

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Departamento de Ciências fisiológicas**

**Programa de pós-graduação em biologia animal**

*Nanowarming* como alternativa para o aquecimento de tecido ovariano bovino  
vitrificado

Milena Santos Durão

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Lucci

Brasília

2025

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**Departamento de Ciências fisiológicas**

**Programa de pós-graduação em biologia animal**

Milena Santos Durão

*NANOWARMING* COMO ALTERNATIVA PARA O AQUECIMENTO DE TECIDO  
OVARIANO BOVINO VITRIFICADO

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências  
Biológicas pelo Programa de Pós Graduação em  
Biologia Animal da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carolina Madeira Lucci

BRASÍLIA

2025

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SD951nn Santos Durão, Milena

Nanowarming como alternativa para o aquecimento de tecido ovariano bovino vitrificado / Milena Santos Durão; orientador Carolina Madeira Lucci. Brasília, 2025. 53 p.

Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade de Brasília, 2025.

1. Nanotecnologia. 2. Criobiologia. 3. Preservação da fertilidade. 4. Tecido ovariano. I. Madeira Lucci, Carolina, orient. II. Título.

**MILENA SANTOS DURÃO**

***Nanowarming* como alternativa para o aquecimento de tecido ovariano bovino vitrificado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

**APROVADA DA EM: 28/08/2025**

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dra. Christiani Andrade Amorim – UCLouvain**

---

**Prof. Dr. José Felipe W. Sprícigo – Universidade Federal do Goiás**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Madeira Lucci (Orientadora / Presidente)**

**BRASÍLIA – DF**

**2025**

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Ana e Edilson, que são tudo para mim, me ensinaram o valor do estudo e sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha brilhante e querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Carolina Madeira Lucci, por acreditar em mim desde o início, acolher minhas ideias com entusiasmo e, com sensibilidade e competência, e dar vida a este projeto. Tenho imenso orgulho de ser sua aluna e profunda admiração. Sem sua orientação, apoio e confiança, este sonho não teria se concretizado.

Aos colegas do laboratório, meu sincero agradecimento por toda a ajuda e parceria ao longo deste trabalho. À Juliana Lis, pelas inúmeras horas dedicadas aos experimentos, pelas trocas de conhecimento e apoio nas análises. À Mariana, pelo auxílio nas coletas de ovários. À Cecibel, pelas contribuições valiosas na criopreservação e na manipulação dos materiais. Vocês foram fundamentais para o andamento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela síntese e cessão das nanopartículas utilizadas no projeto.

À equipe de pesquisadores da EMBRAPA-CENARGEN, especialmente à Dra. Margot Alves, à Nayara e à Isa, pela doação dos ovários bovinos e pelo apoio à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo E. N. Sousa e sua equipe, pela disponibilidade na instalação, ensino e manutenção do equipamento Magnetherm, que foi crucial para a execução do projeto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo suporte financeiro por meio da bolsa de estudos, que tornou possível minha dedicação integral à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPG-Bio Ani) e a todos os professores que contribuíram, direta ou indiretamente, para a minha formação científica, deixo meu reconhecimento e gratidão.

Aos meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado com palavras de incentivo e apoio nos momentos difíceis. Em especial, ao Mateus e à Juliana, companheiros de jornada desde o primeiro semestre na UnB, que compartilharam comigo os desafios e conquistas desta trajetória.

Por fim, à minha família, por acreditarem em mim e compreenderem meus períodos de ausência, estresse e dedicação. Aos meus irmãos pelo apoio incondicional. Ao meu companheiro Victor, que esteve comigo nos dias bons e, especialmente, nos difíceis — obrigada por acreditar em mim até quando eu duvidei. Sem o amor, paciência e o apoio de vocês, nada disso seria possível.

“Life breaks free. Life expands to new territories. Painfully, perhaps even dangerously. But life finds a way.”

— **Michael Crichton, Jurassic Park**



## RESUMO

A vitrificação de tecido ovariano é uma técnica promissora para a preservação da fertilidade de mulheres submetidas a tratamentos gonadotóxicos ou com falência ovariana precoce. Este estudo avaliou o uso da tecnologia de *nanowarming* como alternativa ao método convencional de reaquecimento por banho-maria, visando otimizar a criopreservação de tecido ovariano bovino por vitrificação. Inicialmente, foram testadas cinco concentrações de nanopartículas para determinar a curva de aquecimento, sendo selecionadas as concentrações de 8, 10 e 12 mg NP/mL para a etapa experimental. As amostras foram distribuídas em cinco grupos (n=5): controle fresco, vitrificação com banho-maria, e vitrificação com *nanowarming* nas três concentrações selecionadas. As análises foram realizadas por meio de curvas de aquecimento e avaliação histológica. Os resultados indicaram que o grupo tratado com 10 mg NP/mL apresentou maior eficiência na taxa de aquecimento e menor variação térmica, alcançando 37 °C mais rapidamente. Morfologicamente, esse grupo apresentou percentual de folículos normais semelhante ao controle e superior aos demais grupos ( $p<0,05$ ). Concluiu-se que o uso de *nanowarming* com 10 mg NP/mL proporcionou melhor preservação da integridade morfológica de folículos pré-antrais em tecido ovariano bovino vitrificados, destacando seu potencial como método promissor de reaquecimento na criobiologia reprodutiva.

**Palavras chave:** vitrificação. ovário. criopreservação. preservação da fertilidade. folículos pré-antrais. hipertermia mediana por nanopartículas.

## ABSTRACT

Ovarian tissue vitrification is a promising technique for fertility preservation in women undergoing gonadotoxic treatments or presenting with premature ovarian failure. This study evaluated the use of nanowarming technology as an alternative to conventional water bath warming for the cryopreservation of bovine ovarian tissue by vitrification. Initially, five nanoparticle concentrations were tested to establish a heating curve, with 8, 10, and 12 mg NP/mL selected for experimental analysis. Samples were divided into five groups (n=5): fresh control, vitrification with water bath warming, and vitrification with nanowarming at the three selected concentrations. Heating curves and histological assessments were used for analysis. Results showed that the 10 mg NP/mL nanowarming group achieved a more efficient heating rate and faster attainment of 37 °C, with less temperature fluctuation. Morphologically, this group showed a statistically significant higher percentage of normal primordial and growing follicles ( $p<0.05$ ), similar to the fresh control. These findings indicate that nanowarming at 10 mg NP/mL improves morphological preservation of preantral follicles in vitrified bovine ovarian tissue, highlighting its potential as a promising warming technique in reproductive cryobiology.

**Keywords:** vitrification. ovary. cryopreservation. fertility preservation. preantral follicles. nanoparticle mediated hyperthermia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> A) Equipamento Magnetherm (Nanotherics, 2024). B) Equipamento Magnetherm utilizado no experimento, com câmera térmica FLIR T-460 posicionada para aferição da temperatura.....	16
<b>Figura 2.</b> Desenho esquemático do delineamento experimental. ....	19
<b>Figura 3.</b> Curvas de aquecimento da solução contendo nanopartículas em diferentes concentrações.....	21
<b>Figura 4.</b> Soluções de aquecimento contendo diferentes concentrações da Nanopartícula.....	22
<b>Figura 5.</b> Curvas de aquecimento de fragmento de tecido ovariano vitrificado durante o reaquecimento utilizando nanowarming com solução de aquecimento contendo diferentes concentrações da nanopartícula (8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL) ou no aquecimento tradicional (BM – Banho-maria) .....	23
<b>Figura 6.</b> Curvas de aquecimento de fragmentos de tecido ovariano vitrificados (N=5, cada linha no gráfico representa um fragmento) nos 30 primeiros segundos do reaquecimento (inserts mostram os 5 primeiros segundos em detalhe) utilizando o banho maria – BM (A), e as soluções de aquecimento contendo diferentes concentrações da nanopartícula - 8 mg NP/mL (B), 10 mg NP/mL (C) e 12 mg NP/mL (D).....	24
<b>Figura 7.</b> Proporção (média $\pm$ DP) de folículos primordiais e em crescimento morfolologicamente normais nos diferentes tratamentos.....	26
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografias de fragmentos de tecido ovariano bovino. A) Tecido fresco (Grupo Controle); Tecido vitrificado e aquecido B) da forma tradicional, em banho maria; C) por <i>nanowarming</i> utilizando 8 mg NP/mL; D) por <i>nanowarming</i> utilizando 10 mg NP/mL; E) por <i>nanowarming</i> utilizando 12 mg NP/mL. Folículos morfolologicamente normais (seta branca) presentes no controle fresco e nos tratamentos. Folículos degenerados apresentando acentuada retração e descolamento do ovócito (seta preta) nos grupos Tradicional (Banho-Maria) e NW 12 mg NP/mL, e discreto descolamento do estroma (seta amarela) nos grupos NW 8 mg NP/mL e NW 10 mg NP/mL.....	28

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS .....	v
EPÍGRAFE .....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	x
SUMÁRIO.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	2
JUSTIFICATIVA .....	13
OBJETIVOS .....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS .....	21
DISCUSSÃO .....	29
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	35
REFERÊNCIAS .....	36

## INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido ovariano já provou ser uma alternativa para a preservação da fertilidade em mulheres com alto risco de perda da função ovariana quando não há tempo hábil para estimulação e posterior congelamento de oócitos maduros (MEDRANO et al., 2018; FISCH e ABIR, 2018). Ao contrário de embriões e oócitos, o tecido ovariano não requer indução hormonal para ser coletado, além de interferir minimamente no tratamento de pacientes com câncer. Usando essa abordagem os folículos primordiais que fazem parte da reserva ovariana são preservados (WALLACE et al., 2016; LEONEL et al., 2019).

Entre as técnicas de criopreservação podemos ter o congelamento lento e a vitrificação. No congelamento lento a temperatura é diminuída lentamente, obtendo-se taxas controladas. Na vitrificação, o processo é mais rápido e fácil, não necessitando de equipamentos caros e específicos. Com o auxílio de altas concentrações de crioprotetores é atingido um estado vítreo, que é menos nocivo para o tecido pois não há formação de cristais de gelo (FAHY e WOWK, 2015; SHI et al., 2017). Entretanto, na preservação de tecido ovariano esse método é pouco utilizado, já que ainda não há protocolos bem definidos.

O reaquecimento é uma etapa crítica do processo de vitrificação, pois nesse momento também pode ocorrer formação de cristais de gelo, além de outros danos (LIU et al., 2008; SILVA et al., 2018). Para isso, novas tecnologias de aquecimento estão sendo desenvolvidas, entre elas o aquecimento potencializado por nanopartículas metálicas, isto é, o *nanowarming* (NW). Esse método é capaz de aquecer amostras maiores por meio da produção de calor de maneira uniforme e rápida (ETHERIDGE et al., 2014; MANUCHEHRABADI et al., 2019; ITO et al., 2020; ABBASI et al., 2021). Assim, o *nanowarming* surge como uma alternativa para minimizar problemas relacionados aos danos por cristais de gelo, favorecendo a distribuição uniforme do calor, diminuindo o tempo de aquecimento (KASAVEN et al., 2022). O primeiro artigo utilizando *nanowarming* no reaquecimento de tecido ovariano vitrificado foi publicado em 2023 usando ovelhas como modelo (KARIMI et al., 2023). Neste trabalho, os autores demonstraram que, comparado à vitrificação com reaquecimento convencional, a estratégia de *nanowarming* melhorou o percentual de folículos pré-antrais viáveis e proporcionou o desenvolvimento de folículos antrais em cultivo in vitro (KARIMI et al., 2023).

Diante disso, esse trabalho avaliou o procedimento de *nanowarming* como uma alternativa de aquecimento do tecido ovariano bovino vitrificado.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Fertilidade e Aplicações Potenciais em Reprodução Assistida

A infertilidade é um problema global de saúde que afeta milhares de indivíduos, isso tem estimulado um aumento do número de casais a buscarem a reprodução assistida. O adiamento da maternidade representa uma considerável complexidade para a saúde reprodutiva, com impactos significativos na fertilidade. O declínio progressivo no número de folículos primordiais, especialmente após os 37 anos, resulta em uma acentuada redução na reserva ovariana (FISCH e ABIR, 2018). Não apenas a quantidade, mas também a qualidade dos oócitos é comprometida, potencialmente aumentando os riscos de aneuploidia (LOREN et al., 2013).

Além de fatores como idade, outros fatores como doenças e tratamentos médicos também contribuem para infertilidade por meio da redução da viabilidade folicular. No caso de pacientes com câncer, os efeitos da quimioterapia na função ovariana induzem temporariamente a amenorreia e a perda de um grande número de folículos. Os folículos primordiais remanescentes com o decorrer do tratamento também são perdidos resultando em infertilidade e até menopausa precoce (PETREK et al., 2006; MORGAN et al., 2012).

Nas últimas décadas, testemunhamos avanços notáveis na medicina reprodutiva, entre esses destacam-se as melhorias nas técnicas de congelamento de gametas femininos e masculinos, bem como no aprimoramento das técnicas de fertilização *in vitro* (FIV). Estes desenvolvimentos representam conquistas significativas, oferecendo novas possibilidades e esperança para indivíduos enfrentando desafios de fertilidade. A complexidade da produção de gametas e os fatores que podem influenciar esse processo exigem uma compreensão aprofundada da estrutura do ovário e da foliculogênese. A pesquisa biomédica se beneficia significativamente desse conhecimento, permitindo o desenvolvimento de terapias inovadoras no campo da medicina reprodutiva (MASSAROTTI et al., 2017).

Na atualidade, a aplicação clínica da criopreservação do tecido ovariano é reconhecida como uma abordagem efetiva para a preservação da fertilidade. Embora a criopreservação de óvulos seja uma opção, ela apresenta limitações, incluindo a restrição no número finito de oócitos armazenados e implicações no desenvolvimento embrionário. A utilização dessas ferramentas torna-se, portanto, imprescindível para proporcionar opções mais abrangentes e eficazes para as mulheres que buscam preservar sua capacidade reprodutiva diante dos desafios

do adiamento da maternidade ou tratamentos que levem à infertilidade precoce (WALLACE et al., 2016).

Ao contrário da criopreservação de óvulos, a criopreservação do tecido ovariano permite a preservação simultânea de centenas de folículos primordiais. Avanços em técnicas de criopreservação visam aumentar a sobrevivência do tecido, restaurar sua função endócrina e alcançar taxas notáveis de gravidez e nascidos vivos. A aplicação clínica desse procedimento já não é mais considerada experimental, tornando-se uma ferramenta crucial, especialmente no contexto da postergação da maternidade e terapias antitumorais (MEDRANO et al., 2018; FISCH e ABIR, 2018). A primeira gravidez com o uso da técnica foi relatada por Donnez et al. em 2004, e segundo informações há mais de 130 nascimentos no mundo decorrentes de transplante de tecido ovariano após criopreservação (DONNEZ et al., 2017). Jadoul et al. (2017) relataram que entre 1997 e 2013 a taxa de nascidos vivos foi de 31% entre mulheres que passaram por criopreservação de tecido ovariano seguido de autotransplante em um centro na Bélgica.

Em outras pesquisas como as direcionadas por Hoekman et al. (2020) a taxa de nascidos vivos foi de 57%, em pacientes que realizaram criopreservação seguido de autotransplante e 86% das pacientes com a função ovariana restaurada. Mais estudos descrevem 70% de mulheres com função ovariana restaurada, e 49 gravidezes documentadas no seguimento da pesquisa (IMBERT et al., 2014), e mais um estudo nos países nórdicos afirma que a criopreservação de tecido ovariano é benéfica e tem sucesso (RODRIGUEZ-WALLBERG, 2016). Um estudo publicado em 2015 obteve sucesso em preservar a fertilidade em pacientes com insuficiência ovariana primária, com o uso da vitrificação (SUZUKI et al., 2015).

É importante salientar que é um pouco difícil reunir informações a respeito de nascimentos ao redor do mundo devido à escala mundial, contato e sigilo de informações em alguns centros. Evidências demonstram que um maior número de folículos primordiais é preservado ao utilizarmos a vitrificação (SHI et al., 2018, MARWA et al., 2011). Porém, esta técnica ainda não é utilizada rotineiramente e mais investigações são necessárias.

## **2. Estrutura do Ovário e Foliculogênese**

A gônada feminina, o ovário, é responsável pela produção dos gametas, isto é, o oócito,

e hormônios sexuais. Sua estrutura é constituída pela camada externa, o córtex, e a interna, a medula. A região de interesse para o congelamento é o córtex, uma vez que esta é rica em folículos ovarianos, em que cada folículo contém um oócito. Inúmeros folículos em diversos estágios de desenvolvimento estão presentes no órgão, correspondendo a reserva das células germinativas femininas a serem utilizadas ao longo da vida (MAVRIDES e MORROLL, 2005; VAN DEN ABBEEL et al., 2007; COXIR et al., 2023).

Os ovários são localizados nos lados da cavidade pélvica superior, sendo sustentados pelo mesentério e por um ligamento. Esse é um dos órgãos mais vascularizados existentes, tendo a artéria ovárica como principal que se ramifica ao adentrá-lo. A estrutura do ovário é bastante similar entre os mamíferos, apenas o tamanho é que difere de maneira mais significativa (BAHR, 2013).

O ovário é constituído por uma medula interna, que contém vasos espalhados no tecido conjuntivo frouxo, e por um córtex externo, onde se localizam os folículos. A camada mais externa do córtex é constituída por um epitélio de superfície simples cuboidal, e a túnica albugínea, uma camada de tecido conjuntivo denso. O córtex do ovário é constituído por numerosos folículos de diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento, inseridos no estroma. O estroma é composto por três tipos principais de células: fibroblastos (atuam no suporte), células musculares lisas (contração dos vasos) e células intersticiais (inclui-se as células da teca e corpos lúteos regredidos) (COX et al., 2018; SHAH et al., 2018).

Um folículo é constituído por um oócito e por uma parede folicular circundante e outras estruturas que se desenvolvem a depender do seu estágio de desenvolvimento. Entre o oócito e a parede folicular uma fina membrana glicoproteica, a zona pelúcida, será depositada ao longo da foliculogênese. A parede folicular contém uma camada interna de granulosa e uma camada externa de teca. A camada granulosa envolve o oócito e está separada da camada da teca pela membrana basal, uma membrana acelular formada por glicoproteínas, as células da granulosa circundam o oócito, dando suporte e nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, e por sua vez, as células da teca, presentes em folículos mais desenvolvidos, desempenham um papel crucial na produção de hormônios ovarianos. Além disso, o fluido folicular, presente nos folículos antrais, preenche o espaço antral, contribuindo para o crescimento e maturação do oócito. O número e a função das células da granulosa mudam durante o crescimento folicular. Nos folículos maduros, a camada tecal pode ser dividida em externa e interna. A teca externa é



constituída por células musculares lisas dispostas de forma concêntrica e inervadas por nervos autônomos, a teca interna tem células intersticiais (BAHR, 2013; COX et al., 2018).

Ainda durante o desenvolvimento fetal a reserva de gametas é estabelecida, sendo composta de folículos primordiais, que consiste em um oócito imaturo envolto por células da granulosa, marcando o início da foliculogênese. A liberação do oócito maduro durante a ovulação representa o fim do processo chamado de foliculogênese (DUMPE et al., 2021; COX et al., 2018).

Chamamos de foliculogênese o processo que envolve a formação e desenvolvimento destes folículos. A foliculogênese começa sempre na parte mais interna do córtex, e os folículos primordiais consistem em oócitos primários rodeados por células pré-granulosas. Os folículos primordiais são a única fonte disponível de oócitos durante todo o período reprodutivo da fêmea. À medida que os folículos primordiais se desenvolvem em folículos primários, ocorrem alterações morfológicas. As células da granulosa aumentam em número e formato, se tornando cuboides, desenvolvem uma matriz extracelular (zona pelúcida), enquanto o diâmetro do ovócito também aumenta (MIHM et al., 2011, COXIR et al., 2023).

À medida que os folículos primários crescem, as células da granulosa dividem-se para que os folículos secundários tenham duas a seis camadas de células da granulosa de forma cuboidal (UYAR et al., 2013). Os folículos secundários também adquirem uma camada adicional de células, a teca, forma-se em torno da membrana basal (COX et al., 2018).

À medida que os folículos progridem de folículos secundários para folículos antrais, as células da granulosa secretam um fluido, que se acumula entre as células. O líquido folicular contém hormônios esteroides e proteínas, anticoagulantes, enzimas e eletrólitos e sua composição geral é semelhante ao plasma sanguíneo. O folículo preenchido de líquido folicular é o folículo terciário ou pré-ovulatório. Estes folículos têm uma camada granulosa mural (revestindo internamente a membrana basal) de quatro a seis camadas e a camada da teca é diferenciada em interna e externa. Os ovócitos dos folículos pré-ovulatórios estão suspensos no fluido folicular por um ramo de células da granulosa. Imediatamente ao redor do oócito há um fino anel de células da granulosa, a corona radiata, e este conjunto é denominado complexo cumulus-oócito. Neste estado, o folículo é chamado folículo de De Graaf e aparece como uma vesícula transparente que se projeta na superfície do ovário (UYAR et al., 2013, MONNIAUX et al., 2019, DOMPE et al., 2021).

Apesar de uma das funções do ovário ser a produção de ovócitos, a maioria destes nunca ovula, e seu número atinge o seu máximo logo após a formação dos ovários. Ao nascer, a fêmea tem todos os oócitos que terá na sua vida, e a grande maioria dos oócitos é eliminada antes da ovulação através de um processo chamado atresia (SHAH et al., 2018).

### **3. Criopreservação**

A criopreservação é o uso de baixíssimas temperaturas para preservar a estrutura das células e tecidos por um longo período de tempo (MAZUR, 1970). Esse processo pode ser de dois tipos: o congelamento lento e a vitrificação. A primeira resulta em formas dominantes de gelo intracelular devido ao tempo para água intracelular sair da célula, gerando dano mecânico nas organelas celulares, núcleo e outras estruturas. Enquanto a vitrificação envolve a solidificação do meio aquoso para uma fase vítrea de forma abrupta, sem a formação de cristais de gelo. As etapas predominantes nesse processo são a diluição dos crioprotetores nas células pré-resfriamento, resfriamento, armazenamento, aquecimento e remoção dos crioprotetores do material. Uma das etapas críticas nesse processo é o aquecimento, que deve ocorrer de maneira uniforme entre a amostra para que não haja dano ao material (SILVA et al., 2018). A diferença prevalente entre as duas técnicas é a concentração de crioprotetores e a taxa de resfriamento (SHI et al., 2017; AMINI, BENSON, 2023, ARAV, 2022).

Os compostos crioprotetores são aqueles que evitam a formação de cristais de gelo numa célula/tecido quando estes são submetidos a temperaturas criogênicas, isto é, quando estes são congelados. Além disso, promovem a transição para fase vítrea e ajudam a preservar a integridade da membrana plasmática. Como esses compostos são tóxicos para as amostras biológicas, há uma limitação da quantidade deles que podemos usar em um congelamento, principalmente quando a demanda por crioprotetor é maior, como por exemplo na vitrificação. Acredita-se que esses compostos químicos interferem nas ligações de hidrogênio das moléculas de água (BEST, 2015; WENG et al., 2018).

A concentração de crioprotetores requerida para a vitrificação é maior do que no congelamento lento. Esses agentes químicos podem eliminar o dano causado por cristais de gelo por promover a passagem direta para um estado vítreo quando usados em elevada concentração no processo de vitrificação. Temos dois tipos de crioprotetores, os penetrantes

que possuem baixa massa molecular e podem passar através da membrana celular, e os não penetrantes, que possuem elevada massa molecular e não atravessam a membrana plasmática das células. Os agentes penetrantes são: etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, glicerol etc. Os agentes não penetrantes são a trealose, sacarose, polietileno glicol, polivinil álcool etc. Os compostos mais utilizados para congelamento de tecido ovariano são o etileno glicol, dimetil sulfóxido, sacarose e o glicerol (WENG et al., 2018; LEONEL et al., 2019; AMINI, BENSON, 2023).

A criopreservação já foi aplicada em certos tipos de células, porém os fatores que levam a danos e os seus mecanismos na criopreservação de tecidos e órgãos maiores são mais complexos. Na criopreservação de tecidos e órgãos, é crucial não somente a sobrevivência de células pontuais, como também a preservação das interações célula a célula, o que torna mais desafiador a aplicação da criopreservação (CHEN et al., 2023).

#### **4. Congelamento Lento e Vitrificação**

O congelamento lento é o método mais comumente utilizado para tecido ovariano, pois é o método que foi mais estudado até o momento e apresenta bons resultados. Este método requer baixas concentrações de crioprotetores, porém necessita do uso de uma máquina de congelamento programável onerosa. Essa máquina diminui gradualmente a temperatura da amostra a uma taxa controlada antes de imergi-la em nitrogênio líquido (SHI et al., 2017; ARAV 2022). Como mencionado anteriormente, a formação de cristais de gelo durante o processo de resfriamento e aquecimento pode ser prejudicial à preservação dos tecidos. Mesmo com os melhores protocolos, é desafiador evitar a formação desses cristais no congelamento lento, o que pode resultar em danos às conexões intercelulares e aos vasos sanguíneos. No entanto, o congelamento lento muitas vezes atinge condições ótimas de criopreservação para vários tipos de células simultaneamente.

A vitrificação surge como uma alternativa mais rápida e economicamente viável, utilizando equipamentos simples e dispensando o uso de máquinas. Apesar de sua rapidez, a vitrificação demanda o emprego de compostos viscosos e altas concentrações de crioprotetores (FAHY, WOWK, 2015; LEONEL et al., 2019). Dados indicam que ela preserva a integridade da maioria dos folículos, sendo uma técnica segura, eficaz e em expansão. Esse método permite

a transição da água para um estado sólido não cristalino, ou seja, vítreo, ao evitar a formação de cristais de gelo. Para alcançar a vitrificação com sucesso, o resfriamento deve ser rápido para prevenir a formação desses cristais. Nesse processo, os crioprotetores desempenham um papel crucial na proteção das amostras (SHI et al., 2017; EL CURY-SILVA et al., 2021).

Durante a vitrificação, soluções contendo altas concentrações de crioprotetores e com alta viscosidade são utilizadas para proteger os tecidos e as células da desidratação e das variações de temperatura (CHEN et al., 2023; KAVASEN et al., 2022). Contudo, é conhecido que os crioprotetores podem ser tóxicos quando em grandes quantidades. Dado que a função dos tecidos depende das junções intercelulares, danos às estruturas celulares durante a criopreservação podem resultar na perda de funcionalidade desses tecidos. Encontrar um equilíbrio entre a toxicidade dos crioprotetores e sua capacidade de inibir a formação de cristais de gelo torna-se fundamental, especialmente na criopreservação de tecidos mais complexos, onde o processo de criopreservação é mais complexo devido às diferentes células e seus arranjos (GAO, CRISTER, 2000).

Para regular o crescimento dos cristais de gelo no congelamento lento, é necessário diminuir e aumentar a temperatura da amostra a uma velocidade constante, reduzindo assim o dano mecânico associado a esse tipo de congelamento. Da mesma forma, taxas de aquecimento muito altas são requeridas para evitar a desvitrificação e o crescimento de cristais de gelo no reaquecimento de amostras vitrificadas. Nas abordagens tradicionais de aquecimento, atingir essas taxas é desafiador (SHI et al., 2017).

Recentemente, a aplicação de tecnologias que envolvem nanopartículas magnéticas, induzindo o aquecimento, tem sido testada. Conhecida como *nanowarming*, essa tecnologia busca uniformizar o aquecimento das amostras utilizando nanopartículas magnéticas nos tecidos, seguida da aplicação de um campo magnético externo após a vitrificação. O *nanowarming* tem se mostrado viável na criopreservação de tecidos e órgãos, apresentando novas possibilidades na área. Entretanto, obstáculos como a toxicidade dos crioprotetores e a distribuição uniforme e eliminação das nanopartículas ainda são desafios a serem abordados e estudados (CHEN et al., 2023; GAO, CRISTER, 2000).

O primeiro artigo utilizando *nanowarming* de células germinativas femininas após a vitrificação foi publicado em dezembro de 2022 (TIAN et al., 2022). Neste trabalho, os autores utilizaram folículos ovarianos isolados e microencapsulados em agarose e demonstraram que,

comparado à vitrificação com reaquecimento convencional, a estratégia de *nanowarming* melhorou o percentual de folículos pré-antrais viáveis (em 33%) e proporcionou o desenvolvimento de folículos antrais em cultivo *in vitro*, a maturação dos seus ovócitos e nascimento de filhotes após fertilização *in vitro* e transferência de embriões em camundongos (TIAN et al., 2022).

Em tecido ovariano, os autores evidenciaram que comparado à vitrificação tradicional, a adição do método com *nanowarming* foi capaz de aprimorar a sobrevivência de folículos viáveis, acelerar o aquecimento, diminuir o estresse oxidativo causado pelo resfriamento e seu desenvolvimento *in vitro*, tendo o potencial de proteger o tecido das crioinjúrias (KARIMI, et al., 2023).

## 5. Nanotecnologia

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem gerado um grande número de pesquisas em diversas dimensões. O desenvolvimento de materiais na escala nanométrica pode ser alcançado a partir de diferentes métodos químicos e/ou físicos. Segundo a comissão europeia, um material é considerado um nanomaterial se “50% ou mais das suas partículas constituintes (por número) possui uma ou mais dimensões externas no tamanho de 1-100 nm” (AMSTAD et. al, 2011; RAUSCHER et al., 2013).

As estruturas nanométricas mais popularmente conhecidas são as nanopartículas. Nanopartículas podem ser sintetizadas de diferentes materiais e substâncias, e dentre elas as nanopartículas magnéticas são especialmente interessantes para várias aplicações biomédicas. As moléculas mais exploradas para a síntese de nanopartículas magnéticas são os óxidos de ferro, particularmente as magnetitas e maghemitas (GOLOVIN et al., 2021).

Os atributos físico-químicos como tamanho de partícula, formato, composição química e cristalina, área de superfície e carga presente na superfície afetam a sua absorção e dispersão, por isso em um sistema biológico é importante a funcionalização da superfície (LAURENT et al., 2011; DENNIS et. al, 2013; AKHTER et. al, 2021). Além disso, as nanopartículas são corpos estranhos ao organismo, e para aplicações biomédicas é importante torná-las biocompatíveis. Muitas tentativas de alterar a superfície das nanopartículas já foram realizadas para evitar sua reação no organismo (AKHTER et. al, 2021). Há estratégias de revestimento

delas utilizando moléculas orgânicas e muitos trabalhos demonstram os vários tipos de compostos que podem ser usados na superfície das nanopartículas. Podemos citar por exemplo proteínas, minerais como a sílica, e polímeros como o polietilenoglicol (PEG), saís entre outros. A funcionalização auxilia na estabilização e proteção do núcleo das nanopartículas (AMSTAD et. al, 2011, WU et. al 2008). No caso dos óxidos de ferro, a funcionalização deve preservar as propriedades magnéticas. Moléculas simples como citrato têm se mostrado bons revestimentos por serem estáveis por muito tempo e em uma grande variedade de meios. A estabilização utilizando essas moléculas já é bem estabelecida, sendo altamente citocompatível, contribuindo na fase cristalina da nanoestrutura (ARNDT et al., 2012; MUHLBERGER et al., 2019; ATREI et al., 2022).

### **5.1. Hipertermia mediada por Nanopartículas**

A nanociência com sua característica multidisciplinar, atraiu inúmeros pesquisadores das mais diversas áreas do conhecimento que contribuem para o seu avanço e aplicações. Uma dessas aplicações envolve a capacidade de nanopartículas metálicas de gerar calor a partir de uma fonte de energia eletromagnética, processo conhecido como hipertermia mediada por nanopartículas (DENNIS et al., 2013). Esta geração de calor mediada por nanopartículas apresenta vantagens como o aquecimento localizado apenas onde estão as nanopartículas e a possibilidade de gerar aquecimento homogêneo e controlado (ETHERIDGE et al., 2014).

Quando a energia externa utilizada é um campo magnético chamamos o procedimento de magnetohipertermia. A magnetohipertermia é o fenômeno de aumento da temperatura gerado por nanopartículas magnéticas na presença de um campo magnético alternado. Como dito anteriormente, os compostos mais considerados para o campo da magnetohipertermia são as magnetitas e maghemitas. Isso ocorre devido a suas propriedades magnéticas, especialmente quando se encontram em nanoescala. Esses compostos são ferromagnéticos, isto é, há duas populações de átomos com momentos magnéticos antiparalelos (LAURENT et al., 2011; PUCCI et al., 2022).

Devido a essa composição, quando um campo magnético externo é aplicado esses momentos magnéticos de cada nanopartícula são alinhados em direção ao campo, levando a uma mudança do momento magnético e causando alguns fenômenos que são de interesse para aplicação biomédica. Além do mais, na ausência deste campo, não há magnetização restante.

As nanopartículas superparamagnéticas são preferenciais para aplicações biomédicas, essa propriedade é atingida na nanoescala, em que quanto menor a nanopartícula menor a energia necessária para mudar o seu momento magnético (DENNIS et.al., 2013; LAURENT et al., 2011; PUCCI et al., 2022).

A aplicação de nanopartículas metálicas com o uso de campo magnético alternado em terapias oncológicas já é bem estudada (ANDREU et al., 2013; THIESEN, JORDAN, 2008; GOLOVIN et. al, 2021). Além disso, a hipertermia mediada por nanopartículas vem sendo estudada também como método contraceptivo em animais machos (JIVAGO et al., 2021; BRITO et al., 2020). Mais recentemente, a hipertermia mediada por nanopartículas também tem sido estudada como uma possibilidade de melhorar o processo de reaquecimento de células e tecidos que tenham sido vitrificados, método denominado *nanowarming*.

## 6. Nanowarming

Avanços notáveis têm sido observados na aplicação bem-sucedida do método *nanowarming* para o aquecimento de tecido ovariano congelado, possibilitando a recuperação das atividades metabólicas desses tecidos após o processo de criopreservação (SHARMA et al., 2021).

A técnica consiste em carregar amostras vitrificadas com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e expô-las a um campo magnético alternado para seu aquecimento. Ela se opõe ao aquecimento tradicional que normalmente se usa, isto é o banho maria, onde a transferência de calor é passiva por convecção (ETHERIDGE et al., 2014). Nesta o calor se espalha rapidamente tanto dentro quanto por fora da amostra, ao invés de ser só na superfície, trazendo uniformidade no aquecimento e evitando a cristalização. O campo magnético gera uma resposta oscilatória nas nanopartículas a cada vez que o campo magnético alterna, e a energia absorvida é liberada na forma de calor pelas nanopartículas (GOLOVIN et al., 2021; MANUCHEHRABADI et al., 2019).

Outros estudos demonstram que o *nanowarming* (NW) pode reaquecer órgãos vitrificados de modelos animais com sucesso, como coração, rim e ovário (HAN et al., 2023; SHARMA et al., 2023). Bischof (2015) relata que o *nanowarming* evita a formação de cristais de gelo no reaquecimento de amostras vitrificadas. O único estudo utilizando *nanowarming* em

tecido ovariano, conduzido por Karimi et al. (2023), demonstrou melhora da sobrevivência de folículos em tecido ovariano ovino vitrificado. Neste, os pesquisadores utilizaram nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com PEG e uma bobina geradora do campo magnético. Os resultados foram promissores indicando integridade do tecido estromal, crescimento folicular *in vitro* e baixos níveis de estresse oxidativo.

A criopreservação de tecidos emerge como um desafio multifacetado que demanda uma abordagem interdisciplinar, bem como a adoção de tecnologias avançadas, incluindo o *nanowarming*, para superar as barreiras existentes. A aplicação conjunta dessa tecnologia com a vitrificação tem revelado sua eficácia na preservação da integridade estrutural de amostras em menor escala, apontando para uma direção promissora no panorama da criopreservação (CHEN et al., 2023).

A análise de estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ressalta os potenciais efeitos decorrentes das elevadas temperaturas atingidas no interior da célula durante o processo de aquecimento. Esses efeitos abrangem desde o desdobramento de proteínas até danos nucleares e permeabilização da membrana plasmática, além de fenômenos de aquecimento confinado que induzem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas considerações sublinham a importância de uma abordagem cautelosa e controlada na implementação de técnicas de aquecimento, como o *nanowarming*, a fim de garantir a preservação bem-sucedida da viabilidade e funcionalidade das amostras criopreservadas (SHI et al., 2017, SHARMA et al., 2021).



## JUSTIFICATIVA

A criopreservação do tecido ovariano e conseguinte o seu transplante se apresenta como uma esperança para mulheres desde crianças a adultas que passaram por tratamentos que de alguma forma reduzem sua capacidade reprodutiva, pois esse é capaz de restaurar as funções ovarianas mesmo após essa perda. Dentre os motivos para a busca dessa alternativa de preservação da fertilidade estão: 1) pacientes com câncer que irão passar pela quimioterapia e/ou radioterapia, pois esses tratamentos afetam negativamente a função ovariana, 2) ocorrência de menopausa precoce e outras doenças que ameaçam a fertilidade, 3) o desejo de adiar a maternidade, e 4) a possibilidade de adiar ou debelar os efeitos da menopausa (LOREN et al., 2013; FISCH e ABIR, 2018; HINKLE et al., 2021).

Dentre as técnicas de criopreservação estão o congelamento lento e a vitrificação. Ambos os métodos levam a perdas consideráveis de folículos e oócitos, pois podem levar a sua degeneração (LIU et al., 2008; SILVA et al., 2018). Apesar disso muitos estudos demonstram que a criopreservação do tecido ovariano por essas técnicas traz muitos benefícios sendo eles principalmente na restauração da função reprodutiva (SILBER et al., 2008; WALLACE et al., 2016; DONNEZ e DOLMANS, 2017; MEDRANO et al., 2018). A vitrificação de tecido ovariano ainda é pouco utilizada, mas tem sido muito investigada recentemente devido às vantagens de praticidade que apresenta. No entanto, a formação de cristais de gelo no aquecimento é um fator importante a se pensar, e admite-se que uma maior velocidade no aumento da temperatura seja mais efetiva para evitar a recristalização.

Pesquisas recentes demonstram um novo método de aquecimento de maneira rápida e uniforme com a utilização de nanopartículas na produção de calor (ETHERIDGE et al., 2014; MANUCHEHRABADI et al., 2019; ABBASI et al., 2021). Esse método usa nanopartículas metálicas que possuem a habilidade de converter radiofrequência em calor, até mesmo em amostras maiores (ETHERIDGE et al., 2014; BISCHOF, 2015; MANUCHEHRABADI et al., 2019). Entretanto, até o presente momento há apenas um estudo realizado com tecido ovariano, sendo este ovino (KARIMI et al., 2023).

O uso de outros animais como modelo experimental para humanos contribui no aperfeiçoamento das técnicas de reprodução assistida, uma vez que material humano normalmente não é acessível para os pesquisadores por motivos éticos. O tecido ovariano bovino é considerado um bom modelo para o ovário humano por guardar semelhanças quanto à morfologia e fisiologia (FAHEEM et. al, 2011) e ser de disponibilidade abundante.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral:**

Comparar o aquecimento convencional com o método de *nanowarming* para o reaquecimento de tecido ovariano bovino vitrificado.

### **Objetivos Específicos:**

1. Estabelecer a velocidade de aquecimento de uma solução contendo diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas quando submetidas a um campo magnético alternado;
2. Testar diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas para a realização da técnica de *nanowarming* de tecido ovariano bovino;
3. Estabelecer a velocidade de aquecimento de amostras de tecido ovariano vitrificado utilizando o *nanowarming* com diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas e comparar com a velocidade de aquecimento convencional;
4. Avaliar a preservação dos folículos ovarianos pré-antrais bovinos após vitrificação seguida de reaquecimento convencional ou *nanowarming* com as três melhores concentrações de nanopartículas magnéticas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Ovários**

Ovários de vaca foram obtidos juntamente com pesquisadores da EMBRAPA-CENARGEN, provenientes de abatedouro local. Por se tratar de material caracterizado como sobra de atividade de frigorífico, não há necessidade de aprovação na Comissão de Ética de Uso Animal (Resolução Normativa CONCEA No. 55 de 05 de outubro de 2022).

O tecido ovariano foi separado de ligamentos e tecido adiposo adjacente e lavado com solução salina. Primeiro os ovários foram cortados ao meio e então a região medular foi removida com um bisturi e descartada. Do córtex ovariano foram cortados fragmentos medindo 1 x 1 x 1 mm, os quais foram destinados aos grupos experimentais.

### **Nanopartículas e Magnetohipertermia**

As nanopartículas utilizadas foram sintetizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (UFG). As nanopartículas são compostas de uma ferrita de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) funcionalizada com citrato, com diâmetro aproximado de 10nm na forma de um fluido magnético na concentração de 100 mg NP/mL.

Para gerar o campo magnético foi utilizado um equipamento MagneTherm™ (NanoTherics, United Kingdom – Figura 1), com bobina com 17 espirais, Capacitor do tipo B22 e Campo nominal da bobina máximo de 17 mT, utilizado nas seguintes especificações: Frequência nominal de 330 kHz; Fonte geradora com Voltagem de 32 V e Corrente de 7,8 A; Voltagem máxima pico-a-pico de 2500 Vp-p; Osciloscópio de 50 mV.

A



B

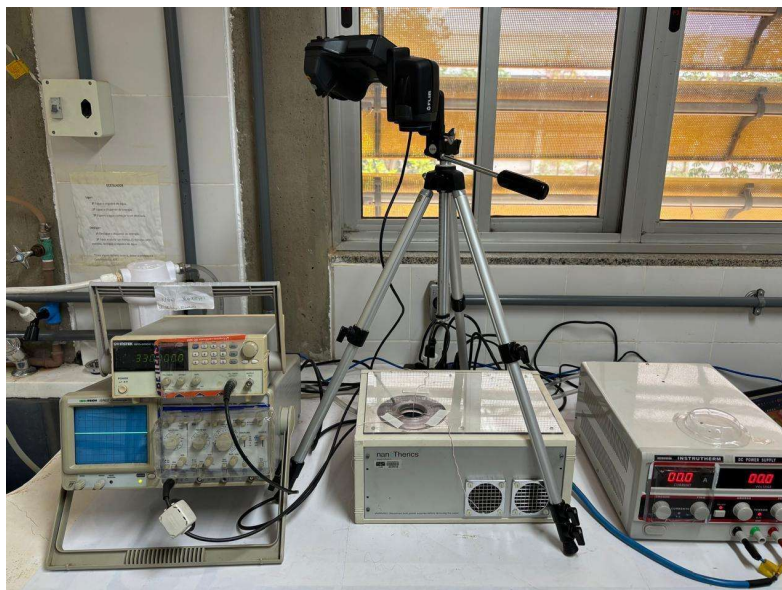


Figura 1. A) Equipamento Magnetherm. Fonte: Nanotherics, 2024. B) Equipamento Magnetherm utilizado no experimento, com câmera térmica FLIR T-460 posicionada para aferição da temperatura. Fonte: Arquivo pessoal.

### Teste de aquecimento da solução contendo nanopartículas por magnetohipertermia

Inicialmente foram realizados testes de aquecimento das nanopartículas em diferentes concentrações, sempre diluídas em 1 mL de meio de aquecimento, a saber: 4 mg NP/mL, 6 mg NP/mL, 8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL. O volume de 1 mL da solução era colocado em um Becker de 10 mL centralizado na bobina geradora de campo magnético do equipamento Magnetherm, o qual era ligado a voltagem fixa em 31 V. A temperatura foi monitorada por uma câmara termográfica (FLIR T-460; Teledyne FLIR, Wilsonville,

Oregon, USA) por um período de 5 minutos ou até atingir 50 °C. Este teste foi repetido 3 vezes para cada concentração, obtendo-se uma curva de aquecimento média para cada uma.

Em seguida, foi feito um experimento para definir a(s) alteração(ões) de voltagem necessária(s) para manter a solução contendo nanopartículas em um platô a 37-38 °C por um período de até 6 minutos. Este experimento foi repetido 3 vezes para cada concentração de nanopartículas utilizada.

### **Vitrificação do tecido ovariano**

Para a vitrificação foi utilizado como base o método descrito por Kagawa et al. (2009). Os fragmentos de tecido foram equilibrados inicialmente em MEM (meio essencial mínimo) + 20% soro fetal bovino (SFB) com 7,5% DMSO (dimetil sulfóxido) e 7,5% EG (etileno glicol) por 20 min, e em seguida em MEM (meio essencial mínimo) + 20% soro fetal bovino (SFB) com 15% DMSO e 15% EG + 0,5 M de sacarose por 15 min. A seguir, as amostras de tecido foram submersas diretamente em nitrogênio líquido e depois colocadas em criotubos vazios previamente resfriados com auxílio de uma pinça também resfriada.

### **Reaquecimento tradicional do tecido ovariano**

Para o reaquecimento tradicional foi utilizado o método descrito por Kagawa et al. 2009, as amostras de tecido foram retiradas do criotubo com auxílio de uma pinça resfriada e imediatamente imersas em MEM a 37 °C, contendo 1M sacarose por 1 minuto, em banho-maria a 37 °C. Para a remoção dos crioprotetores após o completo descongelamento, as amostras foram transferidas para MEM com 0,5 M sacarose por 5 min e depois lavados em MEM duas vezes por 10 min.

### **Nanowarming do tecido ovariano**

Para os grupos com reaquecimento com *nanowarming*, o meio MEM com 1M de sacarose foi acrescido de nanopartículas (utilizando 3 diferentes concentrações definidas no teste de aquecimento). Este reaquecimento foi realizado no equipamento Magnetherm. Um

pequeno Becker (10 mL) foi posicionado no centro da bobina geradora de campo magnético, já contendo a solução de reaquecimento a qual era aquecida e estabilizada em 37 °C, mantendo a voltagem determinada na estabilização do platô de temperatura. O tecido ovariano vitrificado foi então retirado do nitrogênio líquido e imediatamente inserido no Becker com a solução de reaquecimento. A temperatura da solução e da amostra de tecido ovariano durante o reaquecimento foi monitorada pela câmera termográfica (FLIR T-460), e a voltagem foi controlada manualmente de forma a não permitir o aquecimento acima da temperatura de 38 °C.

As voltagens utilizadas para cada uma das 3 concentrações de nanopartículas foram as seguintes: 1) para aquecer o meio a potência sempre foi a máxima, de 31V, até que a temperatura de 37°C fosse atingida; 2) para manter o meio à temperatura de 37°C a voltagem era diminuída para 13V (8mg NP/mL), 14V (10mg NP/mL) e 15V (12mg NP/mL); 3) no momento da inserção do fragmento de tecido vitrificado, a voltagem era aumentada para 25V, independente da concentração de NP utilizada, até que as amostras atingissem 37°C; 4) então a voltagem era reduzida para as especificadas para manter temperatura de 37°C para cada concentração (8mg NP/mL – 13V, 10mg NP/mL – 14V e 12mg NP/mL – 15V).

Após 1 minuto a 37 °C, a remoção dos crioprotetores (e nanopartículas) foi feita conforme descrito para o procedimento tradicional.

## **Delineamento Experimental**

Fragmentos de córtex ovariano medindo 1 x 1 x 1 mm foram utilizados para o experimento e destinados aleatoriamente a um dos grupos experimentais.

Foram definidos 5 grupos experimentais (Figura 2), a saber: 1) Controle Fresco (Tecido ovariano fresco, fixado imediatamente) 2) V-T (vitrificação com reaquecimento tradicional), 3 a 5) V-NW (vitrificação seguida de *nanowarming*) utilizando as 3 concentrações de nanopartículas magnéticas que fornecerem as melhores velocidades de aquecimento no teste de aquecimento. O experimento foi repetido cinco vezes.

Após os procedimentos previstos para cada grupo experimental o tecido ovariano foi fixado em formalina 10% tamponada e destinado para análise histológica.

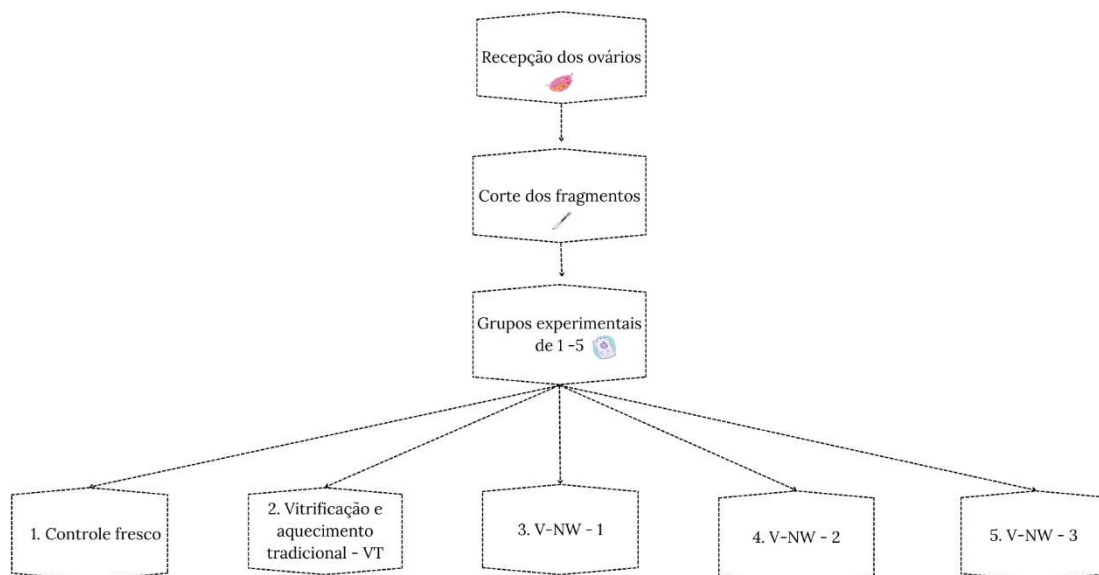


Figura 2: Desenho esquemático do delineamento experimental. Fonte: Elaboração própria.

### **Análise Histológica tecidual e morfologia folicular**

Para avaliar a morfologia folicular, os fragmentos dos tecidos ovarianos foram processados para histologia tradicional, seguindo o procedimento descrito a seguir: inicialmente, os fragmentos foram fixados em formalina 10% tamponada, sendo então submetidos a uma desidratação progressiva com álcool nas concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%.

Após a desidratação, os fragmentos ovarianos passaram por um processo de clarificação e diafanização em xilol. Seguindo essas etapas, os fragmentos foram imersos em parafina líquida, sendo mantidos a temperaturas de aproximadamente 55°C a 65°C. Após esse procedimento, os tecidos foram emblocados em parafina para a realização dos cortes histológicos em micrótomo, com seções de 5µm de espessura, realizadas em série e 1 a cada 5 cortes montado em lâminas de vidro. As lâminas foram submetidas à coloração com hematoxilina/eosina (HE) e analisadas sob microscópio de luz, com aumento de 40 vezes.

Foram avaliados o aspecto geral do tecido, bem como foram contados os folículos ovarianos pré-antrais presentes, os quais foram classificados de acordo com suas fases de desenvolvimento (primordiais, primários e secundários), e como morfologicamente normais

ou degenerados. Somente foram contados os folículos cujo núcleo do ovócito estava visível.

Os folículos morfolologicamente normais são aqueles que possuem o ovócito com núcleo esférico, com cromatina frouxa e delimitado por membrana nuclear íntegra, circundado por células da granulosa de formato adequado ao estágio de desenvolvimento folicular, justapostas, sem destacamento entre elas e sem núcleo picnótico, membrana basal íntegra e sem destacamento do estroma adjacente. Os folículos que apresentavam ovócito retraído, com núcleo picnótico ou vacúolos no citoplasma, células da granulosa desorganizadas ou destacadas do ovócito, ou folículo descolado do estroma ovariano foram considerados degenerados.

### **Análise Estatística**

Todos os dados foram submetidos a estatística descritiva e apresentados como média e desvio padrão ou erro padrão da média. As variações de temperatura e tempo foram analisadas por ANOVA e teste de Dunnett. Os percentuais de folículos normais, primários e em crescimento foram inicialmente convertidos para valores decimais, a fim de adequá-los à análise estatística. Em seguida, aplicou-se a transformação arcoseno ( $\arcsin$ ) sobre esses valores para normalizar a distribuição dos dados. Com os dados transformados, realizou-se uma análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) para avaliar os efeitos das variáveis investigadas. Posteriormente, empregou-se o teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .



## RESULTADOS

Os testes de aquecimento das nanopartículas foram realizados nas concentrações de 4 mg NP/mL, 6 mg NP/mL, 8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL, sempre diluídas em 1 mL de meio de aquecimento, o que resultou em uma curva de aquecimento para cada uma das concentrações (Figura 3). A solução contendo 4 mg NP/mL não atingiu 37°C em 5 minutos. A solução contendo 6 mg NP/mL, apesar de ter atingido 37°C em até 5 minutos, não demonstrou ter estabilidade e nem possuir uma boa velocidade de aquecimento da solução. A partir da concentração de 8 mg NP/mL vemos que a temperatura sobe de maneira mais uniforme e consegue atingir 37°C em menos de 2 minutos, e a temperatura continua aumentando após este período. Para uma concentração de 10 mg NP/mL, observou-se que a solução atingiu a temperatura desejada de forma mais rápida, em aproximadamente 1 minuto, sugerindo maior eficiência no processo. Ao elevar a concentração para 12 mg NP/mL, verificou-se um incremento significativo na velocidade de aquecimento, evidenciando que, à medida que a concentração de nanopartículas aumenta, a velocidade de aquecimento também aumenta (Figura 3). Esses resultados indicaram que as melhores concentrações a serem utilizadas no reaquecimento do tecido ovariano são 8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL. A Figura 4 mostra a aparência das soluções de nanopartículas nestas concentrações.

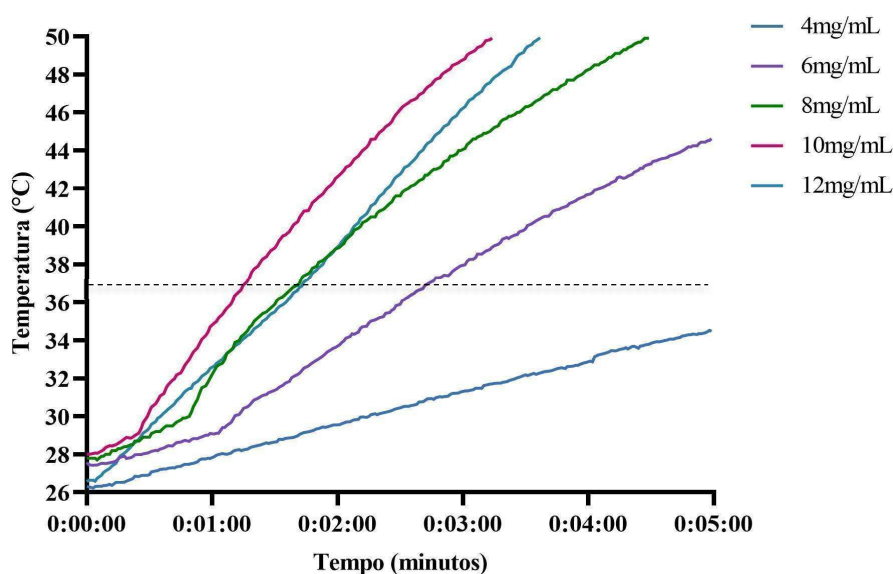


Figura 3: Curvas de aquecimento da solução contendo nanopartículas em diferentes concentrações. A linha tracejada indica a temperatura de 37°C. Fonte: elaboração própria.



Figura 4: Soluções de aquecimento contendo diferentes concentrações da Nanopartícula.  
Fonte: elaboração própria.

A partir desses dados foram feitos testes de reaquecimento de 5 fragmentos de tecido ovariano vitrificado para cada uma das concentrações de 8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL para o *nanowarming*, e também para o aquecimento tradicional em banho maria (BM). Nesta etapa, avaliamos a capacidade da solução de manter sua temperatura na faixa dos 37-38°C mesmo com a inserção do fragmento de tecido ovariano que estava vitrificado, isto é, a cerca de -196°C, assim como a taxa de aquecimento ( $\Delta T$  - °C/segundo) para cada um dos grupos.

Os resultados demonstraram que as concentrações selecionadas foram capazes de manter-se na faixa de temperatura desejada, desde que a intensidade do campo magnético fosse regulada por meio da corrente elétrica. Um gráfico ilustrativo do desempenho de cada uma das soluções com diferentes concentrações de NP e do aquecimento em BM, no descongelamento do tecido ovariano vitrificado, pode ser observado na Figura 5.

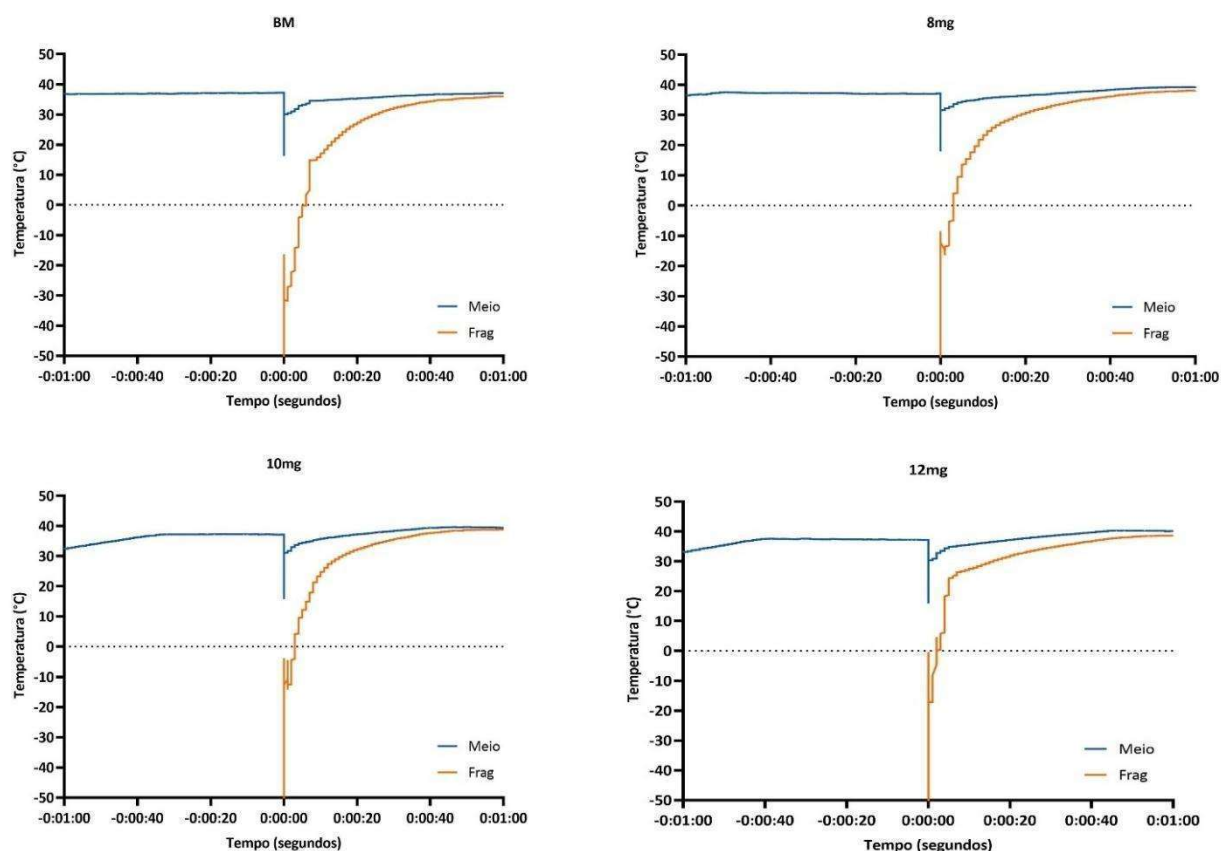


Figura 5: Curvas de aquecimento de fragmento de tecido ovariano vitrificado durante o reaquecimento utilizando *nanowarming* com solução de aquecimento contendo diferentes concentrações da nanopartícula (8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL) ou no aquecimento tradicional (BM – Banho-maria). Fonte: elaboração própria.

Os grupos que atingiram a temperatura desejada mais rapidamente foram os de 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL. Em contraste, o grupo BM (banho-maria ou aquecimento tradicional) foi o mais lento. Observamos que dentro da faixa de aquecimento houve uma oscilação de temperatura durante o reaquecimento do fragmento, que ocorreu principalmente no grupo BM, e no grupo *nanowarming* com concentração de 8mg NP/mL. O grupo que mostrou uma constância maior no padrão de temperatura, assim como o menor tempo foi o de concentração de 10mg. Quando analisamos a curva de aquecimento no momento da entrada do fragmento congelado no meio, por um intervalo de tempo muito curto de até 30 segundos, é possível observar essa oscilação de temperatura (Figura 6).

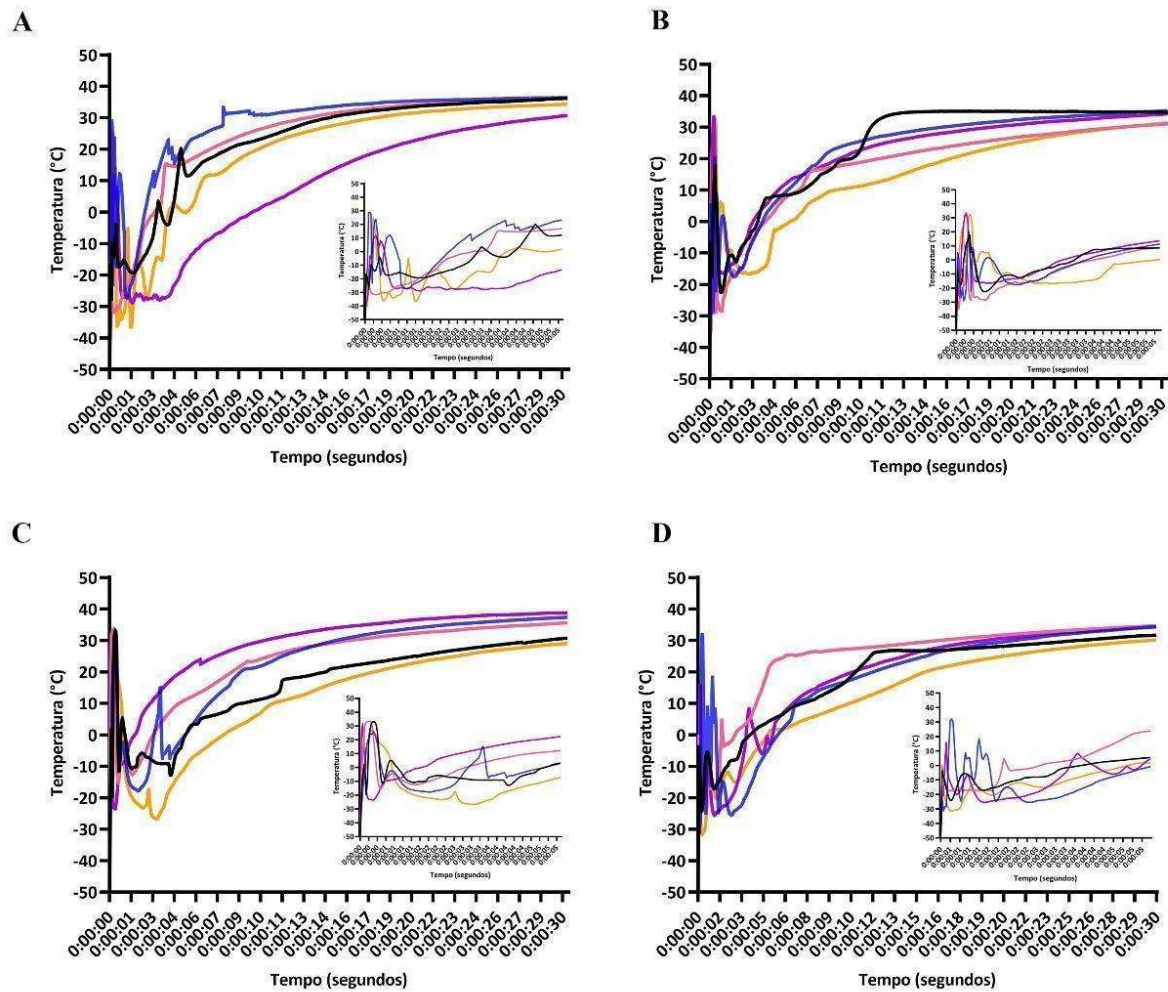


Figura 6: Curvas de aquecimento de fragmentos de tecido ovariano vitrificados (N=5, cada linha no gráfico representa um fragmento) nos 30 primeiros segundos do reaquecimento (inserts mostram os 5 primeiros segundos em detalhe) utilizando o banho maria – BM (A), e o *nanowarming* com as soluções de aquecimento contendo diferentes concentrações da nanopartícula - 8 mg NP/mL (B), 10 mg NP/mL (C) e 12 mg NP/mL (D). Fonte: elaboração própria.

Os fragmentos aquecidos pelo método tradicional de banho maria, apresentaram uma oscilação de temperatura grande, entre -30°C e 30°C, criando um padrão de aquecimento bastante heterogêneo (Figura 6A). Esta oscilação de temperatura também foi observada nos fragmentos aquecidos na solução de 12mg NP/mL (Figura 6D). O padrão de aquecimento nas soluções de concentração de 8mg NP/mL e 10mg NP/mL foi similar, mais homogêneo e constante, e a oscilação de temperatura foi menor nos fragmentos avaliados (Figuras 6B e 6C).

Quando avaliamos a taxa de aquecimento ( $\Delta T$ ) média do momento da inserção do fragmento vitrificado até atingir a temperatura de 37°C do método tradicional de banho-maria

e das soluções contendo diferentes concentrações de nanopartículas (8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL), obtivemos um valor médio ( $\pm$ EPM) de  $\Delta T$  de  $2,7 \pm 0,8$  °C/segundo para o grupo BM,  $4,1 \pm 0,8$  °C/segundo para o grupo 8mg NP/mL,  $5,6 \pm 0,8$  °C/segundo para o grupo 10mg NP/mL e  $5,1 \pm 0,4$  °C/segundo para o grupo 12mg NP/mL. Foi possível determinar um  $\Delta T$  menor para o grupo BM, o grupo 8mg NP/mL mostrou um aumento no  $\Delta T$ , mas ainda mais baixo que as demais concentrações de 10mg NP/mL e 12mg NP/mL. Diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) foi observada entre o grupo BM e o grupo NW com 10mg NP/mL.

Avaliamos também o tempo que cada grupo levou ( $\Delta t$ ) para que o fragmento vitrificado atingisse 37°C. Os grupos BM e 8mg NP/mL apresentaram tempo médio similar, de  $1,8 \pm 0,3$  min para o grupo BM e  $1,3 \pm 0,5$  min para o grupo de 8mg NP/mL. Já no grupo de 10mg NP/mL o tempo médio foi de  $0,8 \pm 0,1$  min, e no de 12mg NP/mL de  $0,8 \pm 0,1$  min. Foi observada uma tendência a diferença significativa entre o grupo BM e os grupos NW com 10mg NP/mL ( $P=0,0661$ ) e 12mg NP/mL ( $P=0,0766$ ).

Levando isso em conta, a solução de 10 mg NP/mL destacou-se como a mais eficiente em termos de taxa de aquecimento, embora com maior variabilidade, a solução de 12 mg NP/mL não apresentou ganho significativo em relação à de 10 mg NP/mL, sugerindo um possível limite de eficiência com o aumento da concentração. O banho-maria foi o método mais lento e menos consistente, reforçando a vantagem do *nanowarming* para aquecimento rápido e controlado. A solução de 8 mg NP/mL mostrou-se estável, porém com taxa de aquecimento inferior às demais concentrações de NP. Esses dados indicam que a concentração de nanopartículas influencia diretamente a eficiência do aquecimento, mas é necessário balancear a concentração com a consistência dos resultados para otimizar o processo.

Avaliamos também o  $\Delta t$  do meio no banho maria e nos meios com nanopartículas em cada uma das concentrações, 8mg NP/mL, 10mg NP/mL e 12mg NP/mL, depois de estarem já estáveis em 37° após a entrada do fragmento congelado, para seu descongelamento. O grupo BM teve uma média de tempo de  $47 \pm 6,8$  segundos para atingir 37°C, já o grupo de 8mg NP/mL demorou  $34 \pm 6,6$  segundos, os grupos de 10mg NP/mL e 12mg NP/mL foram muito próximos sendo estes de  $23 \pm 5,0$  e  $22 \pm 2,8$  segundos respectivamente. Houve diferença estatística entre o grupo BM e os grupos de NW com 10 e 12mg NP/mL ( $P < 0,05$ ). O  $\Delta T$  do BM e do grupo de 8 mg NP/mL foi o mesmo ( $0,5 \pm 0,1$  °C/segundo e  $0,6 \pm 0,1$  °C/segundo). O grupo de 10mg NP/mL apresentou um  $\Delta T$  de  $1,0 \pm 0,2$  °C/segundo e o de 12mg NP/mL  $0,7 \pm 0,2$  °C/segundo. Não houve

diferença estatística entre os grupos ( $P>0,05$ ).

Na análise histológica dos fragmentos de tecido ovariano, foram identificados e classificados um total de 1.924 folículos ovarianos nas lâminas analisadas. Agrupamos os estágios de desenvolvimento em folículos primordiais e em crescimento, este segundo sendo composto por folículos primários e secundários. A Figura 7 resume os dados de integridade folicular por grupo experimental.

Considerando as fases de desenvolvimento folicular e aspectos de integridade morfológica vimos que as amostras aquecidas por *nanowarming* com 10 mg NP/ml diferiram estatisticamente ( $p<0,05$ ) dos demais tratamentos do *nanowarming* e banho maria, sendo o percentual de folículos normais, tanto primordiais quanto em crescimento, semelhantes ao do grupo controle (Figura 7). O grupo aquecido em banho maria foi estatisticamente semelhante ( $p>0,05$ ) ao grupo *nanowarming* com 8 mg NP/ml e significativamente inferior aos demais grupos ( $p<0,05$ ).

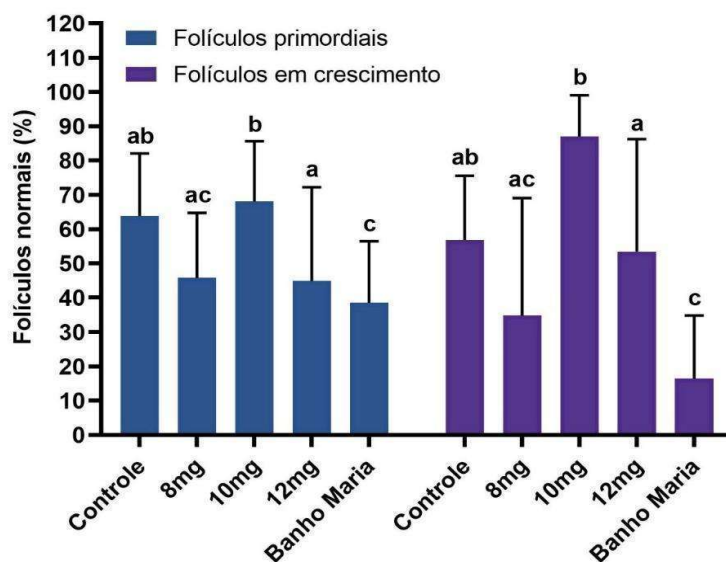


Figura 7: Proporção (média  $\pm$  DP) de folículos primordiais e em crescimento morfolologicamente normais nos diferentes tratamentos. Fonte: elaboração própria.

No geral, o dano mais expressivo em todos os grupos avaliados foi o de retração folicular, indicando um padrão comum de dano estrutural associado ao processo de criopreservação. Na Tabela 1, estão listadas as três principais injúrias identificadas nas amostras

de tecido ovariano, evidenciando os efeitos morfológicos recorrentes entre os diferentes tratamentos.

Tabela 1. Porcentagem das principais injúrias encontradas nas amostras de fragmento de tecido ovariano bovino fresco (Controle) e vitrificado e reaquecido pelos diferentes tratamentos – Nanowarming (NW) com diferentes concentrações de nanopartículas (NP) na solução de aquecimento e tradicional (Banho-Maria).

	Controle	NW 8 mg NP/mL	NW 10 mg NP/mL	NW 12 mg NP/mL	Banho Maria
Retração folicular	11,4%	14,8%	11,4%	14,4%	23,4%
Descolamento do estroma	4,5%	10,6%	4,1%	5,7%	2,6%
Descolamento do ovócito	2,4%	0,8%	-	-	2,4%
Núcleo picnótico	-	-	1,4%	0,4%	-

A Figura 8 ilustra a morfologia típica do tecido ovariano, com os diferentes tipos de folículos analisados bem como o tecido estromal circundante, no tecido fresco (Controle) e nos diferentes grupos de reaquecimento testados.



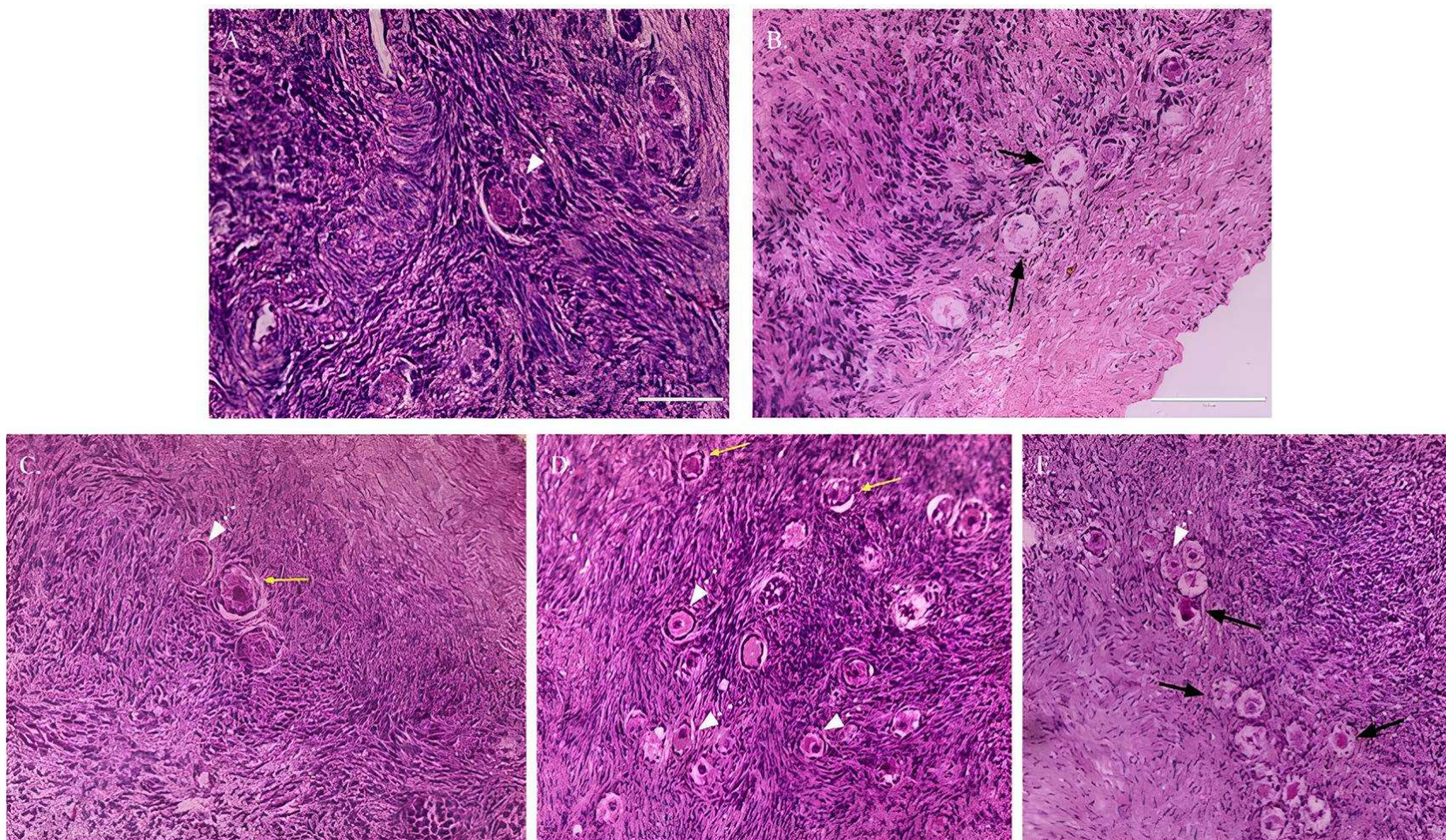


Figura 8. Fotomicrografias de fragmentos de tecido ovariano bovino. A) Tecido fresco (Grupo Controle); Tecido vitrificado e aquecido B) da forma tradicional, em banho maria; C) por *nanowarming* utilizando 8 mg NP/mL; D) por *nanowarming* utilizando 10 mg NP/mL; E) por *nanowarming* utilizando 12 mg NP/mL. Folículos morfologicamente normais (seta branca) presentes no controle fresco e nos tratamentos. Folículos degenerados apresentando acentuada retração e descolamento do ovócito (seta preta) nos grupos Tradicional (Banho-Maria) e NW 12 mg NP/mL, e discreto descolamento do estroma (seta amarela) nos grupos NW 8 mg NP/mL e NW 10 mg NP/mL.



## DISCUSSÃO

A criopreservação de tecido ovariano tem se destacado como uma abordagem promissora para a preservação da fertilidade e restauração da função endócrina em mulheres (DONNEZ e DOLMANS, 2017). Os tecidos são estruturas constituídas por vários tipos de células e matriz extracelular, organizadas de forma específica para exercer uma função fisiológica. A criopreservação de tecidos, assim como a de órgãos, representa um desafio em comparação à preservação de células isoladas, pois exige a combinação harmônica de diversos fatores físico-químicos para evitar danos estruturais e funcionais (MAZUR, 1970; CHEN et al., 2023). O presente estudo avaliou o uso da tecnologia do *nanowarming* no reaquecimento de tecido ovariano bovino vitrificado, com o objetivo de testar a eficácia dessa abordagem na proteção das estruturas ovarianas.

O uso de hipertermia mediada por nanopartículas tem sido amplamente estudada em situações oncológicas e no aquecimento de órgãos para melhoria das condições de transporte para transplante, sendo capaz de gerar um aquecimento homogêneo e controlado (ETHERIDGE et al., 2014; GOLOVIN et al., 2021; PUCCI et al., 2022). Neste trabalho, as soluções contendo nanopartículas de ferrita de manganês em diferentes concentrações primeiro foram testadas para avaliar seus potenciais e curvas de aquecimento em temperaturas entre 36 e 38 °C em até 5 minutos. Vimos que as soluções contendo 4 e 6 mg NP/mL não apresentaram resultados satisfatórios, apresentando lentidão e instabilidade no aquecimento. Isso pode indicar que a concentração de NP não foi suficiente dentro da solução para que os resultados pretendidos fossem obtidos. Narayanaswamy et al. (2022), afirmam que a concentração das NP afeta a eficiência da conversão de energia magnética em calor, assim como o campo magnético e sua frequência. Isso pode ocorrer devido a interações dipolares que contribuem para o aumento da anisotropia magnética nos sistemas de nanopartículas. Com o aumento da concentração de NP as distâncias médias entre as partículas diminuem, resultando em interações mais intensas e, portanto, produção de mais calor mais rápido (DENNIS et al., 2008; DENNIS et al., 2013; GARCÍA-ACEVEDO et al., 2022). Como o único fator alterado nas soluções testadas foi a concentração das nanopartículas, uma possível explicação poderia ser essa. Nas concentrações de 8, 10 e 12 mg NP/mL vemos que a temperatura sobe de maneira mais uniforme e acelerada conseguindo atingir 37°C em menos de 2 minutos, e a temperatura continua aumentando após este período. Esse comportamento pode reforçar a correlação entre a concentração de nanopartículas e a eficiência térmica do sistema (DENNIS et al., 2013, ANDREU et al., 2013).

Os grupos que demonstraram ser os mais promissores para seguir com os experimentos com as amostras de tecido ovariano foram 8 mg NP/mL, 10 mg NP/mL e 12 mg NP/mL, dentre os quais o 10 e 12 atingiram mais rápido a temperatura desejada. Este resultado era esperado, pois quanto maior a concentração de nanopartículas maior a geração de calor, até atingirmos o limite de eficiência (AMSTAD et al., 2011; LAURENT et al., 2011).

No entanto, a resposta térmica nas amostras pode ser influenciada por outras variáveis, além da concentração das nanopartículas, como a sua distribuição na matriz tecidual, a exposição ao campo magnético alternado e a dissipação térmica pelo organismo (JIANG et al., 2024). Como o modelo foi conduzido *in vitro*, a ausência de perfusão sanguínea eliminou a dissipação térmica fisiológica, tornando ainda mais crítico o controle dos parâmetros do sistema de aquecimento. Além disso, a temperatura foi monitorada em tempo real utilizando câmera termográfica, permitindo o mapeamento da evolução térmica e o ajuste dos parâmetros do campo.

Ainda assim, observou-se uma oscilação na temperatura dos fragmentos durante o processo de reaquecimento, sendo essa variação mais pronunciada no grupo BM e no grupo NW com concentração de 12 NP/mL. Mesmo com a aplicação de campos magnéticos projetados para promover aquecimento uniforme, é comum observar heterogeneidades térmicas no tecido. Isso se deve a variações nas propriedades dielétricas entre os diferentes constituintes da amostra, especialmente entre a água e componentes como proteínas e lipídios. Além disso, a permissividade elétrica (a capacidade de um material de armazenar energia elétrica em um campo elétrico) é uma propriedade que varia com a temperatura, o que pode intensificar essas diferenças ao longo do processo de aquecimento (NARAYANASWAMY et al., 2022; THIESEN, JORDAN, 2008; BISCHOF et al., 2015). Em contrapartida, os grupos com concentrações de 8 mg NP/mL e 10 mg NP/mL apresentaram um padrão de aquecimento mais homogêneo e constante, com menor amplitude de variação térmica nos fragmentos analisados. Ressalta-se, ainda, que os grupos BM e 8 mg NP/mL foram os que apresentaram o aquecimento mais lento ao longo do processo. Os dados experimentais obtidos por Barbés et al. (2013) reforçam a influência da concentração de nanopartículas nas propriedades térmicas. Porém, a geometria da amostra também influencia a distribuição do campo magnético e, consequentemente, a uniformidade térmica, resultando em regiões com taxas de aquecimento distintas (DENNIS et al., 2013; Wu et al., 2008).

Os grupos BM e 8 mg NP/mL apresentaram tempos médios semelhantes para que o fragmento de tecido ovariano vitrificado atingisse a temperatura de 37 °C. No grupo com 10 mg NP/mL, esse tempo foi significativamente menor, indicando maior eficiência térmica. No entanto, o grupo com 12 mg NP/mL não demonstrou ganho expressivo em relação ao de 10 mg NP/mL. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que, em concentrações muito elevadas, efeitos como interações dipolares entre as nanopartículas e a possível aglomeração delas podem comprometer a resposta magnética e térmica do sistema, reduzindo a eficiência do aquecimento (NARAYANASWAMY et al., 2022; DENNIS et al., 2013; GUARDIA et al., 2011; BONVIN et al., 2017).

Dentre as concentrações de nanopartículas testadas, a que mais se destacou foi a de 10 mg NP/mL, com tempo de aproximadamente 1 minuto para atingir 37 °C. Essa também demonstrou constância e homogeneidade. Observou-se um aumento significativo na velocidade de aquecimento, juntamente com a concentração de nanopartículas magnéticas. Em um estudo de *nanowarming* com rins de ratos, Han et al. (2023) mostraram que concentrações de até 10 mg de ferro (Fe)/mL trazem resultados positivos para a técnica, não demonstrando toxicidade para o órgão. Karimi et al. (2023), demonstraram que o tecido ovariano vitrificado de ovelhas pode ser reaquecido com sucesso utilizando *nanowarming* utilizando nanopartículas de óxido de ferro recobertas com sílica e PEG na concentração de 10 mg Fe/mL.

As amostras aquecidas por NW com a concentração de 10 mg NP/mL apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação às demais concentrações de reaquecimento por NW quanto por banho-maria. Notavelmente, os percentuais de folículos morfolologicamente normais, incluindo primordiais e em crescimento, foram comparáveis aos observados no grupo controle, sugerindo um efeito relevante do *nanowarming* com essa concentração de NP na preservação da integridade folicular. Este achado indica que o uso de nanopartículas em concentrações adequadas pode mitigar os danos induzidos pelo processo de criopreservação e reaquecimento.

Apesar disso, a retração folicular foi o tipo de lesão mais prevalente em todos os grupos experimentais, inclusive naqueles submetidos a *nanowarming*, apontando para um padrão de dano estrutural recorrente associado ao estresse térmico e osmótico durante o ciclo de congelamento e reaquecimento. O descolamento do estroma foi o aspecto de degeneração mais visto por Jivago et al. (2018) em tecido ovariano de cadela vitrificado, contudo na maioria dos

casos o folículo demonstrou estar morfolologicamente normal. Tal achado reforça a necessidade de otimização dos protocolos criobiológicos, particularmente no que tange à cinética de reaquecimento e à formulação dos crioprotetores, a fim de minimizar a ocorrência desse tipo de alteração morfológica (FAHY, WOWK, 2015; WENG et al., 2018; AMINI, BENSON, 2023).

De todas as classes de desenvolvimento folicular avaliada, a mais abundante foi a de folículos primordiais correspondendo a cerca de 81,9% do total. Essa proporção é semelhante ao relatado na literatura (LUCCI et al., 2002; JIVAGO et al., 2018; CHANG et al., 2011). A técnica de vitrificação utilizada foi baseada na descrita por Kagawa e colaboradores (2009), consistindo em um sistema aberto, em que pequenos fragmentos de tecido em tiras foram diretamente submersos em nitrogênio líquido, utilizando o menor volume possível de solução crioprotetora. A espessura do tecido foi de aproximadamente 1,0 mm, o que favorece tanto a preservação de folículos primordiais e primários, mais tolerantes aos processos de congelamento, quanto a penetração dos crioprotetores no tecido (KAGAWA et al. 2009).

No presente trabalho, utilizando o método convencional de reaquecimento, isto é o banho-maria, a porcentagem de folículos pré-antrais morfolologicamente normais totais foi de ~40%. Jivago et al. (2018), obtiveram cerca de 75% de folículos primordiais morfolologicamente normais após vitrificação de tecido ovariano canino. Em cães, Brandão et al. (2021), observaram uma diminuição de 81,1 % para 71,1% na proporção de folículos primordiais normais no grupo vitrificado, com densidade estromal reduzida. Apesar disso, o uso da criopreservação de tecido ovariano ainda proporcionou uma preservação folicular considerável quando comparado ao grupo controle fresco. Em vacas, Deligiannis et al. (2024), em um protocolo utilizando apenas etilenoglicol como agente crioprotetor, mostrou que a vitrificação trouxe menos dano ao tecido ovariano, evidenciado na densidade folicular, morfologia do tecido, proliferação celular e DNA intacto quando comparado a amostras não vitrificadas.

No presente trabalho, observou-se uma proporção significativamente maior de folículos morfolologicamente normais em fragmentos de tecido submetidos ao aquecimento por *nanowarming*, em comparação com aqueles que passaram pelo método convencional de reaquecimento em banho-maria. Esses dados sugerem que o *nanowarming* pode ser uma ferramenta útil no processo de reaquecimento de amostras preservadas pelo método de vitrificação, exercendo um efeito positivo sobre a preservação de folículos ovarianos. No processo de vitrificação, um dos momentos críticos é justamente o reaquecimento, onde pode

acontecer a desvitrificação, que é a formação de cristais de gelo durante o aquecimento das amostras (SHI et al., 2017). A desvitrificação ocorre quando as taxas de aquecimento não são rápidas o suficiente para passar pela temperatura de fusão sem que haja formação de cristais de gelo (LIU et al., 2008; FAHY, WOWK, 2015). Portanto, o resultado positivo obtido com o *nanowarming* pode estar relacionado a um aquecimento mais uniforme com taxas de aquecimento maiores, reduzindo danos que comprometem a integridade estrutural do tecido (como a formação de cristais de gelo).

Um estudo conduzido por Sharma et al. (2021) com rins de ratos mostrou que uso do *nanowarming* evitou a formação de cristais de gelo com minimização dos danos da criopreservação, sendo os órgãos aquecidos por magnetohipertemia melhores que os aquecidos por protocolos tradicionais. Ito et al. (2020), afirmam que o *nanowarming* demonstrou um reaquecimento uniforme e rápido de amostras de células tronco pluripotentes induzidas humanas vitrificadas em sistemas de 20 mL e melhorou sua viabilidade. Han et al. (2023) demonstraram com sucesso a vitrificação e *nanowarming* de rins de rato, a partir de nanopartículas magnéticas revestidas de sílica e PEG, armazenados por até 100 dias sendo capazes de restaurar função renal completa por até 30 dias após o transplante. Em ilhotas pancreáticas, Wakabayashi et al. (2022), utilizaram nanopartículas magnéticas de ferro revestidas por sílica no *nanowarming*, a morfologia das ilhotas após o aquecimento foi similar ao controle (fresco), a imunofluorescência de insulina e glucagon também foi semelhante, demonstrando seu potencial de melhoria na criopreservação de órgãos.

No entanto, ainda são poucos os trabalhos que testaram o *nanowarming* no aquecimento de tecido ovariano vitrificado, sendo apenas o de Karimi et al. (2023) que utilizaram tecido ovariano ovino e nanopartículas de óxido de ferro recobertas com sílica e PEG. Os resultados indicam integridade folicular e estromal do tecido ovariano após *nanowarming*. Ainda, a análise de apoptose revelou níveis similares aos observados no grupo fresco, sem diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que o aquecimento mediado por nanopartículas não induziu aumento na morte celular programada. Podemos citar também o trabalho de Tian et al. (2022), utilizando o *nanowarming* pós vitrificação de folículos isolados e encapsulados por hidrogel. Neste trabalho a viabilidade dos folículos primordiais melhorou cerca de 33% quando comparadas ao reaquecimento em banho maria tradicional. Khosla et al. (2020) indicaram que a criopreservação de embriões de zebrafish seguida de aquecimento por *nanowarming* com induzido por laser, culminou em filhotes que atingem a

fase adulta e se reproduzem normalmente. O protocolo utilizou uma injeção única de crioprotetores e nanobastões de ouro diretamente no vitelo dos embriões em estágio celular precoce, com cerca de 40% de embriões com a estrutura intacta após 1 hora de aquecimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a viabilidade do uso da magnetohipertermia como ferramenta auxiliar na preservação do tecido ovariano, desde que as taxas de aquecimento sejam rigorosamente controladas para evitar comprometimento celular e estrutural, conforme já destacado por outros autores (MANUCHEHRABADI et al., 2019; ETHERIDGE et al., 2014).

Os achados deste estudo demonstram que o tecido ovariano bovino, devido à sua semelhança morfofisiológica com o humano (FAHEEM et al., 2011; KAGAWA et al., 2009), constitui um modelo experimental relevante para avaliar os efeitos da vitrificação. O uso das nanopartículas apenas no meio de aquecimento, como apresentado nesse trabalho, contribui para o uso dessa tecnologia de forma universal. Assim, os resultados obtidos podem oferecer subsídios para futuras aplicações clínicas voltadas tanto à preservação da fertilidade quanto a aplicações na reprodução animal.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As observações realizadas indicam que a aplicação da técnica de *nanowarming* no reaquecimento de tecido ovariano vitrificado pode promover maior preservação da integridade morfológica de folículos primordiais, em comparação aos métodos convencionais. A elevada e homogênea taxa de aquecimento proporcionada pela hipertermia mediada por nanopartículas pode ser capaz de minimizar os danos causados pela recristalização, um fator crítico que limita o sucesso da criopreservação de tecidos complexos.

A capacidade das nanopartículas magnéticas de responder a campos magnéticos alternados favorece a elevação rápida e homogênea da temperatura, minimizando danos aos tecidos adjacentes e contribuindo para a manutenção da viabilidade celular. Desse modo, a utilização do *nanowarming* é uma estratégia promissora para otimizar protocolos de criopreservação, com potencial para melhorar significativamente os resultados de preservação da fertilidade em espécies animais e, possivelmente, em aplicações humanas.

Contudo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos adicionais que possibilitem a otimização e padronização dos protocolos de vitrificação e *nanowarming* para tecido ovariano, bem como a realização de testes funcionais pós-reaquecimento em modelos *in vitro* e/ou *in vivo*.

Assim, os dados apresentados fornecem uma base para o aprimoramento das técnicas de criopreservação seguido de aquecimento por *nanowarming* de tecido ovariano, sobretudo na preservação da fertilidade feminina diante de tratamentos oncológicos ou condições que levem à falência ovariana precoce e nas áreas de biotecnologia aplicada à reprodução animal.

## REFERÊNCIAS

- Akhter, M. H., Khalilullah, H., Gupta, M., Alfaleh, M. A., Alhakamy, N. A., Riadi, Y., Md, S. Impact of Protein Corona on the Biological Identity of Nanomedicine: Understanding the Fate of Nanomaterials in the Biological Milieu. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1496, 2021.
- Amini, M., Benson, D. Technologies for Vitrification Based Cryopreservation. **Bioengineering (Basel)**, v. 10, n. 5, p. 508, 2023.
- Amstad, E., Textora, M., Reimhult, E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 3, n. 7, p. 2819-2843, 2011.
- Andreu, I., Natividad, E. Accuracy of available methods for quantifying the heat power generation of nanoparticles for magnetic hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 739-751, 2013.
- Arav, A., Patrizio, P. Techniques of Cryopreservation for Ovarian Tissue and Whole Ovary. **Clinical Medicine Insights: Reproductive Health**, v. 13, p. 1179558119884945, 2019.
- Arndt, D., Gesing, T. M. and Bäumer, M. Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles and their Stability in Different Media. **ChemPlusChem**, v. 77, n. 7, p. 576-583, 2012.
- Atrei, A., Lesiak-Orlowska, B., Tóth, J. Magnetite nanoparticles functionalized with citrate: A surface science study by XPS and ToF-SIMS. **Applied Surface Science**, v. 602, n. 154366, 2022.
- Barbés, B., Páramo, R., Blanco, E., Pastoriza-Gallego, M. J., Piñeiro, M. M., Legido, J. L., Casanova, C. Thermal conductivity and specific heat capacity measurements of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 2, p. 1615-1625, 2013.
- Best, P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, n. 5, p. 422-436, 2015.
- Bischof, J. 45. *Nanowarming*: A new concept in tissue and organ preservation. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 176, 2015.
- Bonvin, D., Alexander, D. T. L., Millán, A., Piñol, R., Sanz, B., Goya, G. F., Martínez, A., Bastiaansen, J. A. M., Stuber, M., Schenk, K. J., Hofmann, H., Ebersold, M. M. Tuning Properties of Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Synthesis without Ligands to Improve MRI Relaxivity and SAR. **Nanomaterials**, v. 7, n. 8, p. 225, 2017.
- Brandão, F. A. S., Alves, K. A., de Brito, D. C. C., Pereira, L. M. C., de Moraes, G. B., Nãupas, L. V. S., de Souza, S. S., Alves, B. G., Rodrigues, A. P. R., Teixeira, D. Í. A. Vitrification of canine ovarian tissue using the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) device. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, n. 8, p. 1156-1161, 2021.
- Brito, J. L. M., Lima, V. N. de, Ansa, D. O., Moya, S. E., Moraes, P. C., Azevedo, R. B. de; Lucci, C. M. Accurate reproductive toxicology after intratesticular injection of silver nanoparticles (AgNPs) in Wistar rats. **Nanotoxicology**, v. 14, n. 7, p. 893-907, 2020.
- Chang, H. J., Moon, J. H., Lee, J. R., Jee, B. C., Suh, C. S., Kim, S. H. Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 37, n. 8, p. 1092-1101, 2011.
- Chen, J., Liu, X., Hu, Y., Chen, X., Tan, S. Cryopreservation of tissues and organs: present, bottlenecks, and future. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, n. 1201794, 2023.



- Chung, K., Donnez, J., Ginsburg, E., Meirow, D. Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation: decision making in fertility preservation for female cancer patients. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1534-1542, 2013.
- Cox, E., Takov, V. Embryology, Ovarian Follicle Development. **StatPearls Publishing**, 2021.
- Coxir, S. A., Costa, G. M. J., Santos, C. F. D., Alvarenga, R. L. L. S., Lacerda, S. M. D. S. N. From in vivo to in vitro: exploring the key molecular and cellular aspects of human female gametogenesis. **Human Cell**, v. 36, n. 4, p. 1283-1311, 2023.
- Deligiannis S. P., Kask, K., Modhukur, V., Boskovic, N., Ivask, M., Jaakma, Ü., Damdimopoulou, P., Tuuri, T., Velthut-Meikas, A., Salumets, A. Investigating the impact of vitrification on bovine ovarian tissue morphology, follicle survival, and transcriptomic signature. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 41, n. 4, p. 1035-1055, 2024.
- Dennis, C. L., Ivkov, R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 715-729, 2013.
- Dennis, C.; Jackson, A. J.; Borchers, J. A.; Ivkov, R.; Foreman, A. R.; Lau, J. W.; Goernitz, E.; Gruettner, C. The influence of collective behavior on the magnetic and heating properties of iron oxide nanoparticles. **Journal of Applied Physics**, v. 103, n. 7, 2008.
- Dompe, C., Kulus, M., Stefańska, K., Kranc, W., Chermuła, B., Bryl, R., Pieńkowski, W., Nawrocki, M. J., Petite, J. N., Stelmach, B., Mozdziak, P., Jeseta, M., Pawelczyk, L., Jaśkowski, J. M., Piotrowska-Kempisty, H., Spaczyński, R. Z., Nowicki, M., Kempisty, B. Human granulosa cells—stemness properties, molecular cross-talk and follicular angiogenesis. **Cell**, v. 10, n. 6, p. 1396, 2021.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B., van Langendonckt, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, n. 9443, p. 1405-1410, 2004.
- Donnez, J., Dolmans, M. M. Fertility Preservation in Women. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 17, p. 1657-1665, 2017.
- El Cury-Silva, T., Nunes, M. E. G, Casalechi, M., Comim, F. V., Rodrigues, J. K., Reis, F. M. Cryoprotectant agents for ovarian tissue vitrification: Systematic review. **Cryobiology**, v. 103, p. 7-14, 2021.
- Etheridge, M. L., Xu, Y., Rott, L., Choi, J., Glasmacher, B., Bischof, J. C. RF heating of magnetic nanoparticles improves the thawing of cryopreserved biomaterials. **Technology**, v. 2, n. 03, p. 229-242, 2014.
- Faheem, M. S., Carvalhais, I., Chaveiro, A., Moreira da Silva, F. In vitro oocyte fertilization and subsequent embryonic development after cryopreservation of bovine ovarian tissue, using an effective approach for oocyte collection. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 49-55, 2011.
- Fahy, G. M., Wowk, B. Principles of cryopreservation by vitrification. **Methods in Molecular Biology**, v. 1257, p. 21–82, 2015.
- Fisch, B., Abir, R. Female fertility preservation: Past, present and future. **Reproduction**, England, v. 156, n. 1, p. F11-F27, 2018.
- Gao, D., Critser K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.
- García-Acevedo, P., González-Gómez, M. A., Arnosa-Prieto, Á., de Castro-Alves, L.,

- Piñeiro, Y., Rivas, J. Role of dipolar interactions on the determination of the effective magnetic anisotropy in iron oxide nanoparticles. **Advanced Science**, v. 10, n. 5, p. 2203397, 2023.
- Golovin, Y. U., Golovin, D. Y., Vlasova, K. Y., Veselov, M. M., Usvaliev, A. D., Kabanov, A. V., Klyachko, N. L. Non-Heating Alternating Magnetic Field Nanomechanical Stimulation of Biomolecule Structures via Magnetic Nanoparticles as the Basis for Future Low-Toxic Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 2255, 2021.
- Guardia, P., Labarta, A., Batlle, X. Tuning the Size, the Shape, and the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 2, p. 390-396, 2011.
- Han, Z., Rao, J. S., Gangwar, L., Pasek-Allen, J. L., Etheridge, M. L., Wolf, S. M., Pruett T. L., Bischof, J. C., Finger, E. B. Vitrification and nanowarming enable long-term organ cryopreservation and life-sustaining kidney transplantation in a rat model. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 3407, 2023.
- Hinkle, K., Orwig, K. E., Valli-Pulaski, H., Taylor, S., van Leeuwen, K., Carpentieri, D., Walsh, A. Cryopreservation of Ovarian Tissue for Pediatric Fertility. **Biopreservation and biobanking**, v. 19, n. 2, p. 130-135, 2021..
- Hoekman, E. J., Louwe, L. A., Rooijers, M., van der Westerlaken, L. A. J., Klijn, N. F., Pilgram, G. S. K., de Kroon, C. D., Hilders, C. G. J. M. Ovarian tissue cryopreservation: Low usage rates and high live-birth rate after transplantation. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 99, n. 2, p. 213-221, 2020.
- Imbert, R., Moffa, F., Tsepelidis, S., Simon, P., Delbaere, A., Devreker, F., Dechene, J., Ferster, A., Veys, I., Fastrez, M., Englert, Y., Demeestere, I. Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. **Human Reproduction**, v. 29, n. 9, p. 1931-1940, 2014.
- Ito, A., Yoshioka, K., Masumoto, S., Sato, K., Hatae, Y., Nakai, T., Yamazaki, T., Takahashi, M. Tanoue, S., Horie, M. Magnetic heating of nanoparticles as a scalable cryopreservation technology for human induced pluripotent stem cells. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-11, 2020.
- Bahr, J. M., Milich, K. M. Ovarian physiology. **Ovarian Toxicology**, p. 313, 2013.
- Jadoul, P., Guilmain, A., Squifflet, J., Luyckx, M., Votino, R., Wyns, C., Dolmans, M. M. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. **Human Reproduction**, v. 32, n. 5, p. 1046-1054, 2017.
- Jiang, M., Zhang, G. H., Yu, Y., Zhao, Y. H., Liu, J., Zeng, Q., Feng, M. Ye, F., Xiong, D., Wang, L., Zhang, Y., Yu, L., Wei, J., He, L., Zhi, W., Du, X., Li, N., Han, C., Yan, H., Zhou, Z., Miao, Y., Wang, W., Liu, W. X. De novo design of a nanoregulator for the dynamic restoration of ovarian tissue in cryopreservation and transplantation. **Journal of nanobiotechnology**, v. 22, n. 1, p. 330, 2024.
- Jivago, J. L .P. R., Brito, J. L. M., Capistrano, G. Vinícius-Araújo, M., Lima Verde, E., Bakuzis, A. F., Souza, P. E. N., Azevedo, R. B., Lucci, C. M. New Prospects in Neutering Male Animals Using Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. **Pharmaceutics** v. 13, n. 9, p. 1465, 2021.
- Jivago, J. L. P. R., Paulini, F., Silva, R. C., Araújo, M. S., Marinho, A. P. S., Lucci, C. M. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles. **Cryobiology**, v. 81, p. 34-42, 2018.

- Kagawa, N., Silber, S., Kuwayama, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive biomedicine online**, v. 18, n. 4, p. 568-577, 2009..
- Karimi, S., Tabatabaei, S. N., Novin, M. G., Kazemi, M., Mofarahe, Z. S., Ebrahimzadeh-Bideskan, A. *Nanowarming* improves survival of vitrified ovarian tissue and follicular development in a sheep model. **Heliyon**, v. 9, n. 8, p. 18828, 2023.
- Kasaven, L. S., Saso, S., Getreu, N., O'Neill, H., Bracewell-Milnes, T., Shakir, F., Yazbek, J., Thum, M. Y., Nicopoullos, J., Ben Nagi, J., Hardiman, P., Diaz-Garcia, C., Jones, B. P. Age-related fertility decline: is there a role for elective ovarian tissue cryopreservation?. **Human Reproduction**, v. 37, n. 9, p. 1970-1979, 2022.
- Khosla, K., Kangas, K., Liu, Y., Zhan, L., Daly, J., Hagedorn, M., Bischof, J. Cryopreservation and laser nanowarming of zebrafish embryos followed by hatching and spawning. **Advanced Biosystems**, v. 4, n. 11, p. 2000138, 2020.
- Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O., Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 1-2, p. 8-23, 2011.
- Leonel, E. C. R., Corral, A., Risco, R. Camboni, A., Taboga, S. R., Kilbride, P., Vazquez, M., Morris, J., Dolmans, M-M., Amorim, C. A.. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. **Science Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 20008, 2019.
- Leonel, E. C. R., Lucci, C. M., Amorim, C. A. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. **Transfusion medicine and hemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 173-181, 2019.
- Loren, A. W., Mangu, P. B., Beck, L. N., Brennan, L., Magdalinski, A. J., Partridge, A. H., Quinn, G., Wallace, W. H., Oktay, K.. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. **Journal of clinical oncology**, v. 31, n. 19, p. 2500-2510, 2013.
- Liu, L. J., Xie, X. Y., Zhang, R. Z., Xu, P., Bujard, H., Jun, M. Reproduction and fertility in wild-type and transgenic mice after orthotopic transplantation of cryopreserved ovaries from 10-d-old mice. **Lab Animal**, v. 37, n. 8, p. 353-357, 2008.
- Lucci, C. M., Rumpf, R., Figueiredo, J. R., Báó, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1467-1483, 2002.
- Manuchehrabadi, N., Gao, Z., Zhang, J., Ring, H. L., Shao, Q., Liu, F., McDermott, M., Fok, A., Rabin, Y., Brockbank, K. G., Garwood, M., Haynes, C. L., Bischof, J. C. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. **Science translational medicine**, v. 9, n. 379, p. eaah4586, 2017.
- Massarotti, C., Scaruffi, P., Lambertini, M., Remorgida, V., Del Mastro, L., Anserini, P. State of the art on oocyte cryopreservation in female cancer patients: a critical review of the literature. **Cancer Treatment Reviews**, v. 57, p. 50-57, 2017.
- Mavrides, A., Morroll, D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 118, n. 1, p. 66-70, 2005.
- Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, n. 3934, p. 939-949, 1970.
- Medrano, J. V., Andrés, M. D. M., García, S., Herraiz, S., Vilanova-Pérez, T., Goossens, E., Pellicer, A. Basic and clinical approaches for fertility preservation and restoration in

- cancer patients. **Trends Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 199-215, 2018.
- Mihm, M., Gangooly, S., Muttukrishna, S. The normal menstrual cycle in women. **Animal Reproductive Science**, v. 124, n. 3-4, p. 229-236, 2011.
- Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbies-Tran, R., Elis, S., Fabre, S., Maillard, V., Monget, P., Uzbekova, S. Encyclopedia of Endocrine Diseases: Folliculogenesis. Second Edition. United states of America. **Academic Press**, vol. 2, p. 377–398, 2019.
- Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H., Spears, N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 5, p. 525-535, 2012.
- Mühlberger, M., Janko, C., Unterweger, H., Friedrich, R. P., Friedrich, B., Band, J., Cebulla, N., Alexiou, C., Dudziak, D., Lee, G., Tietze, R. Functionalization Of T Lymphocytes With Citrate-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles For Magnetically Controlled Immune Therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 8421-8432, 2019.
- Narayanaswamy, V., Jagal, J., Khurshid, H., Al-Omari, I.A., Haider, M., Kamzin, A.S., Obaidat, I. M., Issa, B. Hyperthermia of magnetically soft-soft core-shell ferrite nanoparticles. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 23, p. 14825, 2022.
- Petrek, J. A., Naughton, M. J., Case, L. D., Paskett, E. D., Naftalis, E. Z., Singletary, S. E., Sukumvanich, P. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment. A prospective study. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 7, p. 1045-1051, 2006.
- Pucci, C., Degl'Innocenti, A., Belenli Gümüş, M., Ciofani, G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: recent advancements, molecular effects, and future directions in the omics era. **Biomaterials Science**, v. 10, n. 9, p. 2103-2121, 2022.
- Rauscher, H., Sokull-Klüttgen, B., Stamm, H. The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 7, p. 1195-1197, 2013.
- Rodriguez-Wallberg, K. A., Tanbo, T., Tinkanen, H., Thurin-Kjellberg, A., Nedstrand, E., Kitlinski, M. L., Macklon, K. T., Ernst, E., Fedder, J., Tiitinen, A., Morin-Papunen, L., Einarsson, S., Jokimaa, V., Hippeläinen, M., Lood, M., Gudmundsson, J., Olofsson, J. I., Andersen, C. Y. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation among alternatives for fertility preservation in the Nordic countries - compilation of 20 years of multicenter experience. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 95, n. 9, p. 1015-1026, 2016.
- Thiesen, B., Jordan, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 24, n. 6, p. 467-474, 2008.
- Tian, C., Shen, L., Gong, C., Cao, Y., Shi, Q., Zhao, G. Microencapsulation and *nanowarming* enables vitrification cryopreservation of mouse preantral follicles. **Nature Communication**, v. 13, n. 1, p. 7515, 2022.
- Shah, J. S., Sabouni, R., Cayton Vaught, K. C., Owen, C. M., Albertini, D. F., Segars, J. H. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: A systematic review. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 35, n. 7, p. 1135-1148, 2018.
- Sharma, A., Lee, C. Y., Namsrai, B. E., Han, Z., Tobolt, D., Rao, J. S., Gao Z., Etheridge, M. L., Garwood, M., Clemens, M. G., Bischof, J.C., Finger, E. B. Cryopreservation of Whole Rat Livers by Vitrification and Nanowarming. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 51, n. 3, p. 566-577, 2023.

- Sharma, A., Rao, J. S. Z., Han, L., Gangwar, B., Namsrai, Z., Gao, H. L., Ring, E., Magnuson, M., Etheridge, B., Wowk, G. M., Fahy, M., Garwood, E. B., Finger, J. C., Bischof, J. Vitrication and Nanowarming of Kidneys. **Advanced Science**, v. 8, n. 19, p. 2101691, 2021.
- Shi, Q., Xie, Y., Wang, Y., Li, S. Vitrication versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8538, 2017.
- Silber, S. J., Grudzinskas, G., Gosden, R. G. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2617-2618, 2008.
- Silva, L. M., Mbemba, G. T., Guerreiro, D. D., Brito, D. C. C., Donfack, N. J., Morais, M. L. G. S., Rodrigues, G. Q., Bruno, J. B., Rocha, R. M. P., Alves, B. G., Apgar, G. A., Cebin, F. W. S., Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P. R. Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrication Solution of Ovine Ovarian Tissue. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 4, p. 258-269, 2018.
- Suzuki, N., Yoshioka, N., Takae, S., Sugishita, Y., Tamura, M., Hashimoto, S., Morimoto, Y., Kawamura, K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrication in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, n. 3, p. 608-615, 2015.
- Uyar, A., Torrealday, S., Seli, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility Sterility**, v. 99, n. 4, p. 979-997, 2013.
- Van den Abbeel, E., Schneider, U., Liu, J., Agca, Y., Critser, J. K., Van Steirteghem, A. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human *in vitro* matured MII oocytes. **Human Reproduction**, v. 22, n. 7, p. 1959-1972, 2007.
- Wakabayashi, T., Kaneko, M., Nakai, T., Horie, M., Fujimoto, H., Takahashi, M., Tanoue, S., Ito, A. Nanowarming of vitricified pancreatic islets as a cryopreservation technology for transplantation. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 8, n. 4, p. e10416, 2023.
- Wallace, W. H., Kelsey, T. W., Anderson, R. A. Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 1, p. 6-12, 2016.
- Weng, L., Stott, L., Toner, M. Exploring Dynamics and Structure of Biomolecules, Cryoprotectants, and Water Using Molecular Dynamics Simulations: Implications for Biostabilization and Biopreservation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2019.
- Wu, W., He, Q., Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397, 2008.