservação, EPO = eritropoietina, Salina = solução fisiológica 0,9%, Tho = transplante dos hemiovários, D = dia, OSH = ovariectomia, h = horas.

Fonte: Figura elaborada pela autora.

5.7. Análise estatística

Os dados relacionados à atividade metabólica foram analisados no software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EUA). Todos os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados foram avaliados por Two-way ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Nas análises histológicas, foi realizada a comparação entre os grupos por meio do teste do Qui-quadrado, em relação à média percentual de folículos MN. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Fase I: Análise da atividade mitocondrial

6.1.1. Consumo de oxigênio mitocondrial

Por meio da Respirimetria de Alta Resolução (FCR), foi possível avaliar os efeitos da criopreservação, com ou sem transplante, pela mensuração das taxas de consumo de O_2 (OCR) em homogenatos de hemiovários. A Figura 9 (A-D) mostra um traçado de oxigênio representativo de um protocolo de titulação de substrato-inibidor-desacoplador (SUIT) de cada condição analisada. Este protocolo nos permitiu determinar: OCR basal; consumo de oxigênio associado ao Complexo II (*C2-Leak* suportado por succinato); *C2-OXPHOS* (após a adição de ADP); *C2-Oligo* (determinado após a adição de oligomicina); *C2-ETS* (representando o OCR máximo obtido pelo desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial com o ionóforo FCCP), juntamente com o OCR residual, resultante do consumo de O_2 não mitocondrial (obtido pelo bloqueio do complexo III com antimicina A).

Os resultados mostraram que todos os grupos foram capazes de responder ao protocolo SUIT. No entanto, essas respostas foram diferentes entre os grupos experimentais. Quando

comparados ao Grupo Fresco, encontramos uma diminuição intensa no consumo geral de oxigênio, em hemiovários submetidos à criopreservação (Grupo Crio), transplante (Grupo Transplante Fresco) e tanto criopreservação quanto transplante (Grupo Transplante Crio) (Figura 9A-D).

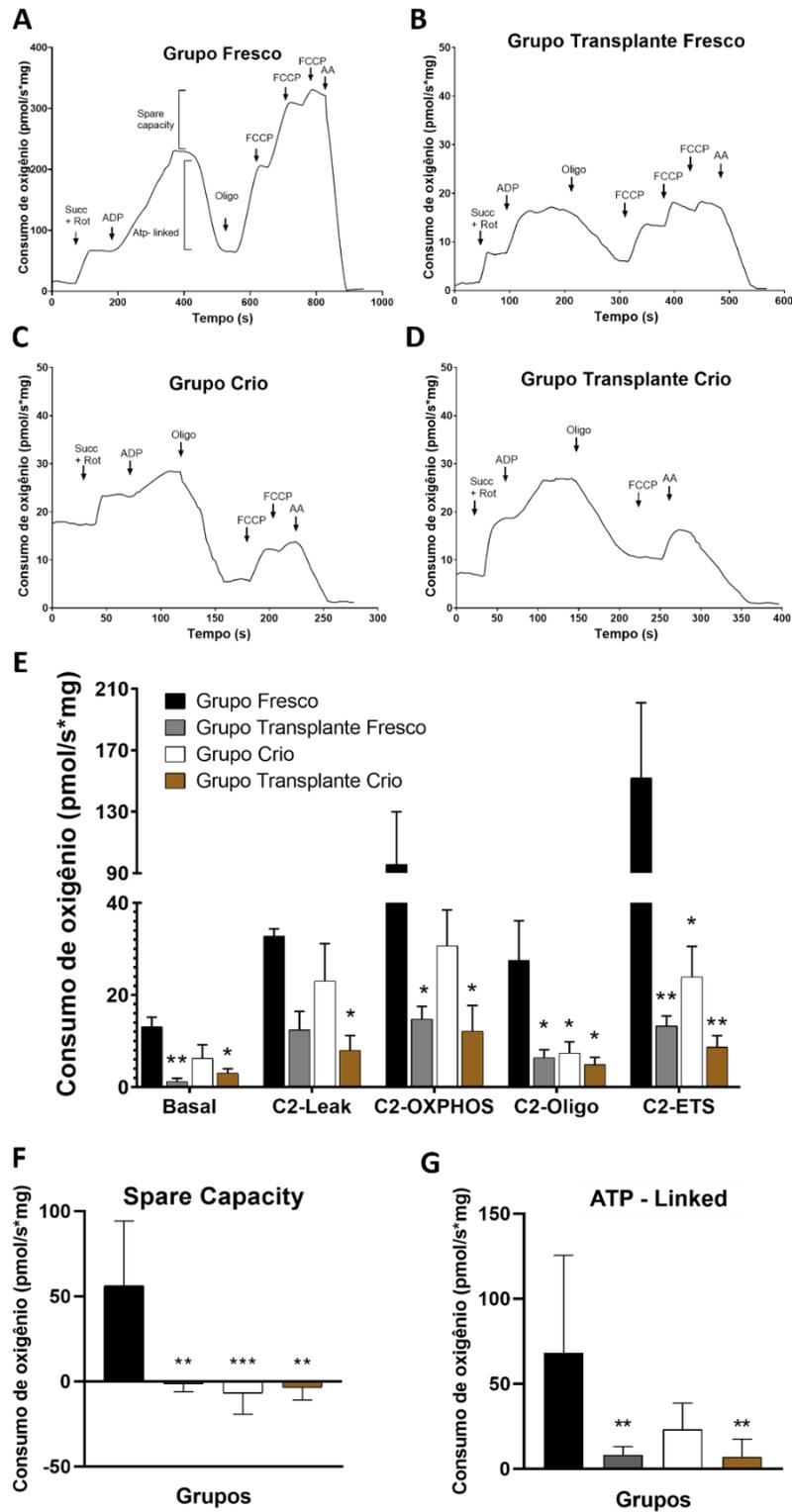


Figura 9. Resultados da análise da atividade mitocondrial do tecido ovariano. (A-D) Gráfico representativo do consumo de oxigênio do tecido ovariano durante o protocolo de titulação substrato-inibidor-desacoplador (SUIT)

(pontas de seta). As taxas de respiração foram medidas a 37 °C. O consumo de O₂ foi medido após adições sequenciais de succinato 10 mM (Succ) e rotenona 0,5 µM (Rot), adenosina difosfato 500 µM (ADP), oligomicina 0,1 µg / ml (Oligo), Cianeto de carbonil-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (0,1 a 0,4 µM) e antimicina A (AA) 1 µM. (E-G) Efeito da criopreservação e/ou transplante no consumo de oxigênio em homogenatos de hemiovários. (E). Taxas médias de consumo de O₂ (OCR) medidas em 5 pontos da avaliação, nomeadamente OCR basal (O₂ consumido devido à oxidação de substratos endógenos); C2-LEAK (O₂ consumido devido à oxidação do succinato exógeno), C2-OXPHOS (OCR relacionado à fosforilação oxidativa), C2-Oligo (OCR não dependente da síntese de ATP), C2-ETS (taxa respiratória máxima resultante da respiração mitocondrial desacoplada). A avaliação da capacidade mitocondrial de reserva (*Spare Capacity*) (F) e do consumo de oxigênio direcionado à síntese de ATP (*ATP-Linked*) (G) também foram avaliadas. Todos os resultados foram expressos como médias de consumo de oxigênio em pmol de oxigênio consumido por segundo/mg, determinado pela massa de tecido.

* p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001, em comparação com amostras frescas de tecido ovariano (Grupo Fresco).

Fonte: Figura elaborada pela autora.

Apesar da redução significativa no consumo de oxigênio, o Grupo Crio (Figura 9C) foi mais ativo metabolicamente que os demais, quando comparados ao Grupo Fresco (Figura 9A), respondendo adequadamente a todos os substratos, inibidores e desacopladores utilizados. Na verdade, o impacto da criopreservação no metabolismo mitocondrial se mostrou menos intenso do que o observado em hemiovários transplantados. Essas mudanças podem ser visualizadas pelas taxas de OCR.

Em comparação com o Grupo Fresco, os transplantes (Grupos Transplante Fresco e Transplante Crio) afetou todos os estados mitocondriais, ou seja, OCR basal, C2-*Leak*, C2-OXPHOS, C2-Oligo, C2-ETS, *ATP-Linked* e *Spare Capacity* (Figura 9F-G). Por outro lado, a criopreservação diminuiu significativamente apenas os estados C2-Oligo, C2-ETS e *Spare Capacity*, em comparação com o Grupo Fresco (Figura 9E). Os dados estatísticos referentes aos efeitos da criopreservação e transplante nos estados mitocondriais podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados estatísticos (*Two-way* ANOVA) dos efeitos da criopreservação e transplante nos estados mitocondriais do tecido ovariano. Uma interação de ambos os tratamentos é observada nos estados mitocondriais Basal, C2-ETS e *Spare Capacity*.

| Tratamentos | Estados mitocondriais | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | Basal | C2-Leak | C2-OXPPOS | C2-Oligo | C2-ETS | <i>Spare Capacity</i> | ATP-Linked |
| Criopreservação | F (1, 15) = 1,6 P= 0,2316 | F (1, 15) = 1,9 P= 0,1891 | F (1, 16) = 3,6 P= 0,0746 | F (1, 16) = 5,5 P= 0,0328* | F (1, 16) = 7,2 P= 0,0163* | F (1, 16) = 12,6 P= 0,0027* | F (1, 15) = 3,1 P= 0,0982 |
| Transplante | F (1, 15) = 14,1 P= 0,0019* | F (1, 15) = 11,9 P= 0,0036* | F (1, 16) = 7,9 P= 0,0127* | F (1, 16) = 6,5 P= 0,0215* | F (1, 16) = 9,7 P= 0,0067* | F (1, 16) = 8,8 P= 0,0091* | F (1, 15) = 17,7 P= 0,0008* |
| Interação | F (1, 15) = 4,7 P= 0,0461* | F (1, 15) = 0,27 P= 0,6145 | F (1, 16) = 3,1 P= 0,0974 | F (1, 16) = 4,0 P= 0,0612 | F (1, 16) = 6,2 P= 0,0238* | F (1, 16) = 11,08 P= 0,0042* | F (1, 15) = 2,5 P= 0,1340 |

* - Diferença significativa com relação ao tecido ovariano fresco (Grupo Fresco) ($p < 0,05$)

OCR basal = O₂ consumido devido à oxidação de substratos endógenos; C2-LEAK = O₂ consumido devido à oxidação do succinato exógeno; C2-OXPPOS = OCR relacionado à fosforilação oxidativa; C2-Oligo = OCR não dependente da síntese de ATP; C2-ETS = taxa respiratória máxima resultante da respiração mitocondrial desacoplada; *Spare Capacity* = capacidade mitocondrial de reserva e ATP-Linked = consumo de oxigênio direcionado à síntese de ATP.

A análise estatística também demonstrou uma interação de ambos os tratamentos (criopreservação e transplante) em OCR basal, C2-ETS e *Spare Capacity* (Tabela 1). Na verdade, o Grupo Transplante Crio apresentou o menor metabolismo mitocondrial (Figura 9E e 9G) em comparação a todos os grupos. Os dados sugerem que o dano causado pelo transplante é maior do que o dano causado pela criopreservação, visto que, o transplante afetou todos os estados mitocondriais (Tabela 1).

Embora o consumo de oxigênio ligado à síntese de ATP no tecido criopreservado (Grupo Crio) não tenha sido significativamente diferente das amostras frescas (Grupo Fresco) (Figura 9G), há evidências de que este tecido está passando por desregulação bioenergética, conforme observado pela extinção da *Spare Capacity* (Figura 9F). Por outro lado, a desregulação bioenergética é mais evidente em amostras de tecido ovariano transplantadas (Grupo Transplante Fresco e Grupo Transplante Crio), devido à menor respiração associada à síntese de ATP, em comparação com o tecido fresco (Figura 9G).

6.1.2. Análise histológica

Na fase I, a porcentagem de implantes recuperados foi de 100%. Um total de 2114 folículos foram analisados em todas as amostras de tecido ovariano: 664 folículos primordiais e 1450 folículos em crescimento, dos quais 1760 foram classificados como morfológicamente normais (MN). O número total de folículos primordiais e em crescimento, folículos MN e as porcentagens médias \pm desvio padrão (DP) encontrados em cada grupo são relatados na Tabela 2. Os folículos antrais foram contados como folículos em crescimento.

Tabela 2. Número total, número e porcentagem (Média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento em todos os grupos analisados na análise da atividade mitocondrial.

| Grupos | <i>Total</i> | <i>Folículos Primordiais</i> | | | <i>Folículos em Crescimento</i> | | |
|---------------------------|------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|---------------------------------|--------------|------------------------------|
| | <i>Folículos</i> | <i>nº</i> | <i>nº MN</i> | <i>MN (%)</i> | <i>nº</i> | <i>nº MN</i> | <i>MN (%)</i> |
| Fresco | 1097 | 354 | 315 | 85.7 \pm 8.4 | 743 | 630 | 86.2 \pm 8.4 |
| Transplante Fresco | 127 | 52 | 44 | 76.5 \pm 35.8 ^a | 75 | 55 | 78.6 \pm 16.6 ^a |
| Crio | 788 | 228 | 211 | 82.2 \pm 31.9 | 560 | 435 | 70.3 \pm 13.2 [#] |
| Transplante Crio | 102 | 30 | 22 | 61.9 \pm 25.5 [*] | 72 | 48 | 49.5 \pm 37.3 [*] |

a - Diferença significativa entre os grupos Transplante Fresco e Transplante Crio ($p < 0,05$).

* - Diferença significativa entre os grupos Transplante Crio e Grupo Crio ($p < 0,05$).

- Diferença significativa entre os grupos Fresco e Crio ($p < 0,05$).

Crio = Criopreservado, nº = número, MN = morfológicamente normal.

A porcentagem de folículos primordiais e em crescimento MN foi significativamente menor no Grupo Transplante Crio quando comparado ao Grupo Crio ($p < 0,05$) e ao Grupo Transplante Fresco ($p < 0,05$). Além disso, ambos os grupos transplantados (Grupos Transplante Fresco e Transplante Crio) apresentaram menor número de folículos em relação aos grupos não transplantados (Grupos Fresco e Crio). Embora a porcentagem de folículos primordiais e em crescimento MN não diferiu entre os Grupos Transplante Fresco e Fresco, o número total de folículos encontrados em tecidos transplantados frescos foi consideravelmente menor. Comparando o Grupo Fresco com o Grupo Crio, houve apenas uma redução na porcentagem de folículos MN em crescimento, após a criopreservação ($p < 0,05$).

Apesar da diminuição da viabilidade folicular, foi possível encontrar folículos MN em todos os grupos analisados (Figura 10A-D). Folículos antrais também foram encontrados após transplante de tecido fresco e criopreservado (Figura 10E-F).

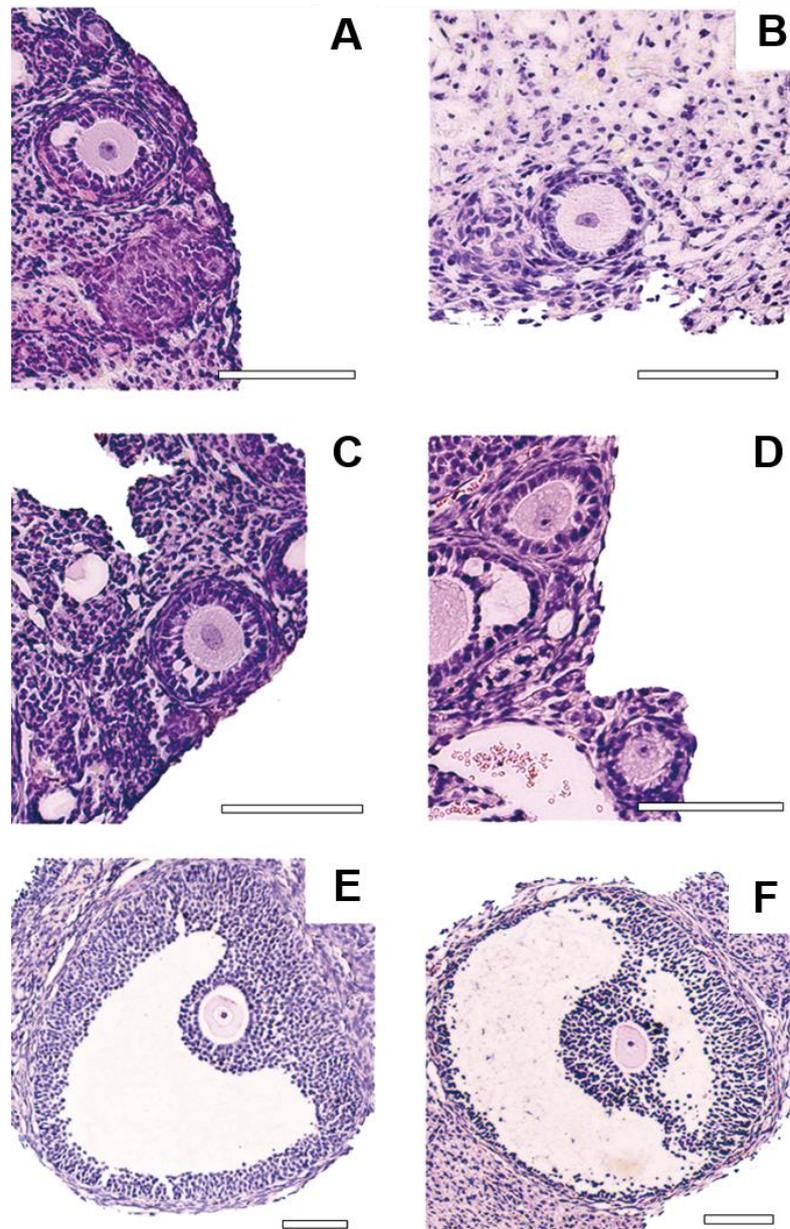


Figura 10. Folículos morfologicamente normais encontrados no tecido ovariano de camundongos, corados com Hematoxilina/Eosina. (A) Grupo Fresco, (B e E) Grupo Transplante Fresco, (C) Grupo Crio e (D e F) Grupo Transplante Crio. Barra = 100 μ m.

Fonte: Figura elaborada pela autora.

6.2. Fase II: Avaliação do efeito da administração de EPO

Na fase II, a porcentagem de implantes recuperados foi de 95%. Um total de 6876 folículos foram analisados em todas as amostras de tecido ovariano: 1660 folículos primordiais e 5216 folículos em crescimento, dos quais 5372 foram classificados como morfologicamente normais (MN). O número total de folículos primordiais e em crescimento, folículos MN e as

porcentagens médias \pm desvio padrão (DP) encontrados em cada um dos grupos (Controle, EPO e Salina) estão apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente. Vale ressaltar, que as análises estatísticas foram realizadas entre os grupos de tratamento (EPO e Salina) e o controle da criopreservação (Controle Crio), assim como, o Controle Fresco foi comparado apenas ao Controle Crio. E, os folículos antrais foram contados como folículos em crescimento.

Tabela 3. Número total, número e porcentagem (média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante dos animais do Grupo Controle.

| | Total | Folículos Primordiais | | | Folículos Em crescimento | | |
|------------------------|-----------|-----------------------|-------|-------------------------------|--------------------------|-------|------------------------------|
| | Folículos | n° | n° MN | % MN | n° | n° MN | % MN |
| Controle Fresco | 1816 | 553 | 536 | 88,8 \pm 24,9 | 1263 | 950 | 71,5 \pm 14,7 |
| Controle Crio | 1075 | 323 | 279 | 80,6 \pm 31,9 | 752 | 586 | 72,2 \pm 11,9 |
| D7 | 85 | 8 | 6 | 32,5 \pm 43,5 ^a | 77 | 46 | 60,0 \pm 30,2 [*] |
| D14 | 163 | 1 | 1 | 12,5 \pm 33,1 ^{a*} | 162 | 126 | 73,7 \pm 12,8 |

a - Diferença significativa com relação ao Controle Crio, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

* - Diferença significativa entre o D7 e o D14 pós transplante, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

Crio = Criopreservado, n° = número, MN = morfológicamente normal, D = dia.

Conforme observado na Tabela 3, a análise estatística do Grupo Controle revelou uma porcentagem de folículos MN em crescimento significativamente menor ($p < 0,05$) no D7 pós transplante, quando comparado ao D14. Porém, o oposto foi observado nos folículos primordiais, uma vez que, houve uma depleção significativa desses folículos ($p < 0,05$) 14 dias após o transplante. Ainda, foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem média de folículos MN primordiais encontrados nos tecidos transplantados (D7 e D14), quando comparados aos hemiovários apenas criopreservados (Controle Crio). Embora a porcentagem de folículos MN, primordiais e em crescimento, não diferiu entre o Controle Fresco e o Controle Crio, o número total de folículos encontrados em tecidos criopreservados foi consideravelmente menor.

Tabela 4. Número total, número e porcentagem (média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante dos animais do Grupo EPO.

| | Total | Folículos Primordiais | | | Folículos Em crescimento | | |
|------------------------|-----------|-----------------------|-------|------------------------------|--------------------------|-------|------------------------------|
| | Folículos | nº | nº MN | % MN | nº | nº MN | % MN |
| Controle Fresco | 826 | 202 | 174 | 80,3 \pm 32,0 | 624 | 508 | 83,1 \pm 6,4 ^a |
| Controle Crio | 857 | 168 | 133 | 70,2 \pm 37,9 | 689 | 477 | 60,5 \pm 28,0 |
| D7 | 226 | 5 | 4 | 25,0 \pm 43,3 ^a | 221 | 166 | 78,9 \pm 13,6 ^a |
| D14 | 197 | 10 | 7 | 19,6 \pm 35,7 ^a | 187 | 131 | 70,2 \pm 16,3 |

a - Diferença significativa com relação ao Controle Crio, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

Crio = Criopreservado, nº = número, MN = morfológicamente normal, D = dia.

Nos dados da Tabela 4, é possível notar que a análise estatística do Grupo EPO revelou uma porcentagem de folículos MN em crescimento significativamente maior ($p < 0,05$) no D7 pós transplante, quando comparado ao controle da criopreservação (Controle Crio). Porém, isso não foi observado nos folículos primordiais, pois houve uma depleção significativa desses folículos ($p < 0,05$) no D7 e D14 pós transplante. Ainda, foi possível observar uma diferença significativa ($p < 0,05$) na porcentagem média de folículos MN em crescimento no Controle Fresco, em relação ao Controle Crio. A porcentagem de folículos MN, primordiais e em crescimento, não diferiu estatisticamente entre os dias 7 e 14 pós transplante.

Na Tabela 5, é possível observar os resultados do Grupo Salina. A análise estatística revelou uma porcentagem de folículos MN em crescimento significativamente maior ($p < 0,05$) no D14 pós transplante quando comparado ao D7 e, no Controle Fresco em relação ao Controle Crio (Tabela 5). Ainda com relação aos folículos em crescimento, foi possível observar dois eventos distintos: no D7 pós transplante, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem média desses folículos quando comparados ao controle da criopreservação (Controle Crio) e, no D14 pós transplante houve um crescimento considerável ($p < 0,05$) na porcentagem média dos folículos em crescimento, em relação ao Controle Crio.

Em relação à porcentagem de folículos MN primordiais encontrados no Grupo Salina, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nas amostras transplantadas (D7 e D14) quando comparadas as amostras apenas criopreservadas (Controle Crio). A porcentagem de folículos MN primordiais não diferiu estatisticamente entre os dias 7 e 14 pós transplante).

Tabela 5. Número total, número e porcentagem (média \pm DP) de folículos MN primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante dos animais do Grupo Salina.

| | Total | Folículos Primordiais | | | Folículos Em crescimento | | |
|------------------------|-----------|-----------------------|-------|------------------------------|--------------------------|-------|-------------------------------|
| | Folículos | nº | nº MN | % MN | nº | nº MN | % MN |
| Controle Fresco | 781 | 201 | 186 | 79,0 \pm 34,1 | 580 | 481 | 78,8 \pm 11,4 ^a |
| Controle Crio | 544 | 172 | 147 | 86,2 \pm 23,9 | 372 | 231 | 58,3 \pm 29,2 |
| D7 | 120 | 3 | 3 | 22,2 \pm 41,6 ^a | 117 | 55 | 41,8 \pm 30,1 ^{a*} |
| D14 | 186 | 14 | 10 | 25,7 \pm 41,0 ^a | 172 | 129 | 75,3 \pm 9,6 ^a |

a - Diferença significativa com relação ao Controle Crio, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

* - Diferença significativa entre o D7 e o D14 pós transplante, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

Crio = Criopreservado, nº = número, MN = morfologicamente normal, D = dia.

Uma comparação estatística entre os grupos, com relação às porcentagens médias \pm desvio padrão (DP) pode ser observada na Tabela 6. Os folículos antrais foram considerados folículos em crescimento.

Tabela 6. Comparação entre os grupos experimentais com relação à porcentagem (média \pm DP) de folículos MN, primordiais e em crescimento, nos hemiovários de controle fresco, controle da criopreservação e nos dias D7 e D14 após o transplante.

| | | Folículos Primordiais | | Folículos em Crescimento | |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| | | nº MN | % MN | nº MN | % MN |
| Grupo Controle | Controle Fresco | 536 | 88,8 \pm 24,9 | 950 | 71,5 \pm 14,7 |
| | Controle Crio | 279 | 80,6 \pm 31,9 | 586 | 72,2 \pm 11,9 |
| | D7 | 6 | 32,5 \pm 43,5 | 46 | 60,0 \pm 30,2 |
| | D14 | 1 | 12,5 \pm 33,1 | 126 | 73,7 \pm 12,8 |
| Grupo EPO | Controle Fresco | 174 | 80,3 \pm 32,0 | 508 | 83,1 \pm 6,4 ^a |
| | Controle Crio | 133 | 70,2 \pm 37,9 | 477 | 60,5 \pm 28,0 |
| | D7 | 4 | 25,0 \pm 43,3 | 166 | 78,9 \pm 13,6 ^{a*} |
| | D14 | 7 | 19,6 \pm 35,7 | 131 | 70,2 \pm 16,3 |
| Grupo Salina | Controle Fresco | 186 | 79,0 \pm 34,1 | 481 | 78,8 \pm 11,4 |
| | Controle Crio | 147 | 86,2 \pm 23,9* | 231 | 58,3 \pm 29,2 ^a |
| | D7 | 3 | 22,2 \pm 41,6 | 55 | 41,8 \pm 30,1 ^a |
| | D14 | 10 | 25,7 \pm 41,0 ^a | 129 | 75,3 \pm 9,6 |

a - Diferença significativa com relação ao Grupo Controle, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

* - Diferença significativa entre os Grupo EPO e o Grupo Salina, dentro do mesmo grupo de folículos ($p < 0,05$).

Crio = Criopreservado, n° = número, MN = morfologicamente normal, D = dia.

Como apresentado na Tabela 6, em todos os grupos experimentais (Controle, EPO e Salina) o número total de folículos MN primordiais e em crescimento encontrados no Controle Fresco foi superior ao encontrado no Controle Crio. Ainda, a porcentagem média de folículos MN em crescimento no D7 pós transplante foi significativamente maior ($p < 0,05$) no Grupo EPO ($78,9 \pm 13,6$), quando comparado ao Grupo Controle ($60,0 \pm 30,2$) e ao Grupo Salina ($41,8 \pm 30,1$). Além disso, no Grupo EPO o número de folículos MN em crescimento foi maior no D7 pós transplante quando comparado ao D14, o que não foi observado nos Grupos Controle e Salina, pois apresentaram maior número de folículos MN no D14 pós transplante (Tabela 6).

Ainda com relação à administração de EPO, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na média percentual de folículos MN em crescimento no Controle Crio ($58,3 \pm 29,2$) e no D7 ($41,8 \pm 30,1$) do Grupo Salina, quando comparado ao Grupo Controle ($72,2 \pm 11,9$ e $60,0 \pm 30,2$, respectivamente). Essa depleção folicular do Grupo Salina, com relação ao grupo controle, talvez possa elucidar a ineficácia da administração do hormônio proteico antes do transplante de tecido ovariano.

Assim, os resultados sugerem que a melhor maneira de administração da EPO seria após o recebimento dos transplantes de tecido ovariano, pois o Grupo EPO apresentou um maior desenvolvimento folicular no D7 pós transplante, comparados aos demais grupos. É importante ressaltar que efeito da EPO demonstrou não ser prolongado, visto que não houve diferença significativa entre os grupos no D14 pós transplante.

Em todos os grupos, o número de folículos em crescimento foi superior ao número de folículos primordiais. Apesar da diminuição da viabilidade folicular, foi possível encontrar folículos MN em todos os grupos analisados (Figura 11). Folículos antrais também foram encontrados após o transplante de tecido ovariano criopreservado (Figura 11C-E).

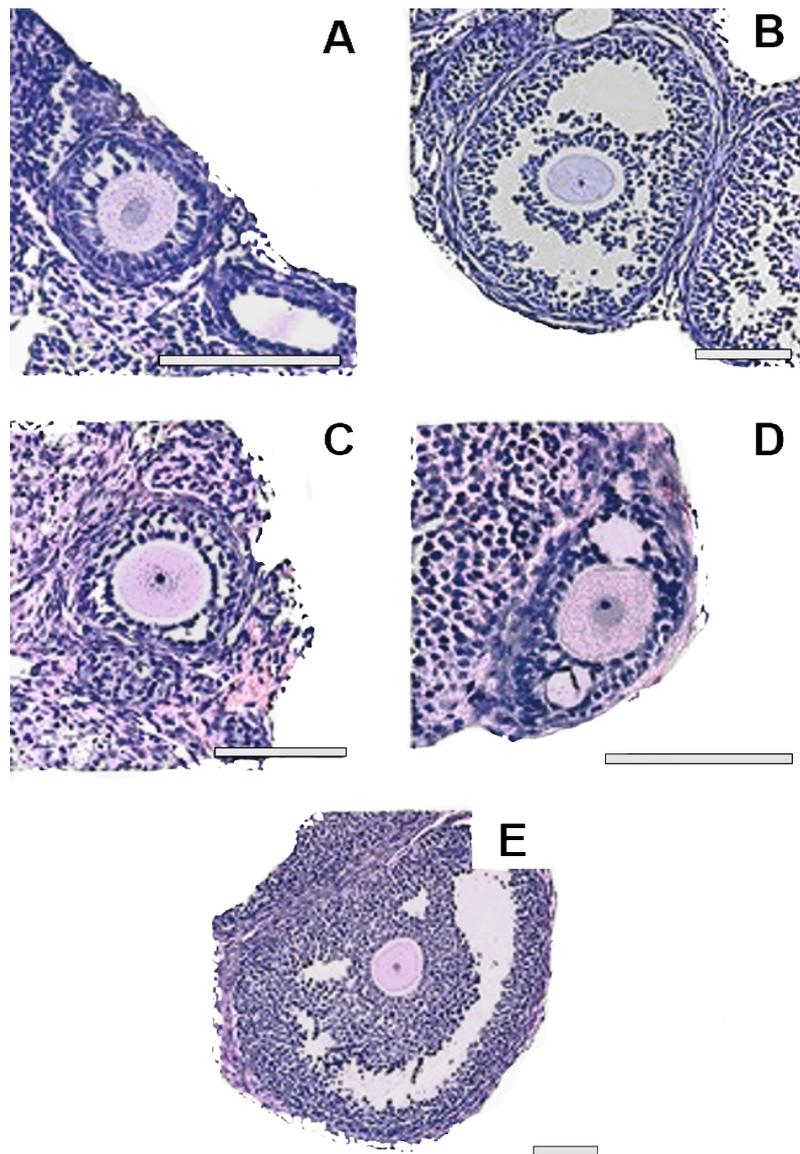


Figura 11. Tecido ovariano corado com Hematoxilina/Eosina. (A) Controle Fresco, (B) Controle Crio, (C) Transplante Grupo Controle, (D) Transplante Grupo EPO, (E) Transplante Salina. Barra = 100 μ m.

Fonte: Figura elaborada pela autora.

Entre as degenerações encontradas no tecido ovariano, as mais frequentes foram ovócito com citoplasma retraído, núcleo picnótico, que se caracteriza pela extrema condensação da cromatina, proporcionando uma coloração mais acidófila ao núcleo, ovócito totalmente descolado da estrutura folicular, com espaço vazio entre o ovócito e as células da granulosa e, por fim, ovócitos com muitos vacúolos no citoplasma, que consistiam em grandes círculos claros, sugestivos de gotas lipídicas. As degenerações mais comuns são apresentadas na Figura 12. Vale ressaltar que, o Grupo Controle apresentou maior número de folículos com degenerações, especialmente no D7 pós-transplante.

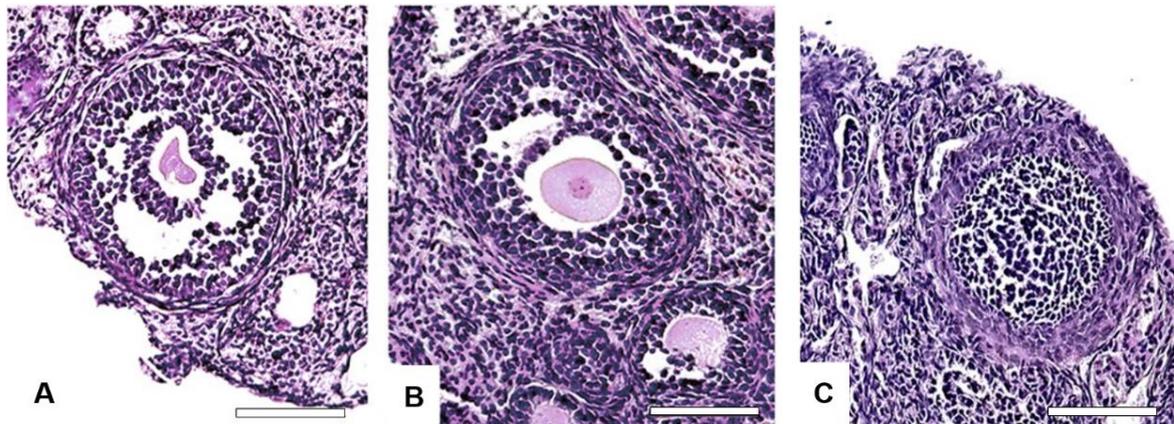


Figura 12. Principais degenerações encontradas no tecido ovariano criopreservado e transplantado, corado com Hematoxilina/Eosina. (A) ovócito retraído e células da granulosa desorganizadas, (B) ovócito descolado das células da granulosa, (C) estrutura folicular com células da granulosa justapostas e ausência do ovócito.

Barra = 100µm.

Fonte: Figura elaborada pela autora.

7. DISCUSSÃO

Até o momento, não há nenhum trabalho na literatura que avalie a atividade mitocondrial ovariana após criopreservação seguida de transplante, o que mostra o pioneirismo do nosso estudo.

Na oximetria, embora os resultados tenham demonstrado uma redução significativa no consumo de oxigênio em relação ao tecido ovariano fresco, isso se deu conforme o tratamento ao qual o tecido foi submetido (criopreservação e/ou transplante). Entretanto, em todas as amostras analisadas foi observada atividade mitocondrial.

Essa redução na atividade mitocondrial já era esperada, pois a criopreservação do tecido ovariano pode representar um grande desafio, principalmente, no que se refere à composição do tecido, com diferentes tipos de células e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, o que pode exigir diferentes condições para a técnica (CAMPOS *et al.*, 2016). Além disso, é possível encontrar na literatura os principais danos aos tecidos, provocados pelos métodos de criopreservação e transplante, como por exemplo, perda de membranas, presença de vacúolos e debris na zona pelúcida, danos nas cristas e na matriz das mitocôndrias, lesões de isquemia-reperfusão, fragmentação do DNA, dentre outros (ANDERSON; WALLACE; TELFER, 2017; CARVALHO *et al.*, 2012; COMMINS *et al.*, 2012; DONFACK *et al.*, 2017; revisado por LEONEL; LUCCI; AMORIM, 2019).

Nesse cenário, foi observada nas amostras criopreservadas (Grupo Crio) uma diminuição significativa na *Spare Capacity* e nos estados C2-Oligo e C2-ETS, o que é indicativo de uma possível desregulação metabólica. Entretanto, apesar de toda essa diminuição em termos de metabolismo, as amostras criopreservadas foram as que mais se assemelharam ao tecido ovariano fresco. Ainda, foi possível observar que a criopreservação não afetou o consumo de oxigênio direcionado à síntese de ATP (*ATP-Linked*), o que pode ter contribuído para uma melhor viabilidade e adaptação metabólica do tecido criopreservado.

Com relação às amostras transplantadas, tanto frescas quanto criopreservadas, também houve uma diminuição da função mitocondrial, em comparação ao Grupo Fresco. Porém, isso ficou evidente em todos os estados mitocondriais analisados. Esses achados sugerem que os danos causados pelo transplante são maiores que os danos originados pela criopreservação. Este fato pode ainda estar relacionado ao período de isquemia e hipóxia que o tecido ovariano é acometido após o transplante, até que a neovascularização local possa ser completamente estabelecida.

De acordo com Cacciottola et al. (2018), o período de isquemia-reperfusão (IR) dura cerca de 2 a 5 dias em camundongos e resulta em uma depleção folicular de 50 a 90%. Um estudo de Youm et al. (2016) relatou que as lesões isquêmicas podem ser mais prejudiciais ao tecido do que as lesões criogênicas. Isso também foi evidenciado pela análise histológica realizada, visto que houve uma depleção no número total de folículos encontrados nas amostras transplantadas, tanto frescas quanto previamente criopreservadas, em comparação às amostras não transplantadas.

Por outro lado, este estudo mostrou que ambos os grupos transplantados também esgotaram a capacidade ociosa (*Spare Capacity*), mas não restauraram a síntese de ATP. Cacciottola et al. (2018) analisaram a atividade metabólica e o estresse oxidativo em tecido ovariano enxertado usando a técnica de microdiálise e observaram que a pressão parcial de oxigênio se estabiliza aproximadamente 10 dias após o transplante. Embora não haja dados na literatura sobre o estresse oxidativo durante a revascularização do tecido transplantado, sabe-se que a reoxigenação dos tecidos hipóxicos pode levar à remodelação metabólica e reprogramação mitocondrial, seguida de produção de ROs, além de inflamação e morte celular (revisado por BIDDLESTONE; BANDARRA; ROCHA, 2015; CRUZ *et al.*, 2018). Nesse sentido, talvez o intervalo de sete dias para o transplante analisado no presente estudo tenha sido insuficiente para a recuperação do tecido e restauração completa da função mitocondrial.

É importante ressaltar que houve uma interação entre os fatores. Ou seja, houve maior perturbação do metabolismo mitocondrial quando o tecido foi submetido tanto à criopreservação quanto ao transplante. Este fato também foi demonstrado pela análise histológica, pois aconteceu uma diminuição significativa nas porcentagens médias de folículos MN no Grupo Transplante Crio, em comparação ao Grupo Crio e ao Grupo Fresco. Além disso, o transplante de tecido ovariano fresco apresentou maior número e maiores porcentagens de folículos MN primordiais e em crescimento, em comparação ao tecido transplantado criopreservado. Estudos anteriores já demonstraram redução semelhante na densidade folicular após criopreservação e/ou transplante do tecido ovariano em diferentes espécies, tais como em camundongos (AYUANDARI *et al.*, 2016; MAHMOODI *et al.*, 2014), felinos (VILELA *et al.*, 2019) suínos (BORGES *et al.*, 2009), caprinos (RODRIGUES, A. P. R. *et al.*, 2004) e bovinos (LUCCI *et al.*, 2004).

Entretanto, o transplante de tecido ovariano criopreservado mostrou-se viável neste estudo. Embora em menor quantidade, folículos MN pré-antrais e antrais foram encontrados após congelamento, descongelamento e transplante por 7 dias. A atividade mitocondrial também foi observada. Gosden *et al.* (1994) foram os primeiros a demonstrar que os ciclos espontâneos do ovário e a fertilidade podem ser restaurados pelo autotransplante do córtex ovariano em um animal. Na revisão realizada por Gellert *et al.* (2018) nos registros da Dinamarca, 95% das pacientes recuperaram a função ovariana e a taxa de gravidez foi 40,5%. Conforme revisado por Amorim *et al.* (2018), Alemanha, França, Bélgica e Dinamarca são os países com a maior experiência em transplante de tecido ovariano criopreservado. Outros estudos também evidenciaram a viabilidade do tecido ovariano após o transplante, demonstrando a restauração da função ovariana, viabilidade folicular e taxas de gestação razoáveis (revisado por AMORIM *et al.*, 2018; DONNEZ; DOLMANS, 2013, 2015, 2017).

Em relação à atividade bioenergética, muitas células operam em um limite basal, exigindo apenas parte da capacidade energética total (DESLER *et al.*, 2012). Dessa forma, sob certas condições, um tecido pode demandar um aumento repentino de energia celular adicional em resposta ao estresse ou incremento da carga de trabalho, o que pode eventualmente estar relacionado à senescência ou mesmo à morte celular, em casos de recursos energéticos insuficientes (DESLER *et al.*, 2012). Assim, após congelamento e descongelamento das amostras e restauração do suprimento sanguíneo após períodos de isquemia, a função mitocondrial pode ser capaz de se adaptar e responder às demandas energéticas (ACIN-PEREZ *et al.*, 2020; DESLER *et al.*, 2012).

Diante disso, futuras técnicas destinadas a proteger a funcionalidade mitocondrial podem resultar na recuperação mais rápida e eficiente do tecido transplantado, especialmente após a criopreservação. Como tal, os agentes antioxidantes têm sido cada vez mais utilizados para diminuir o estresse causado por procedimentos de criopreservação e transplante (LEN; KOH; TAN, 2019; YOUM *et al.*, 2016). Alguns compostos podem exercer efeitos modulando genes responsáveis pela sobrevivência celular, apoptose e estresse oxidativo.

Neste sentido, os resultados da fase II demonstraram que em todos os grupos experimentais (Controle, EPO e Salina) o número total de folículos MN primordiais e em crescimento encontrados no Controle Fresco foi superior ao encontrado no Controle Crio. Segundo a literatura, durante a desidratação excessiva e consequente estresse hídrico, ao qual o tecido criopreservado é submetido, as células se retraem e ocorre uma contração da membrana celular, o que pode provocar perda de parte do material da membrana plasmática, ocasionando a lise das células ao retornar às condições isotônicas normais (CARVALHO *et al.*, 2012). Assim, alterações na zona pelúcida, formação de vacúolos, formação de cristais de gelo intracelular e fragmentação do DNA são os possíveis danos provocados pelo processo de criopreservação (ANDERSON; WALLACE; TELFER, 2017; CARVALHO *et al.*, 2012; revisado por FAUSTINO *et al.*, 2011).

Nos Grupos Controle e Salina o número de folículos MN em crescimento foi maior no D14 pós transplante quando comparado ao D7. Segundo a literatura, o tempo de 14 dias pode ter conferido maiores condições para o restabelecimento metabólico do tecido ovariano, o que impactou positivamente na sobrevivência e desenvolvimento folicular, visto que o enxerto em camundongos necessita de 2 a 5 dias para que ocorra a neovascularização local (DONFACK *et al.*, 2017; KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017; VAN EYCK *et al.*, 2010).

Em contrapartida, este fato não foi observado no Grupo EPO, pois mesmo não diferindo estatisticamente entre os dias 7 e 14 pós transplante, foi observado um crescimento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem média de folículos MN em crescimento no D7 quando comparado ao Grupo Controle e ao Grupo Salina. Provavelmente, este fato pode estar relacionado às atividades angiogênicas, antiapoptóticas e antioxidantes da EPO, que podem ter reduzido o período de IR, bem como, auxiliado o desenvolvimento folicular, visto que diversos efeitos protetores sobre o complexo IR foram observados em estudos anteriores (BAKHACH, 2009; COMMINS *et al.*, 2012; KARACA *et al.*, 2009; MAHMOODI *et al.*, 2014; TAFTI *et al.*, 2018).

Ainda com relação à administração de EPO, os resultados sugerem que a maneira mais eficaz para a sua utilização é após o recebimento dos transplantes de tecido ovariano, pois o

Grupo EPO apresentou um maior desenvolvimento folicular comparado aos demais grupos. Entretanto, o efeito da EPO demonstrou não ser prolongado, visto que não houve diferença significativa entre os grupos no D14 pós transplante. Assim, foi observado que a EPO pode prevenir a apoptose das células ovarianas durante os primeiros dias do transplante, até o estabelecimento da revascularização, protegendo o tecido contra a depleção folicular inicial.

De fato, estudos anteriores demonstraram que o uso da EPO melhorou a sobrevivência folicular e aumentou a taxa de sobrevivência do enxerto, provavelmente, reduzindo as lesões isquêmicas, melhorando a neoangiogênese e agindo como antioxidante, nos primeiros dias do transplante (KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2017; MAHMOODI *et al.*, 2014; TAFTI *et al.*, 2018; WAKASA *et al.*, 2016). Mahmoodi et al. (2014) observaram que houve aumento na proporção de diferentes tipos de folículos no grupo tratado com EPO. Eles discutiram, ainda, que a EPO poderia reduzir a peroxidação lipídica, devido às suas propriedades antioxidantes, e atenuar o estresse oxidativo aumentando o número de eritrócitos, melhorando a angiogênese e reduzindo a taxa de apoptose celular.

Para acrescentar, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na média percentual de folículos MN em crescimento no Controle Crio e no D7 do Grupo Salina, quando comparado ao Grupo Controle. Essa depleção folicular do Grupo Salina talvez possa elucidar a ineficácia da administração do hormônio proteico antes do transplante de tecido ovariano.

Neste sentido, no estudo de Mahmoodi et al. (2014) foi utilizado 500 UI/Kg de EPO, via intraperitoneal, a partir de um dia antes até sete dias após o transplante de tecido ovariano humano xenotransplantado em camundongos, o que possibilitou a obtenção de maior quantidade de folículos, mínima taxa de morte celular e uma maior produção de estradiol. Tafti et al. (2018) utilizaram 500 UI/kg de EPO, imediatamente após o transplante e por até cinco dias depois. Sayyah-melli et al. (2012) utilizaram doses de 150 UI/kg, via subcutânea (SC), no momento cirúrgico até 72 horas após os transplantes, ratificando o efeito antioxidante do hormônio na reperfusão do tecido ovariano.

Em nosso estudo, em todos os grupos o número de folículos em crescimento foi superior ao número de folículos primordiais. Uma possível explicação para este fato pode ser a ausência do hormônio antimulleriano (AMH) (DE MORAIS *et al.*, 2017). Produzido pelas células da granulosa de folículos em crescimento, o AMH desempenha um importante papel no recrutamento folicular, agindo, portanto, no controle da reserva folicular ovariana (DE MORAIS *et al.*, 2017). Devido às lesões de IR ocorridas no tecido ovariano transplantado é possível verificar uma redução dos folículos em crescimento. Essa perda folicular proporciona

uma queda na produção do AMH, o que provoca a ativação e o recrutamento de folículos primordiais em um ritmo mais acelerado que o normal, resultando em um ovário com um número superior de folículos em crescimento, quando comparado ao número de folículos primordiais (DE MORAIS *et al.*, 2017).

Com relação aos folículos primordiais, não foi observado nenhum efeito estatístico na sobrevivência desses folículos com relação à administração de EPO. Talvez, este fato possa estar relacionado à ativação em massa ocasionada pela ausência do AMH, que provocou uma redução dessa população folicular, além do fato dos folículos primordiais precisarem de um menor aporte sanguíneo e de nutrientes para se desenvolver, e de tolerarem maiores episódios isquêmicos, visto que, possuem atividade metabólica reduzida, devido à sua estrutura celular mais simples (MAHMOODI *et al.*, 2014; PICTON, 2001; PICTON; GOSDEN, 2000).

Por fim, o presente estudo indicou que a EPO tem ação mais acentuada quando administrada após o transplante, que o seu efeito não é prolongado e que o hormônio por vir a ter um potencial em reduzir as lesões de IR e incrementar o desenvolvimento folicular.

8. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho foi possível observar que a criopreservação e o transplante do tecido ovariano têm impacto na atividade mitocondrial e na viabilidade folicular. Foi demonstrado que o transplante tem um impacto maior do que a criopreservação propriamente dita, pois as amostras transplantadas (frescas ou criopreservadas) apresentaram menores respostas aos estados mitocondriais e menor número de folículos morfológicamente normais. Além disso, houve interação entre os fatores, demonstrando que os tecidos criopreservados são ainda mais sensíveis ao transplante, do que os tecidos frescos.

Com relação ao efeito da eritropoietina na sobrevivência folicular, foi observado que o hormônio contribuiu com a redução das lesões de isquemia-reperfusão, incrementando o desenvolvimento folicular no D7 pós-transplante, mas que seu efeito não é prolongado. Além disso, seu potencial de ação é maior quando administrada após o recebimento dos transplantes.

Estudos adicionais são necessários para investigar melhor o papel desempenhado pela EPO e, principalmente, elucidar se há relação do hormônio com a preservação do metabolismo mitocondrial do tecido ovariano transplantado. Além disso, sugere-se a análise de outros intervalos de tempo para a avaliação dos estados mitocondriais das amostras transplantadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIN-PEREZ, Rebeca *et al.* A novel approach to measure mitochondrial respiration in frozen biological samples. **The EMBO Journal**, [s. l.], p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/emj.2019104073>

ADAMSON, John W. Regulation of red blood cell production. **American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 101, n. 2 A, p. 4S-6S, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(96\)00160-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(96)00160-x)

AMORIM, Christiani A. *et al.* Cryostorage and retransplantation of ovarian tissue as an infertility treatment. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 89–102, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.09.002>

AMORIM, Christiani A. *et al.* Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 2146–2156, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/det103>

ANDERSON, Richard A.; WALLACE, W. Hamish B.; TELFER, Evelyn E. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. **Human Reproduction Open**, [s. l.], v. 2017, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/hropen/hox001>

ARAÚJO, Valdevane R. *et al.* In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, [s. l.], v. 12, p. 78, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>

ARAV, Amir; PATRIZIO, Pasquale. Techniques of Cryopreservation for Ovarian Tissue and Whole Ovary. **Clinical Medicine Insights: Reproductive Health**, [s. l.], v. 13, p. 117955811988494, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1179558119884945>

AYUANDARI, Sarrah *et al.* Follicular growth after xenotransplantation of cryopreserved/thawed human ovarian tissue in SCID mice: dynamics and molecular aspects. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 1585–1593, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0769-2>

BAKHACH, Joseph. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent

advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 119–126, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/org.5.3.9583>

BENSON, Erica E. Cryopreservation Theory. In: REED, Barbara M. (org.). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer Sed. [S. l.: s. n.], 2008. v. 6, p. 15–30.

BENTO, Rafael; DAMASCENO, Lucia; AQUINO-NETO, Francisco. Eritropoietina humana recombinante no esporte: uma revisao. **Revista brasileira de medicina do esporte**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 169–180, 2003.

BIDDLESTONE, John; BANDARRA, Daniel; ROCHA, Sonia. The role of hypoxia in inflammatory disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 859–869, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2079>

BORGES, E. N. *et al.* Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 195–200, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.003>

BRITO, D. C. C. *et al.* Betaine-loaded CaCO₃ microparticles improve survival of vitrified feline preantral follicles through higher mitochondrial activity and decreased reactive oxygen species. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 531–537, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD19068>

CACCIOTTOLA, Luciana *et al.* In vivo characterization of metabolic activity and oxidative stress in grafted human ovarian tissue using microdialysis. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 534-544.e3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.009>

CAMPOS, Ana Luisa Menezes *et al.* Comparação da viabilidade do tecido ovariano após congelamento lento e vitrificação em modelo bovino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 333–339, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1586258>

CARVALHO, Adeline de Andrade *et al.* Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 1–15, 2012.

CASTRO, Simone Vieira *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e

utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 1–17, 2011.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Animais de laboratório: O camundongo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.

COMMIN, L. *et al.* Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 461–471, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD11166>

CRUZ, L. C. *et al.* Honey protects against wings posture error and molecular changes related to mitochondrial pathways induced by hypoxia/reoxygenation in adult *Drosophila melanogaster*. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 291, p. 245–252, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.033>

DALCIN, L; LUCCI, Cm. Criopreservação de embriões de animais de produção : princípios criobiológicos e estado atual. **Rev. bras. Reprod. Anim.**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 149–159, 2010. Disponível em: <http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/406.pdf>

DE MORAIS, Rodrigo *et al.* Hormônio antimülleriano: pode uma realidade usada em seres humanos ser transferida a bovinos e búfalos Antimüllerian Hormone: can a reality in humans translate to bovine and buffalos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 693–698, 2017. Disponível em: www.cbra.org.br

DEMEESTERE, I. *et al.* Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 649–665, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp021>

DESLER, Claus *et al.* Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? **Journal of Aging Research**, [s. l.], v. 2012, p. 1–9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/192503>

DEVESA, Jesús; CAICEDO, Diego. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, n. JULY, p. 1–17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00450>

DIAZ-GARCIA, Cesar *et al.* Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 478–485, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.018>

DISSEN, G. A. *et al.* Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 1146–1154, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo.134.3.8119153>

DOLMANS, Marie Madeleine; FALCONE, Tommaso; PATRIZIO, Pasquale. Importance of patient selection to analyze in vitro fertilization outcome with transplanted cryopreserved ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 279–280, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.050>

DONFACK, N. J. *et al.* Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. **Zygote**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199417000338>

DONNEZ, J *et al.* Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Obstetrics & Gynecology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 214, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.aog.0000150288.43243.34>

DONNEZ, Jacques; DOLMANS, Marie Madeleine. Fertility preservation in women. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–15, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.205>

DONNEZ, Jacques; DOLMANS, Marie Madeleine. Fertility preservation in women. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 377, n. 17, p. 1657–1665, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1614676>

DONNEZ, Jacques; DOLMANS, Marie Madeleine. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1167–1170, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0544-9>

DONNEZ, Jacques; DOLMANS, Marie Madeleine. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1188–

1197, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.09.003>

EPPIG, John J. Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect. *In: CURRENT BIOLOGY*. [s. l.]: Elsevier Ltd, 2018. v. 28, p. R354–R356. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.005>

EWELINA WARZYCH; PAULINA LIPINSKA. Advance Publication by J-STAGE Journal of Reproduction and Development. **Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-102>

EYDEN, Brian *et al.* Ultrastructural preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. **Ultrastructural Pathology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 239–245, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/019131290505293>

FAUSTINO, L R *et al.* Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 3–15, 2011.

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

FORTUNE, J. E. *et al.* The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 163, n. 1–2, p. 53–60, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00240-3)

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 82–83, p. 109–126, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>

FRIEDMAN, Or *et al.* Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 474–482, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/der385>

GARCÍA-ROCHE, Mercedes *et al.* Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. **Redox Biology**, [s. l.], v. 17, p. 207–212, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.008>

GELLERT, S. E. *et al.* Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 561–570, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1144-2>

GOSDEN RG, BAIRD DT, WADE JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 597–603, 1994.

GRATL, Alexandra *et al.* Regeneration of Mitochondrial Function in Gastrocnemius Muscle in Peripheral Arterial Disease After Successful Revascularisation. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 109–115, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.08.011>

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7a edição. São Paulo - SP: Editora Manole Ltda, 2004.

HAMED, Saher *et al.* Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 11, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013986>

HERNÁNDEZ, Carolina Castillo *et al.* Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: The role of erythropoietin receptor. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1381–1389, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215240>

JENSEN, Annette Klüver; KRISTENSEN, Stine Gry; ANDERSEN, Claus Yding. Ovarian Tissue Cryopreservation for Fertility Preservation. *In*: SPEARS, Richard A. Anderson e Norah (org.). **Cancer Treatment and the Ovary: Clinical and Laboratory Analysis of Ovarian Toxicity**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. v. 1, p. 93–107. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801591-9.00007-2>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 12ªed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2013. ISSN 1098-6596.v. 53

KALTHUR, Guruprasad *et al.* Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 1149–1151, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.005>

KARACA, Mehmet *et al.* Protective effects of erythropoietin on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 144, n. 2, p. 157–162, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.03.011>

KIMÁKOVÁ, Patrícia *et al.* Erythropoietin and its angiogenic activity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 19–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18071519>

KOLUSARI, Ali; OKYAY, Ayşe Güler; KOÇKAYA, Evrim Arzu. The Effect of Erythropoietin in Preventing Ischemia–Reperfusion Injury in Ovarian Tissue Transplantation. **Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 406–413, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1933719117715127>

LEE, Sanghoon *et al.* Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 13, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20133346>

LEITÃO, Cintia Camurça Fernandes *et al.* Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 215, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16332>

LEN, Jia Soon; KOH, Wen Shuo Darius; TAN, Shi Xiong. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 1–25, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20191601>

LEONEL, Ellen Cristina Rivas; LUCCI, Carolina M.; AMORIM, Christiani A. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 173–181, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000499054>

LIU, Jun *et al.* Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn

mouse ovaries. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 605–611, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.605>

LUCCI, Carolina M. *et al.* Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 1101–1114, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.004>

MAHMOODI, Monireh *et al.* Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts. **Reproduction**, [s. l.], v. 147, n. 5, p. 733–741, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-13-0379>

MAHMOODI, Monireh *et al.* N-acetylcysteine improves function and follicular survival in mice ovarian grafts through inhibition of oxidative stress. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 101–110, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.013>

MARKSTRÖM, Emilia *et al.* Survival factors regulating ovarian apoptosis - Dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 23–30, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230023>

MARTINS, Fabricio Sousa *et al.* Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 36–49, 2008.

MATOS, M.; BEZERRA, M.; VICENTE, W.R.R. Criopreservação e xenotransplante de tecido ovariano. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 467–471, 2011.

MCGEE, Elizabeth A.; HSUEH, Aaron J.W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.21.2.200>

MOLE, David R; RATCLIFFE, Peter J. Erythropoietin : An Historical Overview of Regulation. *In*: TEXTBOOK OF NEPHRO-ENDOCRINOLOGY. Seconded. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. p. 189–205. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803247-3.00011-8>

MORI, Shozo *et al.* Erythropoietin and its derivative protect the intestine from severe ischemia/reperfusion injury in the rat. **Surgery**, [s. l.], v. 143, n. 4, p. 556–565, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.surg.2007.12.013>

MYERS, M. *et al.* Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary.

Reproduction, [s. l.], v. 127, n. 5, p. 569–580, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00095>

NISOLLE, Michelle *et al.* Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 122–129, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00548-3)

NUKALA, Vidya N. *et al.* Cryopreservation of brain mitochondria: A novel methodology for functional studies. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 152, p. 48–54, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.08.017>

OHANA, Y. Haim *et al.* Erythropoietin. *In: HANDBOOK OF BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES*. Second Edied. [S. l.]: Elsevier Inc., 2013. p. 1619–1626. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00221-9>

PAULINI, Fernanda; MELO, Eduardo O. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 354–361, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x>

PEARL, Raymond; FAIRCHILD, Thomas Everett. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. XIX. On the influence of free choice of food materials on winter egg production and body weight. **The American Journal of Hygiene**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 253–277, 1921. Disponível em: <https://doi.org/10.7723/antiochreview.72.3.0546>

PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1193–1210, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00478-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00478-2)

PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G. In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 27–35, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00294-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00294-X)

PRITCHETT, Kathleen R.; TAFT, Robert A. Reproductive Biology of the Laboratory Mouse. *In: THE MOUSE IN BIOMEDICAL RESEARCH*. [S. l.: s. n.], 2007. v. 3, p. 91–121. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50057-1>

RODRIGUES, A. P. R. *et al.* Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 1009–1024, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.04.001>

RODRIGUES, Ana Paula Ribeiro *et al.* Criopreservação do tecido ovariano visando restaurar a fertilidade humana. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 188–193, 2016.

SANTOS, Regiane Rodrigues *et al.* Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Rev Bras Reprod Anim**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 9–15, 2008. Disponível em: www.cbra.org.br

SANTOS, Regiane Rodrigues dos. **Criopreservação de folículos pré-antrais ovinos**. Fortaleza- CE: Universidade Estadual do Ceará - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2005.

SANTOS, Andre Luiz Pinto. **Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros**. Ribeirão Preto - SP: [s. n.], 2018.

SAYAN, Dayangan Cemile *et al.* Could erythropoietin reduce the ovarian damage of cisplatin in female rats? **Gynecological Endocrinology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 309–313, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1395836>

SAYYAH-MELLI, Manizheh *et al.* The effect of erythropoietin against oxidative damage associated with reperfusion following ovarian detorsion. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 162, n. 2, p. 182–186, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.02.014>

SETTI, Paolo E. Levi *et al.* FSH and LH together in ovarian stimulation. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], v. 115, p. 34–39, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.01.013>

SINGH, Ajay K. *et al.* Erythropoietin, Anemia and Kidney Disease. *In: NEPHRO-ENDOCRINOLOGY*. First Edited. [S. l.]: Elsevier Ltd., 2009. p. 49–60. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373870-7.00005-3>

SOLEIMANI, Reza; HEYTENS, Elke; OKTAY, Kutluk. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. **PLoS**

ONE, [s. l.], v. 6, n. 4, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019475>

SPANDOU, Evangelia *et al.* Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. **Brain Research**, [s. l.], v. 1021, n. 2, p. 167–172, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.057>

SUZUKI, Hiroshi *et al.* Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 25, n. 11–12, p. 571–575, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9271-9>

TAFTI, Dehghani *et al.* Vitriified Xenograft Survived Human Ovarian Follicles Using Erythropoietin. **Journal of Gynecology and Obstetrics Forecast**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–3, 2018. Disponível em: <https://scienceforecastoa.com/Articles/JGOF-V1-E1-1001.pdf>

TELFER, Evelyn E.; MCLAUGHLIN, Marie. In vitro development of ovarian follicles. **Seminars in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 15–23, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1268700>

TELFER, Evelyn E.; MCLAUGHLIN, Marie. Natural history of the mammalian oocyte. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 288–295, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60341-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60341-0)

VAN EYCK, Anne Sophie *et al.* Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 1676–1685, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>

VILELA, Janice M.V. *et al.* Function of cryopreserved cat ovarian tissue after autotransplantation. **Animals**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani9121065>

WAKASA, I. *et al.* Distribution of follicles in canine ovarian tissues and xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissues with even distribution of follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 51, p. 1–5, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.12857>

WEISS, Mitchell J.; BHOOPALAN, Senthil Velan; HUANG, Lily Jun shen. Erythropoietin regulation of red blood cell production: From bench to bedside and back. **F1000Research**, [s.

l.], v. 9, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.26648.1>

XU, Xia *et al.* The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. **Biotechnology Progress**, [*s. l.*], v. 26, n. 3, p. 827–837, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.368>

YANG, Hyunwon *et al.* Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? **Fertility and Sterility**, [*s. l.*], v. 90, n. 4 SUPPL., p. 1550–1558, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.086>

YANG, Qiyu; ZHU, Lixia; JIN, Lei. Human Follicle in vitro Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. **Frontiers in Endocrinology**, [*s. l.*], v. 11, n. August, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00548>

YOUM, Hye Won *et al.* Effects of angiopoietin-2 on transplanted mouse ovarian tissue. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 11, n. 11, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166782>

YOUM, Hye Won *et al.* Transplantation of mouse ovarian tissue: Comparison of the transplantation sites. **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 83, n. 5, p. 854–861, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.026>

ZHANG, Qing *et al.* Effects of l-carnitine on follicular survival and graft function following autotransplantation of cryopreserved-thawed ovarian tissues. **Cryobiology**, [*s. l.*], v. 71, n. 1, p. 135–140, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.04.008>