



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DIEGO ALBERTO MONTANO VIZCARRA

**USO DE POLÍMEROS SINTÉTICOS MELHORA A QUALIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS CAPRINOS VITRIFICADOS E CULTIVADOS NO TECIDO OVARIANO**

FORTALEZA – CEARÁ

2017

DIEGO ALBERTO MONTANO VIZCARRA

USO DE POLÍMEROS SINTÉTICOS MELHORA A QUALIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS CAPRINOS VITRIFICADOS E CULTIVADOS NO TECIDO OVARIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal. Linha de Pesquisa: Reprodução de Pequenos Ruminantes.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Ribeiro Rodrigues

FORTALEZA- CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Montano Vizcarra, Diego Alberto.

Uso de polímeros sintéticos melhora a qualidade de folículos pré-antrais caprinos vitrificados no tecido ovariano [recurso eletrônico] / Diego Alberto Montano Vizcarra. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 79 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof.^a Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.

1. tecido ovariano. 2. polímero sintético. 3. cultivo in vitro. 4. SuperCool X-1000. I. Título.

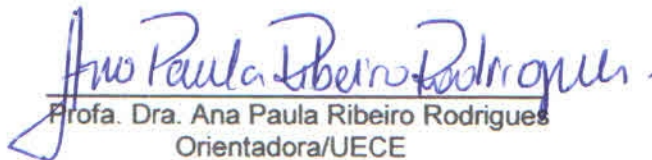
DIEGO ALBERTO MONTANO VIZCARRA


“USO DE POLÍMEROS SINTÉTICOS MELHORA A QUALIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS VITRIFICADOS E CULTIVADOS NO TECIDO OVARIANO”


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

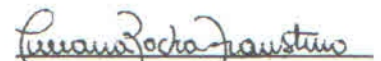
Aprovada em 25/07/17

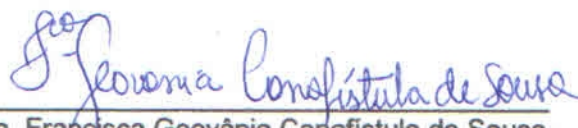
BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
Orientadora/UECE


Dra. Jamily Bezerra Bruno
Co-orientadora/UFC


Prof. Dr. Davide Rondina
Examinador/UECE


Profa. Dra. Luciana Faustino
Externo/UFPI


Dra. Francisca Geovânia Cariafistula de Sousa
Suplente/UECE

Dedico,

A Deus, pela saúde e vida.

À minha amada família, Norma, Alberto e Lis, pelo imenso amor e apoio em todos os momentos.

À minha companheira da vida, Cyntia, quem teve a paciência para me esperar e o amor para me visitar enquanto eu estava trabalhando para alcançar esse objetivo.

Aos meus cachorros, Bronco, quem fomentou em mim o interesse pela Medicina Veterinária e agora descansa em paz e Kina, quem continua até hoje enchendo nossos dias com alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a oportunidade de viver e me deu forças para que eu conseguisse continuar e concluir este trabalho.

Agradeço imensamente à minha família, Norma, Alberto e Lis, pelo amor e apoio durante esta caminhada e compreensão durante os meses de ausência.

À Cyntia, minha companheira da vida, e amiga, pelo amor e cuidados em momentos difíceis e compreensão durante o tempo de ausência.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, pela excelente orientação, confiança e oportunidades oferecidas e, ao Professor Dr. José Ricardo de Figueiredo pela oportunidade e acolhimento no LAMOFOPA.

À minha co-orientadora Dra. Jamily Bezerra Bruno, pela preocupação e orientação, durante a execução dos procedimentos técnicos e correção dos documentos.

À minha equipe de trabalho, Luciana Mascena, Deysi Dipaz e Luana Gaudêncio pela excelente orientação e ajuda durante o planejamento e execução do experimento e Yago Pinto pela imensa ajuda com o corte de blocos e análises histológicas.

À Dra. Danielle Calado pela valiosa ajuda durante o processamento das minhas amostras para imunohistoquímica.

Aos Drs. Benner Alves e Kele Amaral Alves pela disponibilidade na correção dos documentos e ajuda com as análises estatísticas.

A TODOS os membros da equipe de LAMOFOPA, que contribuíram com o meu trabalho, obrigado pelos ensinamentos e pela amizade.

À Universidade Estadual de Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pelo acolhimento e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro dessa pesquisa.

A todos em geral que contribuíram direta ou indiretamente com esta conquista, os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A vitrificação de tecido ovariano é uma alternativa para preservar a fertilidade de pacientes humanas que sofrem de câncer e que estão em risco de falência ovariana prematura. No entanto, existe sempre a necessidade de aprimorar o protocolo existente de vitrificação desse material biológico. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se a adição de polímeros sintéticos na solução de vitrificação afetou a morfologia e desenvolvimento folicular, níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular (Ki-67), presença de canais de água (Aquaporina-3 ou AQP3) e apoptose (Caspase-3 ativada) no tecido ovariano da espécie caprina, conhecida por ser um excelente modelo translacional para o ser humano. Para isso, ovários caprinos foram obtidos de abatedouros locais e transportados ao laboratório dentro de uma hora. Uma vez no laboratório, o córtex ovariano de cada par ovariano foi cortado em pequenos fragmentos (n = 12; 1 x 1 x 0,5 mm) usando um Tissue Slicer® (Thomas Scientific) em condições estéreis. Somente aqueles com um número considerável de folículos pré-antrais foram considerados e distribuídos aleatoriamente entre os grupos. Dois fragmentos frescos foram fixados em 4 % de paraformaldeído (PAF) por 2 horas a 37 °C e denominados *Controle Fresco*, enquanto outros dois foram cultivados *in vitro* por 7 dias e denominados *Controle Cultivado*. Os fragmentos restantes (n = 8) foram distribuídos em quatro diferentes condições de vitrificação (2 fragmentos/condição): 1) Vitrificação com adição de *sacarose*; 2) Vitrificação com adição de *SuperCool X-1000* 0,2%; 3) *SuperCool Z-1000* 0,4% ou 4) com *PVP K-12* 0,2%, totalizando quatro tratamentos experimentais. Todas as soluções de vitrificação incluíam o antioxidante catalase. O Controle Cultivado e os tratamentos vitrificados foram destinados para o cultivo *in vitro* por 7 dias. Morfologicamente, o tratamento com SuperCool X-1000 não mostrou diferenças significativas em relação ao Controle Fresco e foi superior em relação aos demais. Quanto ao desenvolvimento folicular, todos os fragmentos vitrificados e cultivados *in vitro* mantiveram a percentagem de folículos em desenvolvimento equivalente ao Controle Fresco, exceto no grupo vitrificado com SuperCool Z-1000 que mostrou uma redução significativa na percentagem de desenvolvimento folicular após 7 dias de cultivo. No tocante à análise de proliferação, somente o Controle Fresco mostrou células da granulosa marcadas positivamente para Ki-67. As marcações de AQP3 mais fortes foram encontradas no tratamento com Supercool X-1000 em todas as categorias foliculares avaliadas exceto para o

compartimento oocitário nos folículos secundários. A respeito da análise da caspase-3 ativada, não foram achadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Os níveis de ROS foram iguais para todos os tratamentos cultivados. Em conclusão, demonstrou-se que a vitrificação com o polímero sintético SuperCool X-1000 manteve a morfologia folicular semelhante à observada no tecido fresco, ou seja, folículos vitrificados com este polímero sintético podem resistir melhor o estresse sofrido durante este processo. Assim mesmo, os resultados de ROS sugerem que a interação entre o SuperCool X-1000 e o antioxidante catalase podem ajudar a reduzir o estresse oxidativo que pode levar a injúrias nos folículos ovarianos.

Palavras-chave: Tecido ovariano. Polímeros sintéticos. Cultivo *in vitro*. SuperCool X-1000.

ABSTRACT

Ovarian tissue vitrification is an alternative for fertility preservation in human female cancer patients that are at risk of premature ovarian failure. However, there is always the need for further improving the protocol used for vitrifying this biological material. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the addition of synthetic polymers to the vitrification solution affected follicular morphology and development, reactive oxygen species (ROS) levels and the expression of proteins related to cell proliferation (Ki-67), water channels (Aquaporin-3 or AQP3) and apoptosis (activated Caspase-3) in ovarian tissue of the caprine species, known to be excellent translational models for the human being. Regarding the methodology, caprine ovaries were obtained from local abattoirs and transported to the laboratory within one hour. Once there, the ovarian cortex from each ovarian pair was cut into small fragments ($n = 12$; $1 \times 1 \times 0,5$ mm) using a Tissue Slicer® (Thomas Scientific) under sterile conditions. Only those fragments with a considerable number of preantral follicles were considered and distributed randomly between the groups. Two fresh fragments were fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA) for 2 hours at 37 °C and named as *Fresh Control*, while other two were *in vitro* cultured for 7 days and named *Cultured Control*. The remaining fragments ($n = 8$) were distributed in four different vitrification conditions (2 fragments/condition): 1) Vitrification with the addition of *sucrose*; 2) Vitrification with the addition of *SuperCool X-1000* 0.2 %; 3) *SuperCool Z-1000* 0.4 % or 4) *PVP K-12* 0.2 %, totaling four experimental treatments. All vitrification solutions included the antioxidant catalase. Cultured Control and vitrified treatments were destined for *in vitro* culture for 7 days. Morphologically, the treatment with SuperCool X-1000 showed no significant difference with the Fresh Control group and was superior to the other treatments. Regarding follicular development, all vitrified and *in vitro* cultured fragments maintained the percentage of developing follicles similar to the Fresh Control, except the one vitrified with SuperCool Z-1000 that showed a significant reduction in the follicular development percentages after 7 days of culture. Regarding the proliferation analysis, only the Fresh Control showed Ki-67-positive granulosa cells. The strongest AQP3 labels were found in the SuperCool X-1000 treatment in all follicular categories evaluated except for the oocyte compartment of the secondary follicles. Concerning the activated caspase-3 analysis, there were no statistically significant differences between treatments. ROS levels were the same for all the cultured treatments. In conclusion, we have demonstrated that the vitrification with

the synthetic polymer SuperCool X-1000 maintained the follicular morphology similar to the observed in the fresh tissue, in other words, follicles vitrified with this synthetic polymer could resist better the stress suffered during this process. Also, the ROS results suggest that the interaction between SuperCool X-1000 and catalase could help reduce the oxidative stress that can lead to injuries to the follicles.

Key-words: Ovarian tissue. Synthetic polymer. In vitro culture. SuperCool X-1000.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Congelação lenta versus vitrificação.....	22
Figura 2 -	Representação esquemática do mecanismo de ação dos ACPs...	28
Figura 3 -	Nucleação homogênea e heterogênea durante o processo de resfriamento.....	29
Figura 4 -	Representação esquemática dos mecanismos de crioproteção...	30
Figura 5 -	Zonas de crescimento de gelo.....	31
Figure 1 -	Microscopy images of morphological evaluation after acid-periodic Schiff staining.....	48
Figure 2 -	Percentage of morphologically normal preantral follicles on fresh or vitrified ovarian fragments before and after <i>in vitro</i> culture for 7 days.....	49
Figure 3 -	Percentage of developing follicles in fresh control, vitrified only and after vitrification followed by <i>in vitro</i> culture for 7 days.....	50
Figure 4 -	Immunolocalization of activated caspase-3 (A-D) on caprine ovarian preantral follicles from different treatments, <i>Fresh Control</i> (A); <i>Cultured Control</i> (B); <i>Sucrose</i> (C) and <i>SuperCool X-1000</i> (D). Immunolocalization of aquaporin 3 (E-H) on caprine ovarian preantral follicles from different treatments, <i>Fresh Control</i> (E); <i>Cultured Control</i> (F); <i>Sucrose</i> (G) and <i>SuperCool X-1000</i> (H).....	51
Figure 5 -	Mean (\pm standard error of the mean) reactive oxygen species (relative fluorescence units) produced by caprine ovarian tissue fragments after vitrified and <i>in vitro</i> cultured for 7 days.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPs	Agentes crioprotetores
AQP3	Aquaporina-3
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
CGI	Cristais de gelo intracelulares
CGP	Células germinativas primordiais
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAB	Diaminobenzidina
DCFH-DA	Dihydrodichlorofluorescein diacetate (Diclorofluoresceína diacetato)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
Dra.	Doutora
EG	Etilenoglicol
EGF	Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)
FGF	Fibroblast growth factor (Fator de crescimento fibroblástico)
FOPA	Folículo ovariano pré-antral
FSH	Follicle-Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
GDF9	Growth differentiation factor-9 (Fator de Crescimento e Diferenciação 9)
GPAC	Glicoproteína anticongelamento
IHC	Imunohistoquímica
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium (Insulina-Transferrina-Selênio)
IU	International Unit (Unidade internacional)
LAMOFOPA	Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais
MEM	Minimum essential medium (Meio essencial mínimo)
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
OTC	Ovarian Tissue Cryosystem (Criosistema para tecido ovariano)
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PI	Prófase I
PPGCV	Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
PROH	Propanediol (Propanodiol)
PVA	Polyvinyl alcohol (Álcool Polivinílico)
PVP	Polyvinylpyrrolidone (Polivinilpirrolidona)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucléico)
ROS	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
RT	Room temperature (Temperatura ambiente)
Tg	Glass transition temperature (Temperatura de transição vítrea)
Th	Homogeneous nucleation temperature (Temperatura da nucleação homogênea)
UECE	Universidade Estadual do Ceará
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotélio vascular)
VS1-2	Vitrification solution 1-2 (Solução de vitrificação 1-2)
WS1-3	Warming solution 1-3 (Solução de aquecimento 1-3)
α -MEM	Minimum essential medium alpha (Meio essencial mínimo alfa)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
h	Hour (Hora)
L	Litro
Mg	Miligramas
Min	Minutes (Minutos)
mL	Mililitros
mm	Milímetro
MM	Milimolar
N	Número
Ng	Nanogramas
pH	Pressão de hidrogênio
S	Seconds (Segundos)
µg	Microgramas
µL	Microlitros
%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
≤	Menor ou igual
+	Mais
±	Mais ou Menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	A CRIOPRESERVAÇÃO NA REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	19
2.1.1	Tipos de material biológico criopreservado para manter a função reprodutiva.....	20
2.1.2	Métodos de criopreservação	22
2.1.2.1	Congelação lenta.....	23
2.1.2.2	Vitrificação.....	24
2.1.3	Agentes crioprotetores.....	26
2.1.4	Polímeros sintéticos.....	28
2.2	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO.....	32
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	35
5	OBJETIVOS.....	35
5.1	GERAL.....	35
5.2	ESPECÍFICOS.....	35
6	CAPÍTULO 1	36
7	CONCLUSÕES.....	65
8	PERSPECTIVAS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a criotecnologia tem mostrado grande relevância tanto na medicina reprodutiva humana quanto na reprodução animal, através da criopreservação de embriões (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2014); células germinativas masculinas (PIASSI *et al.*, 2009) e femininas (RODRIGUES *et al.*, 2004a,b); bem como de tecido ovariano (LADANYI *et al.*, 2017); permitindo a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C). Do ponto de vista clínico, quando às técnicas de reprodução assistida, a criopreservação permite o desenvolvimento de novas estratégias para restaurar a fertilidade de mulheres submetidas à exposição aos quimioterápicos, comumente empregados para o tratamento do câncer e que desejam ter filhos após a remissão da doença (JERUSS e WOODRUFF., 2009; AMORIM *et al.*, 2012; TELFER e ZELINSKI., 2013).

Dentre as estratégias disponíveis para assegurar a função reprodutiva feminina, destacam-se a utilização de embriões e oócitos maduros, previamente criopreservados. No entanto, ambas estratégias, dentre outros requisitos requerem tempo e higidez do indivíduo para responder adequadamente à estimulação hormonal (LUCAS e HENSEL., 2014). Desta forma, tanto a criopreservação de embriões como de oócitos maduros não é recomendada para mulheres que sofrem de câncer ou outras desordens, pois em muitos casos, necessitam iniciar seu tratamento de maneira imediata. Nestes casos, a criopreservação do tecido ovariano representa uma alternativa promissora pois além de não necessitar de estimulação hormonal e uso do sêmen (AMORIM *et al.*, 2011), permite preservar um grande número de oócitos inclusos em folículos pré-antrais e mantém a integridade estrutural e funcional do ovário.

Até o presente momento, na espécie humana, mais de 80 nascimentos a partir do tecido ovariano criopreservado já foram relatados na literatura por diferentes pesquisadores (LADANYI *et al.*, 2017). Apesar da grande maioria dos estudos terem utilizado o processo de congelamento lento, alguns autores já demonstraram que a vitrificação também pode ser empregada com sucesso, provando que o nascimento de indivíduos saudáveis também é possível utilizando tecido ovariano vitrificado (SUZUKI *et al.*, 2015). A vitrificação é capaz de evitar a formação do gelo intracelular devido à utilização de altas concentrações de agentes crioprotetores (ACPs) intracelulares, associadas a uma taxa de resfriamento ultra-rápida para aumentar a viscosidade da solução de vitrificação e, promover a passagem da água do estado líquido para um estado

vítreo amorfo (FAHY *et al.*, 1984, 2004; AMORIM *et al.*, 2012). No entanto, esses requerimentos podem levar a crioinjúrias celulares devido à toxicidade e estresse osmótico (AMORIM *et al.*, 2011; LUZ *et al.*, 2011). Visando reduzir as crioinjúrias, açúcares como a sacarose (SANTOS *et al.*, 2006; TANPRADIT *et al.*, 2015) e a trealose (RUIZ *et al.*, 2013), têm sido utilizados como ACPs extracelulares na solução de vitrificação, associados aos ACPs intracelulares (AL-AGHBARI e MENINO, 2002; HASHIMOTO *et al.*, 2010). Os açúcares modificam o gradiente osmótico, promovem a desidratação celular através da saída da água e com isso inibem a formação de cristais intracelulares (SANTOS *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009). Porém, devido à rápida exposição (5 minutos) do material biológico ao açúcar presente na solução de vitrificação e à alta velocidade de resfriamento ($>15,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) acreditamos que o uso de açúcares ainda não seja suficientemente capaz de evitar a formação de pequenos cristais de gelo intracelular, indicando a necessidade de otimização do protocolo de vitrificação.

Polímeros naturais como as proteínas e glicoproteínas anticongelantes (GPAC) são encontrados em peixes polares e insetos de clima muito frio e oferecem a estes indivíduos, tolerância e sobrevivência à congelação (HARDING *et al.*, 2003). Essas proteínas agem comprimindo o ponto de congelamento por um processo conhecido como histerese térmica e estão disponíveis na natureza em quantidades muito pequenas. Felizmente, graças aos esforços de Fahy *et al.*, foram criados análogos sintéticos para essas glicoproteínas anticongelamento (WOWK *et al.*, 2000). O copolímero de álcool polivinílico ou SuperCool X-1000, a polivinilpirrolidona (PVP), e o copolímero de poliglicerol ou SuperCool Z-1000 são exemplos de polímeros sintéticos que mimetizam a ação das GPAC. Esses polímeros têm sido empregados como componentes extracelulares na solução de vitrificação, mostrando resultados promissores em vários sistemas (BADRZADEH *et al.*, 2010; HASHIMOTO *et al.*, 2010; TING *et al.*, 2012, 2013; MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2014). Os polímeros sintéticos também permitem reduzir a concentração dos ACPs intracelulares necessários para a vitrificação, aumentando a estabilidade do estado amorfo das soluções de vitrificação e evitando a ocorrência de recristalização do gelo ou devitrificação que é a formação de gelo durante o processo de aquecimento (WOWK *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2009; MAKAREVICH *et al.*, 2010; CONGDON *et al.*, 2013; DELLER *et al.*, 2013; MITCHELL *et al.*, 2015). Portanto, acreditamos que esses componentes sejam uma alternativa promissora para melhorar os resultados da vitrificação de tecido ovariano.

Considerando a importância da criopreservação do tecido ovariano para a preservação da fertilidade feminina, a revisão de literatura a seguir aborda a importância da criopreservação no contexto da tecnologia de reprodução assistida, ressaltando o processo de vitrificação, bem como os polímeros sintéticos como adjuvantes da solução de vitrificação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CRIOPRESERVAÇÃO NA REPRODUÇÃO ASSISTIDA

A criopreservação é uma técnica que utiliza temperaturas ultrabaixas para preservar células e tecidos vivos estruturalmente intactos (PEGG, 2007). As baixas temperaturas levam a uma redução do metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, garantindo a retomada do desenvolvimento celular normal após aquecimento (CASTRO *et al.*, 2011). Na condição de frio extremo, isto é, a partir de -80°C , o transporte de substâncias através da membrana (difusão celular) é considerado insignificante; conseqüentemente, as reações metabólicas impulsionadas pela energia térmica ocorrem muito lentamente ou são completamente paralisadas (FAUSTINO *et al.*, 2011). Isso é de grande importância quando se deseja criopreservar um órgão inteiro ou pequenas partes deste como é o caso da criopreservação de ovários de mulheres que se submetem a tratamentos quimioterápicos para a cura do câncer ou outras desordens.

Anualmente, mais de 35.000 mulheres com idades entre 15 e 39 anos são diagnosticadas com câncer (COCCIA *et al.*, 2014). Os avanços nas terapias e cuidados de suporte permitem a sobrevivência da maioria delas, porém, podem sofrer com a menopausa prematura ou tornarem-se inférteis (LEVINE *et al.*, 2015). Assim, a criopreservação associada às técnicas de reprodução assistida tem uma grande relevância clínica, uma vez que permite o desenvolvimento de novas estratégias para restaurar a fertilidade em crianças e adolescentes que estão em risco de falência ovariana prematura ou de mulheres com câncer que desejam ter filhos após a cura da doença (JERUSS e WOODRUFF., 2009; AMORIM *et al.*, 2012; TELFER e ZELINSKI., 2013). Além disso, do ponto de vista da reprodução animal, a criopreservação também tem grande destaque pela sua utilidade no estabelecimento e manutenção de bancos de gametas com a finalidade de salvar genótipos valiosos e/ou em risco de extinção (CARVALHO *et al.*, 2011; LUNARDI *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2012). Desta forma, vários estudos tem demonstrado o desenvolvimento progressivo de técnicas de criopreservação que são aplicáveis a diferentes fontes biológicas (MERYMAN *et al.*, 2007), como será visto a seguir.

2.1.1. Tipos de material biológico criopreservado para manter a função reprodutiva

A *criopreservação de embriões* é a abordagem mais utilizada nos procedimentos que visam a preservação da fertilidade da fêmea nas últimas décadas (CORTVRINDT *et al.*, 1996; MANDELBAUM *et al.*, 1998; GUPTA *et al.*, 2008). No entanto, apresenta o inconveniente da necessidade da estimulação hormonal das mulheres ou fêmeas, bem como o uso do sêmen para a produção dos embriões (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Portanto, a criopreservação de embriões não pode ser realizada em qualquer momento ou estágio reprodutivo da fêmea, sobretudo naquelas mulheres jovens reprodutivamente, imaturas por não responderem ao tratamento hormonal. Além disso, questões éticas e religiosas podem dificultar a utilização e estocagem desse tipo de material biológico (KAPP., 2006).

Uma alternativa que poderia minimizar as questões acima citadas é a *criopreservação de oócitos maduros* (JAIN e PAULSON., 2006). Essa abordagem tem sido bastante utilizada por mulheres adultas que por vários motivos, profissionais ou pessoais, adiaram a sua maternidade e estão preocupadas com o declínio da fertilidade relacionado com o avanço da idade (LEVINE *et al.*, 2015). Diferentemente da criopreservação de embriões, a criopreservação dos oócitos não necessita da participação do material biológico germinativo masculino (ARGYLE *et al.*, 2016). No entanto, da mesma forma que a criopreservação de embriões, essa técnica precisa de uma estimulação hormonal, exigindo que o indivíduo seja sexualmente maduro. No caso de mulheres acometidas pelo câncer essa também não é uma possibilidade viável, pois pode ser contraindicada devido à biologia do tumor (GONZÁLEZ *et al.*, 2011) ou devido ao risco do aparecimento da síndrome de hiperestimulação ovariana, que pode representar um perigo para a saúde da paciente, além de atrasar a terapia contra o câncer (MAHAJAN., 2015).

Finalmente, uma alternativa que tem recebido destaque é a *criopreservação do tecido ovariano*, pois comparada com a criopreservação de embriões e oócitos, não requer nenhum tratamento hormonal (RODRIGUEZ-WALLBERG *et al.*, 2016) que retarde o início do tratamento anticâncer, pode ser realizada em qualquer fase da vida reprodutiva do indivíduo, é a única alternativa para a preservação da fertilidade de meninas prepúberes que estão em risco de falência ovariana prematura devida à terapia contra o câncer (LADANYI *et al.*, 2017) e pode salvar não apenas a fertilidade e função gonadal

(LAMBERTINI *et al.*, 2015), bem como proteger à mulher de consequências indesejáveis de natureza psicológica.

Essa técnica tem como finalidade a preservação dos folículos pré-antrais, os quais estão localizados no córtex ovariano e representam a reserva principal de gametas femininos. No caso das pacientes em que o câncer leva à metástase, existe o risco de reintrodução de células cancerosas através do transplante de tecido previamente criopreservado (AUBARD *et al.*, 2001). Com a finalidade de evitar esse risco, o xenotransplante (transplante de tecidos ou órgãos entre diferentes espécies) de tecido ovariano criopreservado foi demonstrado como uma boa escolha (DITTRICH *et al.*, 2015). Outra alternativa é, após o armazenamento, estes folículos pré-antrais podem ser cultivados *in vitro*, um procedimento que não só serve como ferramenta essencial para avaliar o processo de criopreservação (DONNEZ *et al.*, 2006; FAUSTINO *et al.*, 2011; ROSENDAHL *et al.* 2011, LUNARDI *et al.*, 2013), mas também suporta o crescimento e o desenvolvimento folicular (ARAÚJO *et al.*, 2014). Aqueles folículos pré-antrais provenientes do tecido ovariano criopreservado com subsequente maturação e fertilização *in vitro* (WANG *et al.*, 2011) podem ser utilizados com sucesso evitando a reintrodução de células cancerosas (LUNARDI *et al.*, 2013). Um resumo das principais vantagens e desvantagens das opções disponíveis para a preservação da fertilidade feminina pode ser encontrado no quadro abaixo.

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens da criopreservação de diferentes materiais biológicos para a preservação da fertilidade feminina.

Material	Vantagens	Desvantagens
Embriões	Amplamente testado clinicamente	Precisa de células germinativas masculinas e de estimulação hormonal, além do atraso no tratamento.
Oócitos	Não precisa de células germinativas masculinas	Precisa de estimulação hormonal e pode atrasar no tratamento.
Tecido ovariano	Não precisa da maturidade sexual, células germinativas masculinas e estimulação hormonal. Não há atraso no tratamento.	Existe o potencial de reintroduzir células cancerosas.

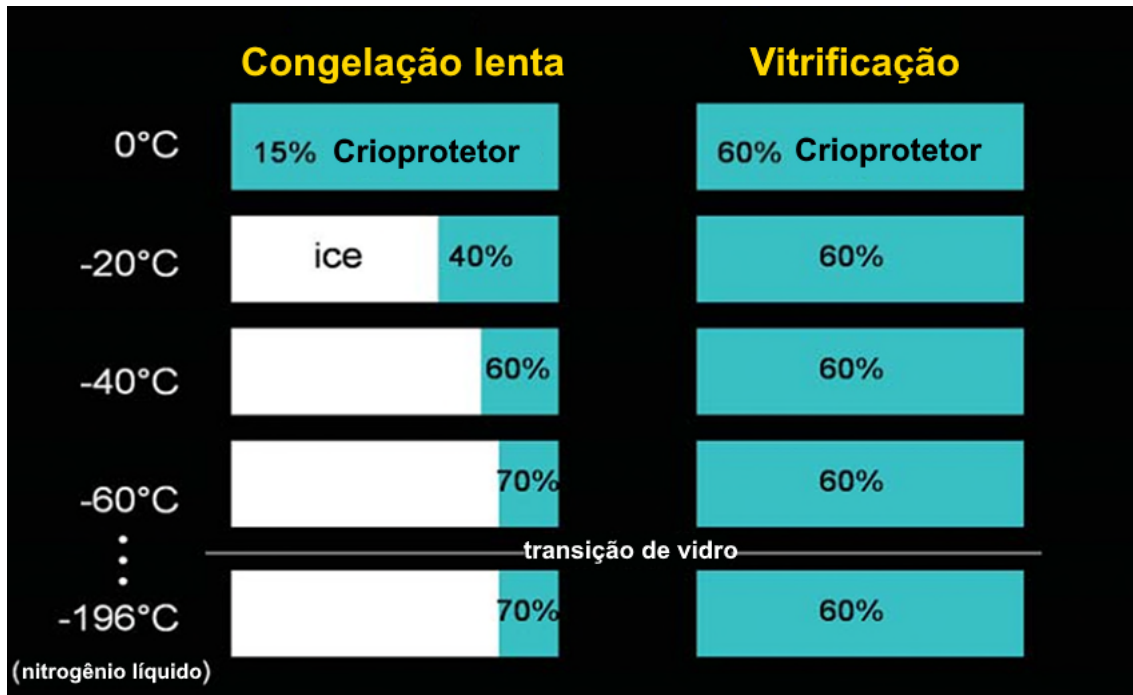
Embriões: Rienzi *et al.*, 2017; oócitos: Argyle *et al.*, 2016; tecido ovariano: Ladanyi *et al.*, 2017.

Fonte: Elaborada pelo autor

2.1.2. Métodos de criopreservação

A criopreservação de tecido ovariano pode ser realizada por dois métodos, isto é, a congelação lenta e a vitrificação. Independentemente do método utilizado, a criopreservação baseia-se em cinco etapas fundamentais: 1) *exposição aos ACPs*, com a finalidade de permitir a difusão desses agentes nos compartimentos celulares; 2) *resfriamento com redução da temperatura de forma gradual (congelação lenta) ou súbita (vitrificação)*, na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica; 3) *armazenamento ou estocagem*, permitindo a preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos; 4) *descongelação ou aquecimento*, etapa na qual ocorre o resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular; e 5) *diluição ou remoção dos ACPs*, a fim de evitar, na presença de temperatura fisiológica ou ambiente, a produção de metabólitos secundários, o que intensificaria a ação tóxica destes aditivos (RODRIGUES., 2003). Na Figura 1, pode-se observar uma comparação entre os dois métodos de criopreservação, a congelação lenta e a vitrificação.

Figura 1 - Congelação lenta versus vitrificação. A maior concentração de agentes crioprotetores (azul) junto com o resfriamento ultra-rápida permitem à vitrificação evitar a formação de cristais de gelo (branco) em comparação com a congelação lenta. A congelação lenta tem um menor espaço intracelular coberto pelos ACPs acrescentando o espaço coberto pelos cristais de gelo



Fonte: Adaptado de Wowk *et al.*, 2007

2.1.2.1 Congelação lenta

A congelação lenta é caracterizada pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações do ACP (~1,5 mol/l), por um período que pode variar de 20 a 60 minutos. Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de 2°C/min até -4 a -9°C, mantendo-se nesta temperatura por um curto período (10 a 15 min) para a estabilização térmica e realização do *seeding*, o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular. Em seguida, a amostra continua sendo resfriada lentamente a uma velocidade de 0,3°C/min. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80°C), o material é estocado em nitrogênio líquido (-196°C) (RODRIGUES., 2003).

Durante o processo de baixa da temperatura, num momento dado da etapa de resfriamento, massas de gelo contendo água pura e cristalina irão se formar. O aumento da força osmótica causa o efluxo de água para minimizar a possibilidade de formação de gelo intracelular. Uma consequência é que os solutos intracelulares também concentram-se relatando a importância da permeabilidade dos agentes crioprotetores utilizados (FULLER *et al.*, 2004).

Já foram relatados na literatura vários trabalhos apresentando resultados satisfatórios que utilizam a congelação lenta como método de criopreservação de tecido

ovariano em diferentes espécies como, murinos (WANG *et al.*, 2009); primatas humanos (CALLEJO *et al.*, 2013; REVELLI *et al.*, 2013; DONNEZ e DOLMANS., 2014) e não humanos (BORMAN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 2004 a, b; FIGUEIREDO *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2015); ovinos (SALLE *et al.*, 2003; MILENKOVIC *et al.*, 2011; SAMARTZI *et al.*, 2015); suínos (BORGES *et al.*, 2009) e bovinos (CASTRO *et al.*, 2014). Além disso, na espécie humana, desde o início do ano 2000, vários estudos têm reportado o nascimento de indivíduos saudáveis após o transplante de tecido ovariano previamente congelado (DONNEZ *et al.*, 2004; MEIROW e LEVRON., 2005; SUZUKI *et al.*, 2015).

Apesar desse método ser amplamente difundido, a formação de cristais de gelo intracelulares, que pode ocorrer durante a realização desse processo, representa um grande desafio a ser vencido, tendo em vista que esse fenômeno é um dos principais responsáveis por danos celulares irreversíveis durante a criopreservação (CARVALHO *et al.*, 2011). Além disso, a sua aplicação em programas de reprodução assistida apresenta um custo relativamente alto devido à necessidade de equipamentos sofisticados. Portanto, acreditamos ser necessário explorar outras alternativas de criopreservação, como por exemplo, o método de vitrificação.

2.1.2.2. Vitrificação

A vitrificação refere-se a um processo físico, no qual ocorre a passagem de uma solução líquida para formar um estado vítreo similar ao vidro (FULLER *et al.*, 2004). Isso ocorre não pela formação de gelo, mas pela elevação extrema da viscosidade durante o processo de resfriamento (FAHY *et al.*, 1984). Enquanto ocorre o congelamento à temperaturas ultrabaixas, água em estado líquido atingirá uma temperatura de transição vítrea na qual ocorrerá a mudança da fase líquida para a fase sólida. No estado vítreo, a solução ainda é tecnicamente um líquido, mas está muito fria para fluir. Certamente, durante o congelamento às temperaturas mais baixas, as moléculas estarão na mesma desorganização quanto estariam no estado líquido, porém as propriedades físicas deste “líquido” são comparáveis às de um sólido. Portanto, as moléculas são mantidas no mesmo padrão ao longo do processo. O “líquido sólido” obtido é definido como um vidro (BROCKBANK *et al.*, 2003). Para atingir este objetivo, altas concentrações de ACPs são utilizadas de modo a aumentar a viscosidade da solução. Após a formação do estado vítreo, o material biológico criopreservado neste ambiente, deve ser armazenado em

nitrogênio líquido até o momento do aquecimento, o qual deve ser realizado de forma rápida à temperatura ambiente no intuito de evitar a formação de cristais de gelo (RALL *et al.*, 1985).

Frente à congelação lenta, a vitrificação tem como principais vantagens a não utilização de aparelhos especializados diminuindo os custos e a redução do tempo de processamento. Além disso, apresenta menos danos durante o resfriamento, visto que as amostras passam rapidamente pelos intervalos mais críticos de temperatura, ou seja, 15°C e - 5°C (WOWK *et al.*, 2000). Essas características têm tornado a vitrificação uma alternativa bastante promissora para a criopreservação de tecido ovariano, o que resultou em estudos sobre a vitrificação de ovário humano (GANDOLFI *et al.*, 2006; KEROS *et al.*, 2009 AMORIM *et al.*, 2011; GLUJOVSKY *et al.*, 2014, SANFILIPPO *et al.*, 2015; LADANYI *et al.*, 2017), bem como em outras espécies (bovino: ZHOU *et al.*, 2014; murino: ORYAN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2009; caprino: CARVALHO *et al.*, 2014; primata: AMORIM *et al.*, 2013; TING *et al.*, 2012, 2013; ovino: LUNARDI *et al.*, 2015). Destaque-se que já existem registros de nascimentos, provenientes de tecidos vitrificados, seguidos do transplante em murinos (WANG *et al.*, 2009), ovinos (BORDES *et al.*, 2005) e seres humanos (SUZUKI *et al.*, 2015).

Desde a primeira descrição do processo de vitrificação feita por Luyet em 1940, diversas técnicas e protocolos têm sido formulados visando a obtenção de uma solução de vitrificação ideal ou que garanta a manutenção da estrutura normal e funcional do ovário o mais semelhante possível ao tecido ovariano não vitrificado. Para isso, várias técnicas de vitrificação têm sido desenvolvidas, as quais estão didaticamente, divididas em três grupos: **1)** as que têm contato direto com o nitrogênio líquido (N₂) (vitrificação em palheta aberta estendida – OPS); **2)** as que têm contato com o vapor de N₂ (vitrificação em superfície sólida - SSV) e **3)** as que não têm contato com o N₂ (uso de sistemas fechados como o OTC, Ovarian Tissue Cryosystem, entre outros). Esta última previne uma possível contaminação das amostras pelo contato com microrganismos resistentes às temperaturas criogênicas do N₂ (BIELANSKI *et al.*, 2000, 2003).

Seguindo essa lógica, estudos da equipe do Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) resultaram na variação da técnica de vitrificação em superfície sólida, que está classificada dentro das técnicas que têm contato com o N₂. Essa nova técnica utiliza um dispositivo denominado *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC). Esse dispositivo é uma estrutura cilíndrica composta por três estruturas: uma base, um inserto e uma tampa; que juntos formam um dispositivo

totalmente fechado, evitando contato do tecido com o N₂ durante a vitrificação e melhorando a troca de calor. Além disso, o OTC permite a vitrificação de vários fragmentos ao mesmo tempo, bem como a realização de todas as etapas do processo em um mesmo dispositivo (CARVALHO *et al.*, 2013). BANDEIRA *et al.* (2015) comparou a vitrificação utilizando este dispositivo OTC com outro método de vitrificação já estabelecido, vitrificação em superfície sólida. Eles obtiveram resultados semelhantes após cultivo *in vitro* por 7 dias, no tocante à morfologia folicular (35%) utilizando o protocolo de vitrificação com o OTC quando comparado com o método de vitrificação de superfície sólida convencional (22%) utilizado por Lornage *et al.* (2006), porém estatisticamente diferentes do controle fresco (53%).

Apesar da vitrificação ser um método que apresenta vantagens comparado com a congelação lenta, também enfrenta desafios e altos riscos de toxicidade referentes à necessidade de utilização de altas concentrações de ACPs (AMORIM *et al.*, 2011).

2.1.3. Agentes crioprotetores

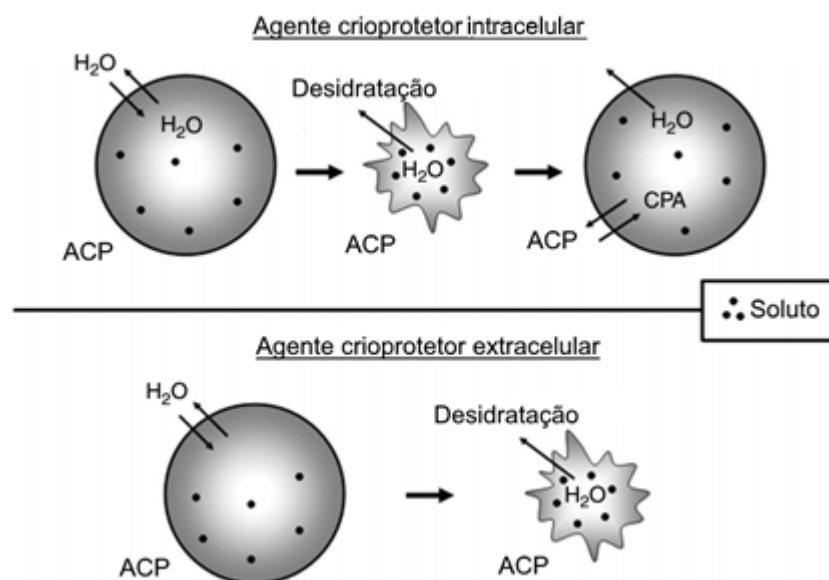
Os ACPs são classificados como substâncias orgânicas e têm a função de proteger a célula ou tecido contra desidratação e danos causados pela redução extrema da temperatura assim como durante o aquecimento (SANTOS *et al.*, 2008). Dependendo da sua capacidade de penetração celular, os ACPs podem ser classificados como intracelulares ou extracelulares (MAKAREVICH *et al.*, 2010) e agem por diferentes mecanismos. Na Figura 2 podem ser observadas as diferenças no mecanismo de ação dos ACPs intracelulares e extracelulares.

Os *ACPs intracelulares* ou *penetrantes* são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na membrana celular por meio de difusão passiva (CASTRO *et al.*, 2011). Após a penetração, podem permanecer na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes extracelulares, atuam na desidratação celular por meio do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células (CASTRO *et al.*, 2011). Contudo, a eficiência destes ACPs pode variar em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada, bem como da espécie utilizada e do método de criopreservação empregado. O mecanismo de ação geral dos ACPs intracelulares é baseado na substituição parcialmente da água no interior da célula ligando-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, aumentando a viscosidade da solução de congelação, conseqüentemente, reduzindo o

ponto de congelação da mesma. Além disso, os ACPs também agem prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos (FULLER *et al.*, 2004). Para a criopreservação do tecido ovariano em diferentes espécies utiliza-se mais comumente o dimetilsulfóxido (DMSO), propanediol (PROH) ou etilenoglicol (EG), uma vez que estes ACPs possuem alta solubilidade, rápida penetrabilidade e levam a menores danos osmóticos (AMORIM *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2010).

Os **crioprotetores extracelulares** ou **não penetrantes** são moléculas com grande peso molecular que não conseguem atravessar a membrana plasmática. Dentre eles podemos citar os açúcares como a sacarose, a rafinose, a trealose, entre outros. Esses agentes agem principalmente pelo aumento da osmolaridade do espaço extracelular, que resulta no efluxo de água intracelular e, conseqüentemente, reduzindo a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares (CHIAN e QUINN, 2010). Adicionalmente esses crioprotetores protegem a membrana celular por intermédio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos membranários (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987). Alguns ACPs extracelulares como a sacarose e a trealose são inclusos nos protocolos de aquecimento porque agem como um tampão osmótico contra o estresse causado durante a adição e remoção dos ACPs intracelulares. A sacarose é utilizada com frequência nos protocolos de vitrificação de tecido ovariano em diferentes espécies, tanto durante a vitrificação como durante o aquecimento, apresentando resultados satisfatórios (RODRIGUES *et al.*, 2004a,b; SANTOS *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2013; 2014; BANDEIRA *et al.*, 2015; TANPRADIT *et al.*, 2015; JIMENEZ *et al.*, 2016). Atualmente, em nosso laboratório temos utilizado uma solução de vitrificação (SV) para o tecido ovariano na qual é adicionada a sacarose como ACP extracelular. Utilizando esse açúcar na SV, a percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais após a vitrificação tem variado de 55% (CARVALHO *et al.*, 2014) a 58% (CARVALHO *et al.*, 2013), sendo de apenas 36% após o cultivo *in vitro* do tecido. O fato de obter um percentual abaixo de 60% após os procedimentos de vitrificação seguida ou não de cultivo *in vitro* é um indicativo da necessidade de aperfeiçoar os protocolos de vitrificação e cultivo *in vitro*. Nesse sentido, o uso de macromoléculas como polímeros sintéticos, vem sendo incluídos como aditivos ou ACPs extracelulares, sendo uma alternativa viável para atingir esse objetivo.

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ação dos ACPs. Os ACPs intracelulares agem principalmente no interior da célula, substituindo a água intracelular e promovendo a desidratação, enquanto os ACPs extracelulares aumentam a osmolaridade do espaço extracelular, promovendo a saída de água do espaço intracelular



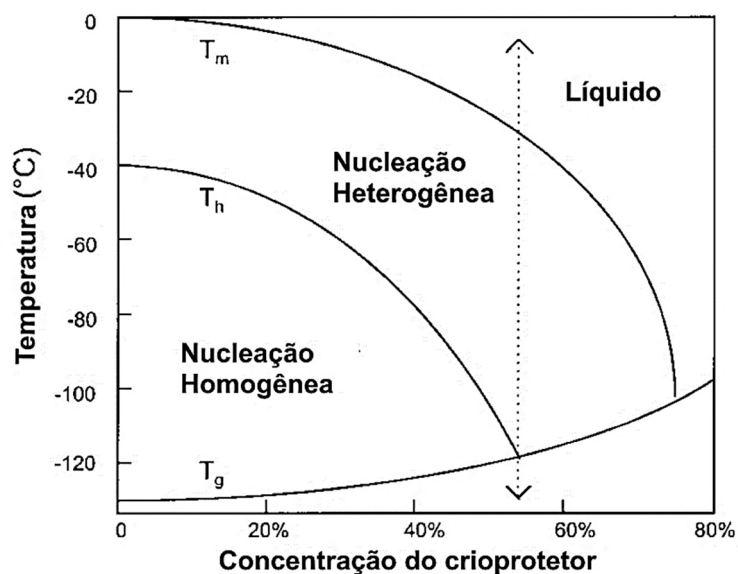
Fonte: Adaptado de CHIAN e QUINN., 2010

2.1.4. Polímeros sintéticos

Com o intuito de superar os desafios anteriormente descritos, outros ACPs extracelulares, conhecidos como polímeros sintéticos, têm sido utilizados, atualmente (KEROS *et al.*, 2009; HASHIMOTO *et al.*, 2010; TING *et al.*, 2012, 2013; MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2014). Esses polímeros são análogos sintéticos das glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) encontradas em peixes e insetos que habitam em baixas temperaturas (TING *et al.*, 2012). As AFGPs agem principalmente pela depressão do ponto de congelamento mediante um processo conhecido como histerese térmica que deixa o ponto de fusão de equilíbrio inalterado (DELLER *et al.*, 2013). Como pode ser observado na Figura 3, a redução do ponto de congelamento até aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, elimina a nucleação ou formação de cristais de gelo. Isso é possível principalmente pela inativação dos nucleadores heterogêneos que são os principais responsáveis pela

formação de gelo durante os estágios iniciais do processo de vitrificação (WOWK *et al.*, 2000).

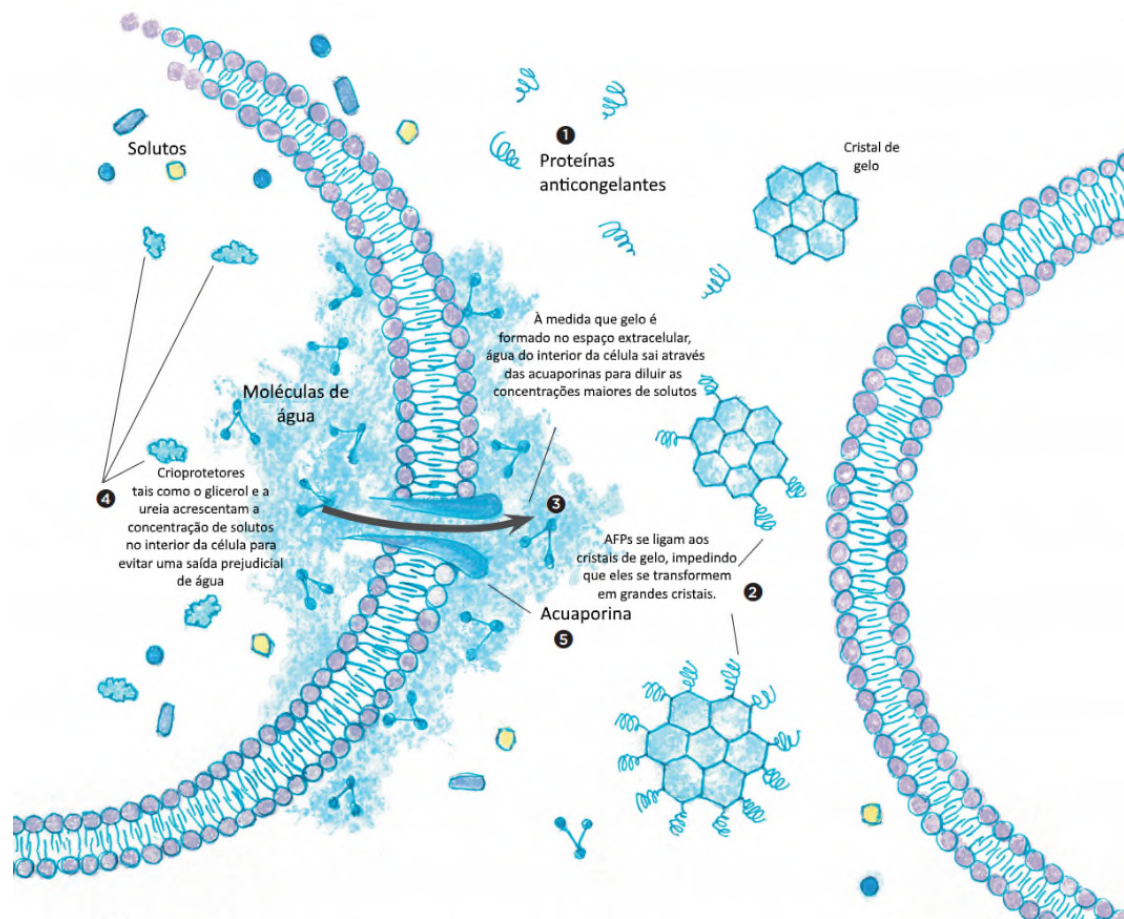
Figura 3 - Nucleação homogênea e heterogênea durante o processo de resfriamento. Observa-se que a partir dos $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o único responsável pela formação do gelo é a água pura devido à nucleação homogênea



Fonte: Adaptado de Wowk *et al.*, 2000

Durante a fase de nucleação homogênea, ou seja, a partir dos $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, o único responsável pela formação do gelo seria a presença de água, que é continuamente substituída pelos ACPs intracelulares, passando por canais proteicos transmembrana denominados aquaporinas e evitando assim a formação de gelo intracelular. Na Figura 4 podemos observar o fluxo de água e fluidos através da membrana celular (DENKER *et al.*, 1988) auxiliado pelas aquaporinas. Existem mais de 10 tipos de AQP, em diferentes órgãos e espécies, mas são as aquagliceroporinas, como a AQP3, as que apresentam um poro de diferente tamanho e maior permeabilidade à água, glicerol, uréia e outros solutos como os ACPs, pelo qual a presença delas representa um importante achado no material criopreservado (SALES *et al.*, 2013).

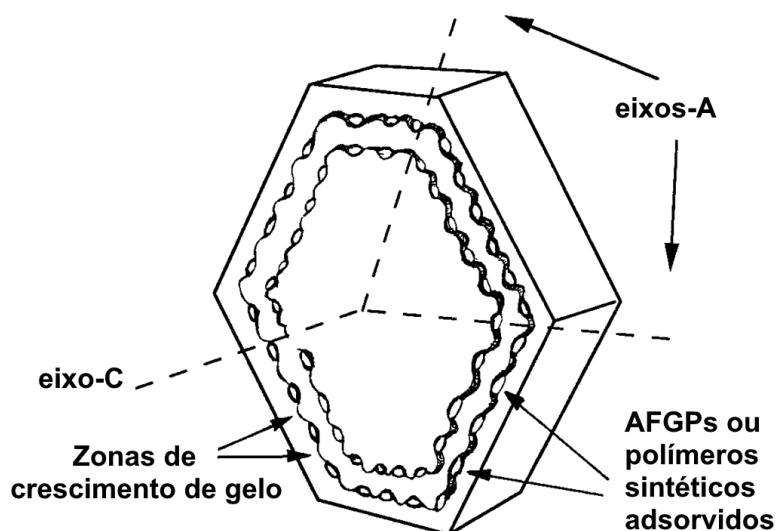
Figura 4 - Representação esquemática dos mecanismos de crioproteção. 1,2 . Ação das proteínas anticongelantes nos cristais de gelo eliminando a nucleação heterogênea. 3. Ação das aquaporinas na saída de água intracelular e 4. Ação dos ACPs intracelulares removendo a água intracelular e eliminando a formação de cristais de gelo.



Fonte: Adaptado de <https://goo.gl/ZEx6Jx>

Após o processo de vitrificação e durante o aquecimento acontece um fenômeno denominado “devitrificação”, que consiste na formação de cristais de gelo a partir dos pontos de nucleação gerados durante o processo de vitrificação (WOWK e FAHY, 2007). Os polímeros sintéticos combatem esse problema pela sua afinidade aos eixos “a” e “c”, nos quais os cristais de gelo são formados e conseqüentemente eliminando sua geração (ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN., 2000), como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Zonas de crescimento de gelo, eixos principais onde os polímeros sintéticos e AFGPs são adsorvidos



Fonte: Adaptado de ZACHARIASSEN e KRISTIANSEN., 2000

Atualmente existem vários polímeros sintéticos incluindo um copolímero do álcool polivinílico (PVA) e acetato denominado SuperCool X-1000, um copolímero de poliglicerol denominado SuperCool Z-1000 e a polivinilpirrolidona (PVP K-12) (FAHY *et al.*, 2004). Trabalhos têm relatado resultados positivos com a adição desses componentes nos protocolos de vitrificação de embriões (CABRITA *et al.*, 2006; BADRZADEH *et al.*, 2010; MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2014) e oócitos (ZHOU *et al.*, 2010; MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2012; CURCIO *et al.*, 2014) em diferentes espécies. A adição do SuperCool X-1000, em baixas concentrações (0.0001%) pode reduzir a quantidade necessária de ACPs intracelulares em 3%, que embora seja um baixo percentual, os benefícios relacionados à da redução da toxicidade são notáveis (WOWK *et al.*, 2005). O SuperCool Z-1000 é um bloqueador de gelo específico para inativar os agentes nucleadores heterogêneos e que pode ser utilizado junto ao SuperCool X-1000 (WOWK *et al.*, 2002). A polivinilpirrolidona (PVP K-12) é uma macromolécula que vem sendo utilizada com sucesso em protocolos de desenvolvimento de oócitos em bovinos (HIRAO *et al.*, 2004) e suínos (HASHIMOTO *et al.*, 2007). No total, essas propriedades dos polímeros sintéticos, já levaram à preservação da foliculogênese em trabalhos de criopreservação de tecido ovariano de primatas. HASHIMOTO *et al.* (2010) mostraram que após a vitrificação de tecido ovariano de macaco-cinomoigo utilizando polímeros sintéticos, a morfologia dos folículos pré-antrais foi conservada quando comparado aos tratamentos sem polímeros sintéticos. Por outro lado, TING *et al.* (2012, 2013),

conseguiram que folículos secundários fossem capazes de crescer e produzir esteroides, além de proteger a sua morfologia *in vitro*. Apesar dos resultados promissores descritos na literatura, ainda não existem relatos acerca da utilização de polímeros sintéticos nos protocolos de vitrificação de tecido ovariano caprino.

2.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO

Os parâmetros de análise escolhidos para avaliar a qualidade após a vitrificação/aquecimento dependem da estrutura criopreservada, sendo aqueles que se baseiam na preservação da morfologia e da viabilidade folicular os mais recorrentes (FAUSTINO *et al.*, 2011).

A histologia clássica, considerada de baixo custo e fácil execução, tem sido largamente utilizada para análise da morfologia folicular por ser um método quantitativo, no qual um grande número de folículos pode ser avaliado. Esta técnica permite identificar sinais característicos de atresia folicular, como a picnose nuclear, danos citoplasmáticos, desorganização das células da granulosa e danos na membrana basal (LUNARDI *et al.*, 2012).

Técnicas como imunohistoquímica são utilizadas para avaliar a presença de algumas proteínas nos folículos e as células do estroma ovariano após criopreservação. O antígeno Ki-67 é um antígeno nuclear expressado em todas as fases do ciclo celular exceto a fase G0, portanto os níveis de Ki-67 refletem a atividade de divisão celular (HADAR *et al.*, 2005). Apesar de que o estado e localização da proteína Ki-67 durante o ciclo celular não é homogênea, isso não tem afetado substancialmente a sua habilidade para identificar a população de células em proliferação em comparação com outros marcadores de proliferação (URRUTICOECHEA *et al.*, 2005).

Ainda com relação ao aspecto funcional da célula, também é importante a detecção por imunohistoquímica dos canais de água como a AQP3 presente na membrana plasmática. Portanto, considerando que essa proteína é responsável não somente pelo fluxo de água, bem como de solutos como os ACPs através da membrana celular, a imunodeteção dessa proteína representa um importante achado no material criopreservado (SALES *et al.*, 2013).

Paralelamente às análises de normalidade da estrutura morfológica e funcional do folículo (ativação folicular e proliferação de células da granulosa), é importante também

avaliar as perdas foliculares resultantes do processo de apoptose, conhecida também como morte celular programada. Sob o aspecto bioquímico, a apoptose é caracterizada pela fragmentação da fita de DNA a cada 180 a 200 pares de base, enquanto que, morfológicamente é caracterizada pela condensação da cromatina (picnose celular), perda de volume celular e formação de corpos celulares condensados. Essas estruturas são conhecidas como corpos apoptóticos. Para realizar a avaliação da apoptose pode-se lançar mão da imunodeteção da Caspase-3 ativada (FAUSTINO *et al.*, 2011). Essa caspase-3 é uma das principais enzimas executores da apoptose, sendo responsável, parcial ou totalmente, pela clivagem proteolítica de muitas proteínas-chave, como a enzima nuclear poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que são clivadas em muitos sistemas diferentes durante a apoptose (COHEN., 1997).

Dentre os possíveis danos que a criopreservação pode acarretar, o estresse oxidativo é apontado geralmente como o responsável por consideráveis perdas foliculares (AGARWAL *et al.*, 2005). As espécies reativas de oxigênio (ROS) em grandes quantidades são as principais responsáveis pela presença desse fenômeno, provocando direta ou indiretamente, danos às proteínas, lipídios e DNA do material biológico criopreservado (FAUSTINO *et al.*, 2011). Desta forma, o estresse oxidativo é um fator importante a ser avaliado. O método espectrofluorimétrico (LOETCHUTINAT *et al.*, 2005), utilizando o ensaio de diacetato de 2', 7'-diidrodiclorofluoresceína (DCFH-DA) já tem sido utilizado para avaliar os níveis de ROS no tecido ovariano de caprinos (CARVALHO *et al.*, 2014) com uma excelente aceitação.

Finalmente, o cultivo *in vitro* também é uma ferramenta importante para avaliar a eficiência da criopreservação, uma vez que lesões foliculares não detectadas após a descongelação ou aquecimento podem evoluir e serem manifestadas após um período de incubação. Na literatura, tem sido observado que quanto maior o período de cultivo, maior é a diferença entre o percentual de folículos viáveis oriundos de tecido apenas criopreservado (65%) e criopreservado seguido de cultivo *in vitro* (36,5%), como se pode observar na espécie ovina (LUNARDI *et al.*, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o câncer em alguns casos tem se tornado uma doença curável, apresentando uma expectativa de 10.3 milhões de mulheres sobreviventes até 2026 (American Cancer Society, 2016). Mais de 80% das mulheres jovens sobreviverão a essa

doença devido a tratamentos mais avançados e mais agressivos (LADANYI *et al.*, 2017). Entretanto, essas terapias são gonadotóxicas e comprometem a saúde a longo-prazo e a função reprodutiva, caracterizada pela falha ovariana prematura e posterior infertilidade (LEVINE *et al.*, 2015). Portanto, visando preservar a fertilidade feminina, vários especialistas (SANFILIPPO *et al.*, 2015; LADANYI *et al.*, 2017) tem indicado para as pacientes a criopreservação de tecido ovariano para posterior transplante após a remissão da doença. A criopreservação de tecido ovariano tem sido considerada uma estratégia promissora, pois é a única opção viável para crianças e mulheres jovens. Recentemente, foi reportado na literatura o nascimento de 2 indivíduos provenientes de 2 mulheres com história de falência ovariana e que foram submetidas a vitrificação de tecido ovariano seguida de transplante (SUZUKI *et al.*, 2015).

Embora a congelação ainda seja o métodos de escolha por diversos investigadores, a vitrificação é um método promissor para a criopreservação de ovário, pois apresenta uma menor chance de formação de cristais de gelo, o qual é a principal causa de danos durante o processo de criopreservação. No entanto, vários estudos ainda têm mostrado a necessidade de aperfeiçoar o protocolo visando a obtenção de melhores resultados, como por exemplo, um maior percentual de sobrevivência e desenvolvimento folicular após o transplante ou mesmo após o cultivo *in vitro* (TING *et al.*, 2013). Com base nisso, alguns pesquisadores têm proposto a adição de polímeros sintéticos nas soluções de vitrificação.

Dentre os polímeros sintéticos, pode-se mencionar o PVA ou SuperCool X-1000, o copolímero de poliglicerol ou SuperCool Z-1000 e a polivinilpirrolidona (PVP K-12), os quais foram desenvolvidos por FAHY *et al.* (2004). A utilização de polímeros sintéticos em conjunto com os ACPs intracelulares no processo de vitrificação promove a redução da formação de gelo e a inibição da recristalização celular levando a melhoras na preservação morfológica e funcional dos folículos pré-antrais como já foi demonstrado em primatas (HASHIMOTO *et al.*, 2010; TING *et al.*, 2012, 2013). Desta forma, neste trabalho, esses polímeros serão empregados na solução de vitrificação de tecido ovariano caprino.

A espécie caprina foi escolhida por ser um excelente modelo translacional para a espécie humana. O ovário, os folículos ovarianos, bem como o processo de foliculogênese é similar entre ambas as espécies. Portanto, considerando essas características comuns entre os ovários da mulher e da cabra, bem como as questões éticas que envolvem a experimentação na espécie humana, acreditamos que as informações obtidas com ovários de cabras, poderão ser extrapoladas para o ovário humano. Além disso, a espécie caprina

é de grande relevância econômica e social como fonte proteica para várias regiões do país, especialmente no Nordeste do Brasil.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

O protocolo atual de vitrificação de tecido ovariano de cabras pode ser aperfeiçoado pela adição dos polímeros sintéticos (Super Cool X-1000, SuperCool Z-1000 e PVP K-12) na solução de criopreservação.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Avaliar o efeito dos polímeros sintéticos (Super Cool X-1000, SuperCool Z-1000 e PVP K-12) como ACPs extracelulares na vitrificação de tecido ovariano caprino.

5.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfologia e o desenvolvimento folicular após a vitrificação do tecido ovariano (Histologia clássica);
- Avaliar a proliferação celular (Ki-67), apoptose (Caspase-3) e a presença de canais de água (aquaporina-3) (Imunohistoquímica);
- Mensurar os níveis de ROS no meio de cultivo in vitro (Fluorescência).

6 CAPÍTULO 1**Use of synthetic polymers improves the quality of
vitrified caprine preantral follicles in the ovarian tissue**

Uso de polímeros sintéticos melhora a qualidade de folículos pré-antrais caprinos vitrificados no tecido ovariano

Artigo submetido ao periódico: Small Ruminant Research

Em: Junho de 2017

Qualis: B1

**Use of synthetic polymers improves the quality of vitrified caprine preantral
follicles in the ovarian tissue**

D.A. Montano-Vizcarra¹, Y. Pinto Da Silva¹, J.B. Bruno¹, D.C.C. De Brito¹, B.G. Alves², D.J. Dípaz-Berrocal¹, L.M. Silva¹, M.L.G. dos Santos¹, K.A. Alves², F. W. Santos³, J.R. Figueiredo¹, A.P.R. Rodrigues^{1*}

¹Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

²Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

³Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil.

*Correspondence should be addressed to: aprrdriguespapers@gmail.com
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV).
Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais
(LAMOFOPA). Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Paranjana,
1700, Campus do Itaperi. Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60740 903 Tel.:
+55.85. 3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840
E-mail address: aprrdriguespapers@gmail.com

Abstract

Ovarian tissue vitrification is an alternative for fertility preservation in human female cancer patients that are at risk of premature ovarian failure. However, there is always the need for further improving the protocol used for vitrifying this biological material. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the addition of synthetic polymers to the vitrification solution affected follicular morphology and development, reactive oxygen species (ROS) levels and the expression of proteins related to cell proliferation (Ki-67), water channels (Aquaporin-3 or AQP3) and apoptosis (activated Caspase-3) in ovarian tissue of the caprine species, which are known to be excellent translational models for the human being. Regarding the methodology, caprine ovaries were obtained from local abattoirs and transported to the laboratory within one hour. Once there, they were stripped of the surrounding fat and fibrous tissue and the ovarian cortex from each ovarian pair was cut into small fragments ($n = 12$; $1 \times 1 \times 0,5$ mm) using a Tissue Slicer® (Thomas Scientific) under sterile conditions. Only those fragments with a considerable number of preantral follicles were considered and distributed randomly between the groups. Two fresh fragments were fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA) for 2 hours at 37 °C and named as *Fresh Control*, while other two were *in vitro* cultured for 7 days and considered as *Cultured Control*. The remaining fragments ($n = 8$) were distributed in four different vitrification conditions (2 fragments/condition): 1) Vitrification with the addition of *sucrose*; 2) Vitrification with the addition of *SuperCool X-1000* 0.2 %; 3) *SuperCool Z-1000* 0.4 % or 4) *PVP K-12* 0.2 %, totaling four experimental treatments. All vitrification solutions included the antioxidant catalase. Cultured Control and vitrified treatments were destined for *in vitro* culture for 7 days. Morphologically, the treatment with SuperCool X-1000 showed no significant difference with the Fresh Control group and was superior to the other treatments. Regarding follicular development, all vitrified and *in vitro* cultured fragments maintained the percentage of developing follicles similar to the Fresh Control, except the one vitrified with SuperCool Z-1000 that showed a significant reduction in the follicular development percentages after 7 days of culture. Regarding the proliferation analysis, only the Fresh Control showed Ki-67-positive granulosa cells while they were absent in the other treatments. The strongest AQP3 labels were found in the SuperCool X-1000 treatment in all follicular categories evaluated except for the oocyte compartment of the secondary follicles. Concerning the activated caspase-3 analysis, there were no statistically significant differences between treatments. ROS

levels were the same for all the cultured treatments. In conclusion, we have demonstrated that the vitrification with the synthetic polymer SuperCool X-1000 maintained the follicular morphology similar to the observed in the fresh tissue, in other words, follicles vitrified with this synthetic polymer could resist better the stress suffered during this process. Also, the ROS results suggest that the interaction between SuperCool X-1000 and catalase could help reduce the oxidative stress that can lead to injuries to the follicles.

Keywords: ovarian tissue, synthetic polymer, in vitro culture, SuperCool X-1000.

1. Introduction

The cryopreservation of ovarian tissue has received clinical relevance due to its utility in the developing of new strategies to restore the fertility in women who are at risk of premature ovarian failure (Suzuki et al., 2015; Ladanyi et al., 2017). The storage at ultra-freeze temperatures allows the preservation of a small ovarian fragment that contains a large number of oocytes included in preantral follicles that could potentially help to restore the ovarian function when intended (Isachenko et al., 2007). After this storage, the preantral follicles on ovarian tissue could be *in vitro* cultured, a procedure that not only serves as an essential tool to evaluate the cryopreservation process (Donnez et al., 2006; Faustino et al., 2011; Rosendahl et al., 2011; Lunardi et al., 2013) but also supports the follicular growth and development (Araújo et al., 2014).

Regarding the cryopreservation procedure, although many studies report slow freezing as the method of choice, the vitrification technique could be an excellent option due to its capacity of avoiding the formation of intracellular ice crystals by the conversion of a system from a fluid to an amorphous vitreous state by increasing the solution viscosity during cooling (Fahy et al., 1984, 2004; Amorim et al., 2012). However, this process requires the use of ultra-rapid freezing rates that could lead to an osmotic stress in the ovarian tissue (Amorim et al., 2011). In addition, it demands the use of high

concentrations of permeating cryoprotectant agents (CPAs), substances that enter the cell through water channel proteins, known as aquaporins, and act by removing the intracellular water to prevent ice crystal formation (Sales et al., 2013), such as the AQP3. Despite the toxicity risk associated with the use of high concentrations of permeating CPAs remains as the greatest obstacle (Best, 2015), their use is extremely necessary in the cryopreservation procedures. To minimize the injuries, some non-permeating CPAs (sugars) are being used in numerous cryopreservation protocols in a variety of ovarian tissues across a wide range of species (Hovatta et al., 1996; Santos et al., 2006; Zhang et al., 2009; Carvalho et al., 2011; Tanpradit et al., 2015; Jimenez et al., 2016).

The idea behind the use of sugars (glucose, sucrose, trehalose, etc.) as additives in the cryopreservation protocols with the intention of reducing the cryoinjuries came from the fact that some of these substances are naturally used by various species of plants and animals as a mechanism of protection from extreme cold climates (Crowe and Crowe., 2000). It is important to note that several sugars provide different levels of protection during cryopreservation and this can vary depending on media composition and cooling conditions. These differences may depend, in part, on the differential effects of specific sugars on raising the glass transition temperature of vitrification solutions (Kuleshova et al., 1999). In our laboratory, there is already a proven protocol for the vitrification of caprine ovarian tissue in which both permeating and non-permeating cryoprotectant agents are used in the vitrification solution. Using this protocol, the percentage of morphologically normal preantral follicles obtained after caprine ovarian tissue vitrification ranged from 55 % (Carvalho et al., 2014) to 58 % (Carvalho et al., 2013), with a result of 36 % after *in vitro* culture in the latter. To our understanding, these results could be improved through a protocol adjustment. That's why, the use of macromolecules

such as synthetic polymers, which have been included as additives as well as non-permeating CPAs, could be a viable alternative to achieve this goal.

Several investigators have reported that the freezing resistance of some Antarctic fishes is due to the presence of specific antifreeze proteins that bind to heterogeneous nucleators in order to avoid nascent ice crystals formation (DeVries and Wohlschlag, 1969, Knight et al., 1984; Kristiansen et al., 2005). Antifreeze proteins tend to increase viscosity of the cryoprotectant solution and also form interactions through hydrogen bonding with water thereby decreasing the propensity for ice crystal formation (Fuller, 2004). Since this discovery, many synthetic analogs like the copolymer of polyvinyl alcohol (SuperCool X-1000), polyglycerol polymer (SuperCool Z-1000) and polyvinylpyrrolidone (PVP K-12) have been produced with lower costs and proposed as additives to the vitrification solutions (Wowk et al., 2005; Amorim et al., 2011; Marco-Jiménez et al., 2014a,b). The association of synthetic polymers to vitrification solutions allows working with low concentration of permeating CPAs and consequently attenuates the chemical toxicity (Wowk et al., 2000). Additionally, by further depressing the freezing point using a process known as thermal hysteresis, they avoid the occurrence of ice recrystallization during the warming process (Wowk et al., 2000; Gibson et al., 2009; Congdon et al., 2013; Mitchell et al., 2015). Altogether, these properties have already led to some relevant results in the cryopreservation of ovarian tissue from primates (Hashimoto et al., 2010; Ting et al., 2011, 2013) and leporids (Marco-Jiménez et al., 2014). However, there are no reports of the use of synthetic polymers in the vitrification protocol of caprine ovarian tissue, which might represent an opening for the improvement of our vitrification protocol through the combination of already used permeating CPAs.

Therefore, concerning all the information above the aim of this study was to assess the effect of the addition of synthetic polymers (SuperCool X-1000, SuperCool Z-1000 e

PVP K-12) in the vitrification protocol of caprine ovarian tissue. After vitrification, the ovarian tissue was *in vitro* cultured for 7 days to analyze the morphology and development of preantral follicles. Additionally, reactive oxygen species (ROS) levels, apoptosis and immunolocalization of AQP3 were evaluated.

2. Materials and methods

This experiment was performed under the approval of the Ethics Committee for Animal Use of the State University of Ceará, registered as 2269277/2016. The permeating (ethylene glycol and dimethyl sulfoxide) and non-permeating CPAs (sucrose) were obtained from Dinâmica (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, Brazil). The synthetic polymers (SuperCool X-1000, SuperCool Z-1000 and PVP K-12) were received as a donation from 21st Century Medicine (21CM, Fontana, CA, USA) and the other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.1 Collection and transport of ovaries

Ovaries (n = 10) were collected from five adult non-pregnant cross-bred goats (*Capra hircus*) at a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed once in 70 % ethanol for 10 s and then washed twice in HEPES-buffered minimum essential medium (MEM-HEPES) supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Then, the ovaries were transported to the laboratory in MEM-HEPES at 20 °C within 1 hour after collection (Carvalho et al., 2014).

2.2 Experimental design and vitrification/warming procedures

Ovaries were stripped of the surrounding fat and fibrous tissue and the ovarian cortex from each ovarian pair was cut into small fragments ($n = 12$; $1 \times 1 \times 0,5$ mm) using a Tissue Slicer® (Thomas Scientific) under sterile conditions. The ovarian fragments were immediately evaluated under a stereoscope and an image software (Olympus, Japan) to select only those with a considerable number of preantral follicles. Two fresh fragments were fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA) for 2 hours and named as *Fresh Control* (FC), while two others were *in vitro* cultured for 7 days and considered *Cultured Control* (CC). The remaining fragments ($n = 8$) were distributed in four different vitrification conditions (2 fragments/condition): 1) Vitrification with the addition of sucrose (SUC); 2) Vitrification with the addition of SuperCool X-1000 0.2 % (X-1000); 3) SuperCool Z-1000 0.4 % (Z-1000) or 4) with PVP K-12 0.2 % (PVP), totaling four experimental treatments. The concentrations chose for the present experiment were according to previous reports in the literature (Ting et al., 2012; 2013).

The whole vitrification procedure was performed using the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) device according to Carvalho et al. (2013). Briefly, the fragments were exposed to two vitrification solutions (VS). The VS1 consisted of MEM supplemented with 10 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 20 IU/ml catalase, 10 % ethylene glycol (EG) and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO). The VS2 had a similar composition but with higher concentration of permeating CPAs (20 % EG and 20 % DMSO). Both solutions (VS1 and VS2) were supplemented with 0,25 M sucrose; 0.2 % X-1000; 0.4 % Z-1000 or 0.2 % PVP. Initially the ovarian fragments were exposed to VS1 for 4 minutes followed by an exposition to VS2 for 1 min. The vitrification solution was then removed and the OTC containing the ovarian tissue was closed and immediately immersed vertically into liquid nitrogen (-196° C).

After 1 week, the OTCs containing the vitrified ovarian fragments were warmed in air at room temperature (RT ~25 °C) for 1 min, followed by immersion in a water bath (37 °C) for 30 s. After this, the CPAs were removed using a three-step exposure to washing solutions (5 min each). These washing solutions (WS) were composed of: WS1 (MEM + 3 mg/mL BSA + 0.5 M sucrose); WS2 (MEM + 3 mg/mL BSA + 0.25 M sucrose) and WS3 (MEM + 3 mg/mL BSA). The three WS did not contain antioxidants.

2.3 *In vitro* culture

Fresh fragments from *Cultured Control* and vitrified/warmed fragments from the vitrification treatments were cultured in 500 µl of culture medium, for 7 days, at 39 °C in a humidified incubator with 5 % CO₂. 5 fragments were considered for each well due to the use of the Tissue Slicer®, that left really thin fragments. The culture medium consisted of base medium α-MEM (pH 7.2-7.4), supplemented with ITS (10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin; 0.5 ng/mL selenium), glutamine (2 mM), hypoxanthine (2 mM) and BSA (1.25 mg/mL). In addition, following previous findings from our laboratory (Matos et al., 2007; Martins et al., 2008), growth differentiation factor-9 (GDF-9; 200 ng/mL-1) and follicle stimulating hormone (FSH; 50 ng/mL) were added. Full medium replacements were performed every two days.

2.4 Evaluation of follicular morphology

Ovarian fragments (*Fresh Control*, *Cultured Control* or vitrification treatments) were fixed in 4 % PFA in phosphate-buffered saline (PBS) for 2 h at 37 °C, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, embedded in paraffin wax and cut 7 µm thin slices using a conventional microtome. The prepared slides were then stained

with Periodic Acid Schiff (PAS)-hematoxylin. For morphological evaluation, the slides were coded and examined under a light microscope (Nikon, Japan) with a magnification of 400X. Follicles were classified as previously defined (Silva et al., 2004) according to their morphology and developmental stage. The developmental stages considered were *primordial*: single layer of granulosa cells flattened around the oocyte; *intermediate or transition*: one layer of flattened with few cuboidal granulosa cells; *primary*: a full layer of cuboidal granulosa cells; and *secondary*, two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte. These follicles were classified morphologically as normal or degenerated according to the absence or presence of the following characteristics: pyknotic bodies, cytoplasmic shrinkage and disorganization of granulosa cells, respectively (Rodgers et al., 2010).

2.5 Reactive oxygen species (ROS) analysis in medium culture

The ROS levels were determined by a spectrofluorimetric method, using 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. A sample aliquot (50 μ L) was incubated with 5 μ L of DCFH-DA (1 mM). The oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of ROS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 2 h after the addition of DCFH-DA to the medium (Loetchutin et al., 2005).

2.6 Immunohistochemical analysis

Based on the results from follicular morphology, Ki-67, AQP3 and activated Caspase-3 assays were performed to determine follicular proliferation, presence of water channels and apoptosis, respectively. Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC)

Detection IHC kit (ab64264) (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) was used according to manufacturer's instructions. Tissue samples from fresh control, vitrified group and cultured group were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) and subsequently dehydrated and embedded in paraffin wax. Tissue sections (5 μ m) mounted on Superfrost Plus slides (Knittel Glass, Bielefeld, NW, Germany) were deparaffinized and rehydrated in a graded ethanol series. Antigen retrieval was performed by incubating tissue sections in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) for 5 min at 96 °C. To block endogenous peroxidase the slides were incubated with the manufacturer's solution for 10 minutes and then washed with PBS for 5 minutes. After this, the slides were incubated during 1 hour for non-specific blocking (25 ml PBS + 0.00125 g BSA + 75 μ l Triton X). Then, the slides were incubated for 1 hour either with rabbit polyclonal anti-Ki67 (1:1000 dilution – ab15580), anti-activated Caspase 3 (1:1000 dilution) or anti-AQP3 (1:1000 dilution) followed by incubation with the biotinylated goat anti-polyvalent secondary antibody. Next, the slides were washed, allowed to react with 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution (DAB) in DAB substrate and finally, the sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls were performed by not using the primary antibody. Spleen, healthy and intoxicated kidney tissue sections were used as positive controls for Ki-67, AQP3 and activated Caspase-3, respectively. About the analysis, follicles with at least one Ki-67-stained granulosa cell were considered to have initiated proliferation and coined as Ki-67-positive. Regarding the AQP3, the intensity of each protein positive labeling whether in the oocyte or granulosa cells of each preantral was graded as + (weak), ++ (moderate) or strong (+++). Finally, the activated caspase-3 analysis was performed in order to detect its presence as a positive labeling in the cytoplasm of the follicles and graded as positive or negative stained.

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the Sigma Plot 11.0 software (Systat Software Inc, San Jose, California, USA). Data that were not normally distributed (Shapiro-Wilk test) were submitted to logarithmic transformation. The percentage of morphologically normal and growing preantral follicles among treatments and days of culture were compared by Fisher's exact or chi-square tests. The Mann-Whitney test was performed to analyze the levels of reactive oxygen species among treatments and days of culture. Spearman correlation test was used to assess the association between normal preantral follicles and reactive oxygen species. Data were presented as mean (\pm standard error of the mean) and percentage, unless otherwise indicated. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ and probability values > 0.05 and ≤ 0.1 indicated that a difference approached significance.

3. Results

3.1 Evaluation of morphology, development and proliferation of preantral follicles

To evaluate follicular morphology, at least 152 follicles per treatment were analyzed, totalizing 1952 preantral follicles. The morphologically normal preantral follicles found in this study had normal oocytes and well organized surrounding granulosa cells. On the other hand, the degenerated follicles presented oocytes with cytoplasm retraction, nucleus pyknosis and disorganized granulosa cells (Figure 1A,B,D,E).

On Figure 2 we can see that compared to fresh control, the percentage of morphologically normal preantral follicles decreased significantly in all treatments, except for the ovarian tissue vitrified with SuperCool X-1000 followed by *in vitro* culture for 7 days ($p > 0.05$).

In addition to maintaining the percentage of normal follicles similar to fresh control after *in vitro* culture, the ovarian tissue previously vitrified with SuperCool X-1000 was superior ($p < 0.05$) to the other treatments. It is important to note that the percentage of normal follicles in the vitrified ovarian tissue (in all treatments) followed by *in vitro* culture was superior ($p < 0.05$) than the one observed in the cultured control.

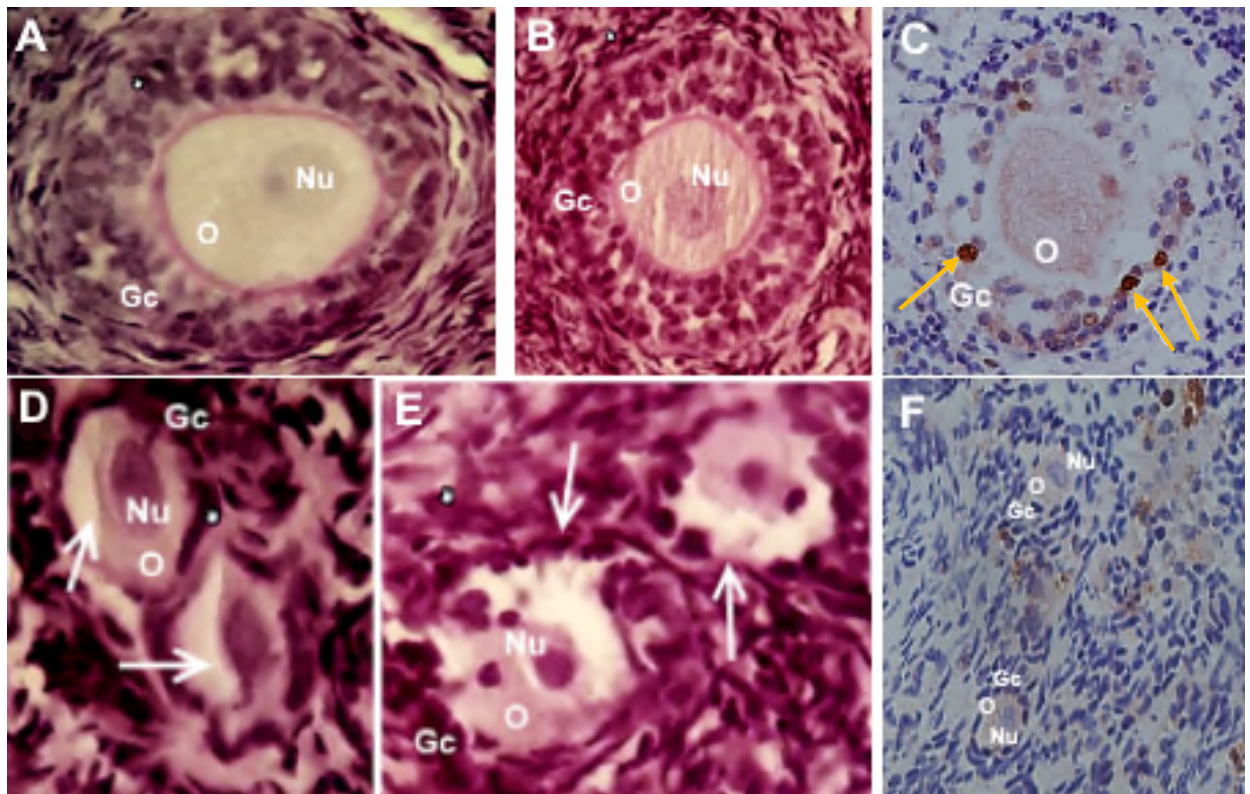


Figure 1. Microscopy images of morphological evaluation after acid-periodic Schiff staining. Morphologically normal preantral follicles present in *Fresh Control* (A) and SuperCool X-1000 (B) treatment. Morphologically degenerate preantral follicles found in SuperCool Z-1000 (D) and PVP-K12 (E) treatments. Note the white arrows showing ooplasm shrinkage in D and granulosa cells disorganization in E. Secondary follicle found in the *Fresh Control* group that shows Ki-67-positive granulosa cells (orange arrows) (C). Regular hematoxylin counter-stained granulosa cells and follicular nucleus, present in the

rest of treatments, showing negativity to Ki-67 staining (F). O: oocyte; Nu: oocyte nucleus; Gc: granulosa cells (400X).

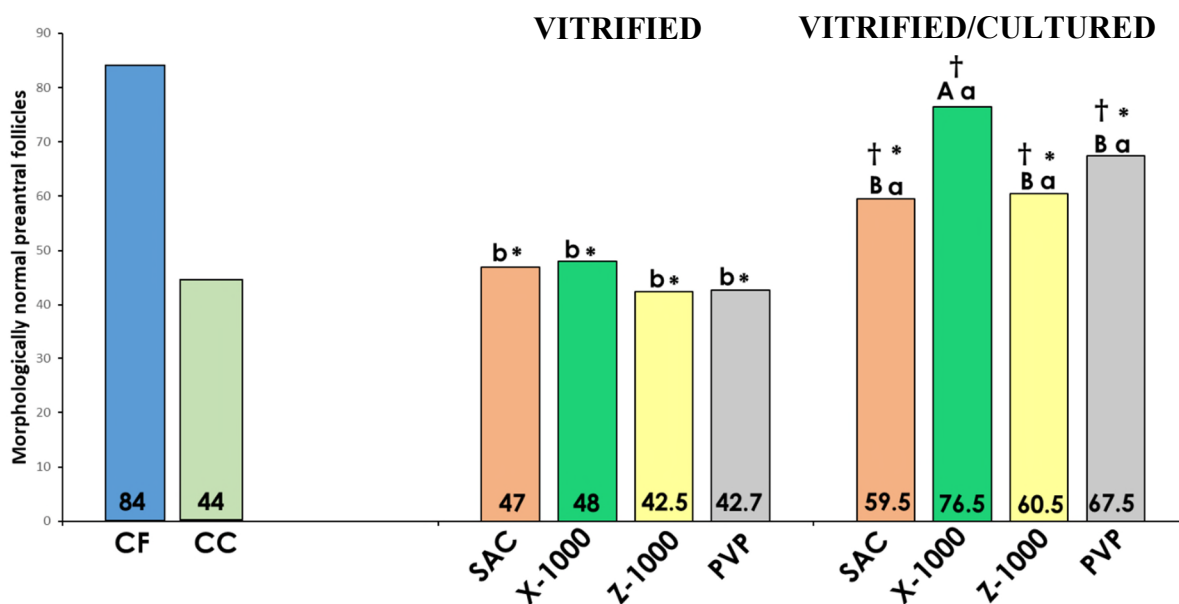


Figure 2. Percentages of morphologically normal preantral follicles on fresh or vitrified ovarian fragments before and after *in vitro* culture for 7 days.

A, B Between vitrified/cultured treatments ($p < 0.05$)

* Differ from fresh control ($p < 0.05$)

† Differ from cultured control ($p < 0.05$)

a, b Indicates difference ($p < 0.05$) between the non-cultured treatments and their cultured counterparts.

Regarding to follicular development, all vitrified and *in vitro* cultured fragments maintained the percentage of developing follicles similar to the fresh control, except the one vitrified with Z-1000 that showed a significant reduction in the follicular development percentages after 7 days of culture. Furthermore, it was observed that the percentage of developing follicles present in the vitrified tissue reduced significantly after *in vitro* culture compared to the non-vitrified tissue. In addition, the sucrose addition

showed no difference in comparison with the other vitrified/cultured treatments (X-1000, Z-1000 and PVP K-12), as we can see on Figure 3.

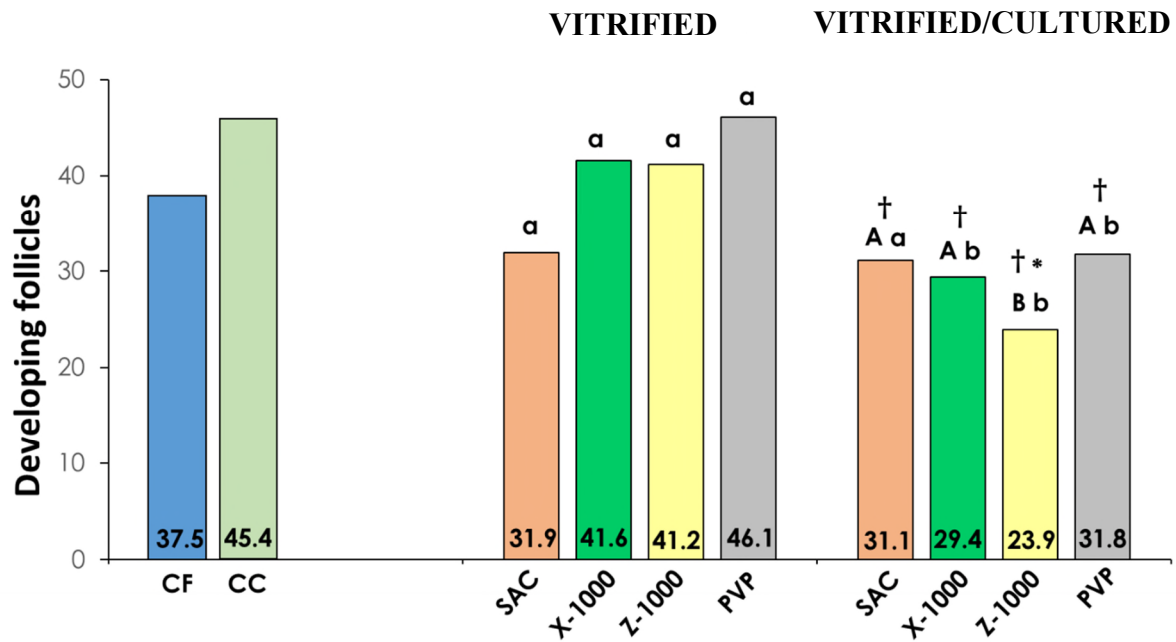


Figure 3. Percentages of developing follicles in fresh control, vitrified only and after vitrification followed by *in vitro* culture for 7 days.

^{A, B} Between vitrified/cultured treatments ($P < 0.05$)

* Differ from fresh control ($p < 0.05$)

† Differ from cultured control ($p < 0.05$)

a,b Indicates difference ($p < 0.05$) between the non-cultured treatments and their cultured counterparts.

Also, after the immunohistochemical assay in search for Ki-67-positive granulosa cells, only the Fresh Control (Figure 1C) showed granulosa cells positive to that protein. No other treatment showed positive staining to the Ki-67 protein as shown in Figure 1F, regular preantral follicles counter-stained with hematoxylin.

3.3 Immunohistochemical evaluation of presence of water channels (AQP3) and apoptosis (activated caspase-3)

Regarding AQP3 detection, in the Fresh Control, only follicles in the transition category between primordial and primary were found and they showed weak labeling in the oocyte compartment and absent in the granulosa cells. Moderate to strong labels were found in all the follicular categories in the Cultured Control treatment. In the Sucrose treatment, moderate labels were found in the oocyte of primordial follicles and in the oocyte and granulosa cells of transition follicles. SuperCool X-1000 was the treatment with the strongest labels in all the follicular categories evaluated except for the oocyte of the secondary follicles which showed moderate labeling (Figure 4E-F). Regarding the follicular apoptosis assessment, after immunohistochemical detection of activated caspase-3 in the cellular cytoplasm, positive staining was found in all the treatments (Figure 4A-D). However, there were no statistically significant differences between the treatments.

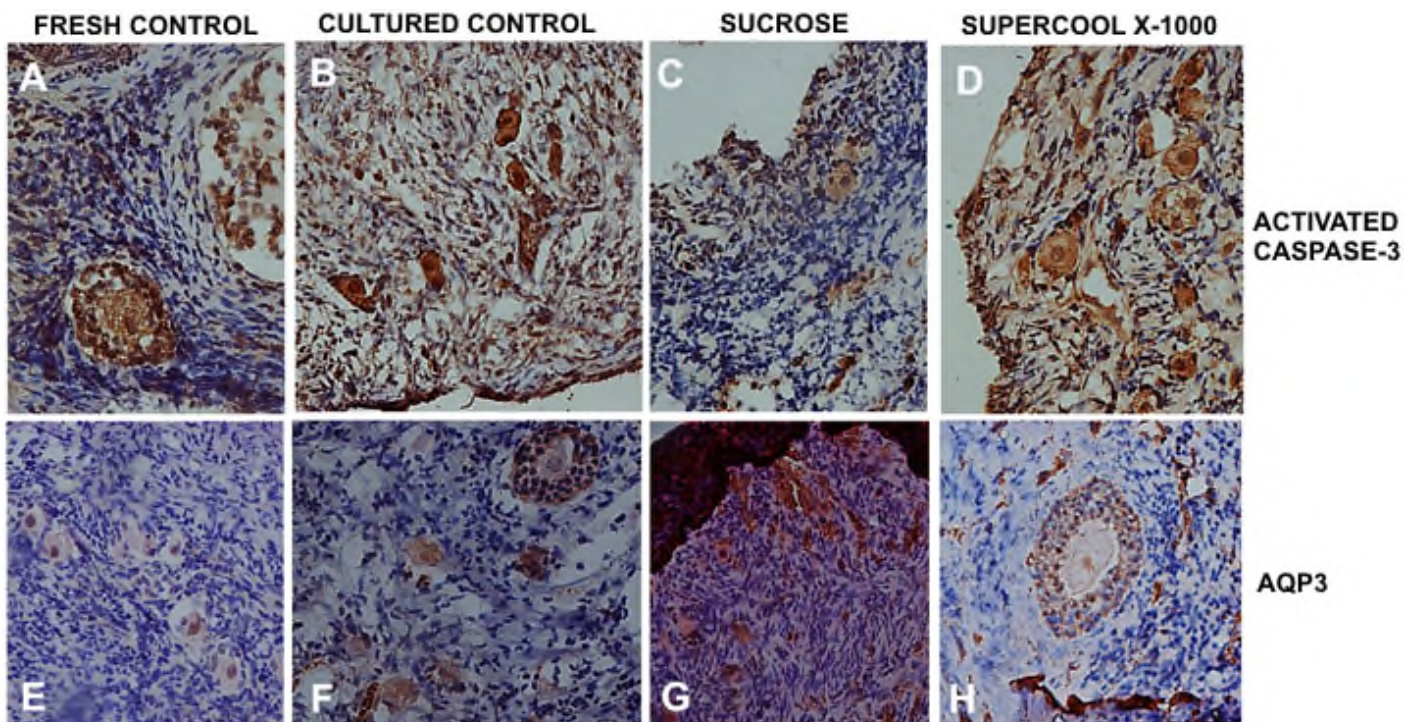


Figure 4. Immunolocalization of activated caspase-3 (A-D) on caprine ovarian preantral follicles from different treatments, *Fresh Control* (A); *Cultured Control* (B); *Sucrose* (C) and *SuperCool X-1000* (D). Immunolocalization of aquaporin 3 (E-H) on caprine ovarian preantral follicles from different treatments, *Fresh Control* (E); *Cultured Control* (F); *Sucrose* (G) and *SuperCool X-1000* (H).

3.4 ROS levels

In this study, the medium obtained from the *in vitro* culture was used to measure the ROS levels. As seen in Figure 5 there were no significant differences between vitrified and fresh fragments *in vitro* cultured for 7 days.

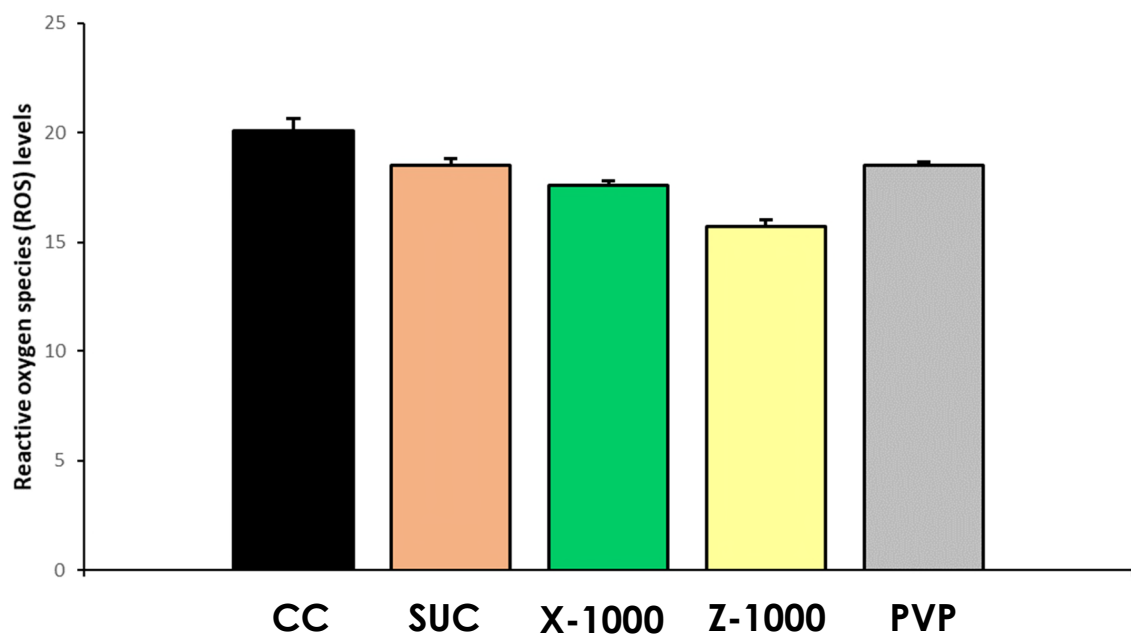


Figure 5. Mean percentage (\pm standard error of the mean) of reactive oxygen species (relative fluorescence units) produced by caprine ovarian tissue fragments after vitrified and *in vitro* cultured for 7 days.

4. Discussion

Although the use of synthetic polymers has already been proved in the vitrification of ovarian tissue (Hashimoto et al., 2010, Ting et al., 2012, 2013), this is the first report in which these macromolecules (SuperCool X-1000, SuperCool Z-1000 and PVP K-12) are used as ice-blockers in the vitrification of caprine ovarian tissue. Previous vitrification protocols have included these ice-blockers with success in animal models like bovine (Zhou et al., 2010), equine (Curcio et al., 2014), piscine (Cabrita et al., 2006), leporids (Marco-Jiménez et al., 2014), murine (Badrzadeh et al., 2010), porcine (Marco-Jiménez et al., 2012) and primate (Hashimoto et al., 2010, Ting et al., 2012, 2013).

In this study, ovarian fragments that were vitrified with the addition of the synthetic polymer SuperCool X-1000 followed by *in vitro* culture for 7 days showed no difference in follicular morphology compared with the fresh control and were superior to the other treatments. SuperCool X-1000 (a copolymer of polyvinyl alcohol) is known to be a highly effective ice-inhibiting agent (Wowk et al., 2000). Under normal conditions, ice crystal grow along six axes (a-axes) arranged symmetrically in one plane. Macromolecules such as SuperCool X-1000 appear to block ice growth along these axes preventing the formation of ice crystals (Zachariassen *et al.*, 2000). This property is the same by which the natural antifreeze proteins effectively block rapid ice crystal growth (Olijve et al., 2016). Additionally, SuperCool X-1000 at really low concentrations (0.001%) can help to reduce the concentration of permeating cryoprotectants needed to vitrify, which can help to reduce the toxicity (Wowk et al., 2000). On the other hand, the use of SuperCool Z-1000 or PVP K-12 didn't show satisfactory results, suggesting that it might not be ideal to test them alone. Previous results indicate that we might obtain better results if we associate SuperCool Z-1000 with Super Cool X-1000 due to its combined action in the inhibition of heterogeneous ice nucleators (Wowk et al., 2002). The PVP K-12 synthetic

polymer, according to a previous research, is known to work better when is associated with ethylene glycol rather than DMSO (Hashimoto et al., 2010). Additionally, it has also been suggested that the exposure time to the synthetic polymers should be adjusted for a future experiment since according to other authors an exposure for 3 minutes gives the best results and avoids a possible toxicity risk (Ting et al., 2012) in comparison with the 5 minutes exposure in our current experiment.

The vitrification process, regardless of the treatment used (sucrose, X-1000, Z-1000 and PVP K-12), affected the follicle morphology. In addition, after vitrification and *in vitro* culture for 7 days, all treatments showed a percentage of morphologically normal follicles superior than their vitrified counterparts. The immediate analysis after vitrification/warming could not be representing the real status of the tissue because in order to restart the metabolism of the cells an incubation period is needed (Hovatta et al., 1996). Additionally, based on previous investigations, ovarian tissue cells being subjected to stressful conditions like the vitrification procedure require a higher energy intake which could be provided by the *in vitro* culture medium (Gosden et al., 2000; Castro et al., 2014). Regarding to follicular development, no treatment could promote this process in comparison with the fresh control. Besides that, after vitrification and *in vitro* culture for 7 days all treatments with synthetic polymers suffered a significant reduction in the follicular development in comparison with their non-cultured counterparts. A possible explanation for the decrease in follicle development would be that secondary follicles are more sensitive to degenerative events than primordial follicles (Silva et al., 2002), which suggests that the vitrification with synthetic polymers followed by *in vitro* culture for 7 days might have affected mainly the developing follicle population. The primordial follicles containing an immature oocyte represent almost all of the ovarian follicle population (approximately 95%). They are more tolerant to the cryoinjuries inherent to

the cryopreservation process because the contained oocyte has a low metabolism, as well as absence of the spindle in the metaphase, zona pellucida and cortical granules. The small size of the primordial follicle also greatly favors penetration of the cryoprotective agent (OKTAY et al., 1997). Thus, it could be hypothesized that the synthetic polymers better preserved the pre-antral follicles at the early stages (primordial and transition) in order to secure their future development since they are more resistant.

Concerning the Ki-67 staining in the preantral follicles, only the Fresh Control group showed signs of Ki-67-positive granulosa cells. Ki-67 is expressed in all cell cycle phases, except in the resting cell (G0 phase) and compared to other proliferation markers such as PCNA, it is a superior indicator of true post thaw viability since it is labeled only if nuclear DNA is functioning at the time the stain is incorporated (Nubani et al., 1998). The rest of treatments didn't show any sign of Ki-67 positivity; thus, it can only be assumed that their main population consisted of quiescent follicles. These results, in conjunction with the preservation of follicular morphology and lack of follicular development, could be an indicative of the risks associated with the vitrification process, which through the exposure to freezing/thawing procedures, could be affecting the follicular capacity to develop and proliferate, something that has been mentioned already in the literature (Oktem et al., 2011). Another possibility is that this pool of quiescent follicles constitutes the group of follicles that are ready to further develop and mature when needed but need more time and specific culture requirements to further do so (Dath et al., 2010).

Regarding the AQP3 labeling in the preantral follicles, the strongest labels were found in the SuperCool X-1000 treatment in all follicular categories evaluated except for the oocyte compartment of the secondary follicles. In comparison, cultured control treatment showed only moderate to strong labels in the primordial and transition follicular population. AQP3 water channels are known as aquaglyceroporins, this is an aquaporin

with a bigger pore size that is permeable to water, urea and other solutes, playing an important role in transporting permeating ACPs such as ethylene glycol, propylene glycol, glycerol, and others (Sales et al., 2013). The presence of the strong AQP3 labeling in the earliest follicular categories in the SuperCool X-1000 treatment, in comparison with other treatments, could be in relation with its morphology results which showed a higher follicular morphology preservation in comparison with other treatments. Thus, they could be playing an important role during the exposure and removal of CPAs in the vitrification and warming steps (Sales et al., 2016).

Concerning the apoptosis assessment analysis, all treatments showed signs of activated caspase-3 staining in some of the follicles evaluated. Caspase-3 is part of the group of effector caspases and is activated in the apoptotic cell via the extrinsic (death receptors) and intrinsic pathways (mitochondrial pathway). Once the DNA fragmentation cascade is active, a positive feedback response ensures that the cell will inevitably enter into apoptosis (Cohen, 1997). Regardless of the presence of cryoprotectant agents and antioxidative additives the results obtained are in accordance with previous studies; in which the freezing and thawing induced certain levels of apoptosis in oocytes and ovarian stroma cells (Fauque et al., 2007).

The ROS levels were not significantly different in any treated group. ROS come from the aerobic metabolism and can diffuse and pass through cell membranes producing multiple effects like mitochondrial alterations, ATP depletion and apoptosis. The results found in this study may be explained by the presence of the antioxidant catalase in the vitrification solution, responsible for the hydrolysis of H_2O_2 into water and oxygen, removing this important initiator of chain reactions that can lead to formation of other ROS. A study from our laboratory obtained similar results, in which the catalase reduced the detrimental

effects of vitrification and its presence in the vitrification solution helped to obtain similar ROS levels with the fresh control (Carvalho et al., 2014).

In conclusion, we have demonstrated that the vitrification with the synthetic polymer SuperCool X-1000 maintained the follicular morphology similar to the observed in the fresh tissue, in other words, follicles vitrified with this synthetic polymer could resist better the stress suffered during this process. Also, the ROS results suggest that the interaction between SuperCool X-1000 and catalase could help reduce the injuries to the follicles.

Acknowledgments

This work was carried out at the Laboratory of Manipulation of Oocytes and Ovarian Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary Medicine of Ceará State University, Fortaleza, CE, Brazil. Diego Alberto Montano Vizcarra is recipient of a grant from CAPES Brazil and Ana Paula Ribeiro Rodrigues is recipient of a grant from CNPq Brazil.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

5. References

- AMORIM, C. A. et al. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 2, p. 160–186, 2011.
- AMORIM, C. A. et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 5, p. 1291–1298.e2, 2012.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 78, 2014.
- BADRZADEH, H. et al. SuperCool X-1000 and SuperCool Z-1000, two ice blockers, and their effect on vitrification/warming of mouse embryos. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 151, n. 1, p. 70–71, 2010.
- BEST, B. P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, n. 5, p. 422–436, 2015.
- CABRITA, E. et al. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v. 251, n. 2–4, p. 245–255, 2006.
- CARVALHO, A. A. et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 76, n. 5, p. 933–941, 2011.
- CARVALHO, A. A. et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3–4, p. 220–227, 2013.
- CARVALHO, A. A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 140–147, 2014.

CASTRO, S. V. et al. Frozen and fresh ovarian tissue require different culture media to promote in vitro development of bovine preantral follicles. **Biopreservation and biobanking**, v. 12, n. 5, p. 317–24, 2014.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 326, n. 1, p. 1–16, 1997.

CONGDON, T.; NOTMAN, R.; GIBSON, M. I. Antifreeze (Glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): Detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 5, p. 1578–1586, 2013.

CURCIO, B. R. et al. Ultrastructural morphology and nuclear maturation rates of immature equine oocytes vitrified with different solutions and exposure times. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 632–640, 2014.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 145–6, 2000.

DATH, C. et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: Comparison between four grafting sites. **Human Reproduction**, v. 25, n. 7, p. 1734–1743, 2010.

DEVRIES, A. L.; WOHLSCHLAG, D. E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 163, n. 3871, p. 1073–1075, 1969.

DONNEZ, J. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 519–535, 2006.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, n. 4, p. 407–426, 1984.

FAHY, G. M. et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 22–35, 2004.

FAUQUE, P. et al. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 5, p. 1200–1207, 2007.

FAUSTINO, L. R. Criopreservação de tecido ovariano: limitações e perspectivas para a preservação da fertilidade de fêmeas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 55, n. January, p. 1–15, 2011.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. **Cryo-Letters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004.

GIBSON, M. I. et al. Inhibition of ice crystal growth by synthetic glycopolymers: Implications for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 328–333, 2009.

GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, n. 163, p. 125–129, 2000.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 4, p. 501–509, 2010.

HOVATTA, O. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. **Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1268–1272, 1996.

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

JIMENEZ, C. R. et al. Vitrification of bovine preantral follicles with dimethylsulfoxide and sucrose plus α -tocopherol. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 209–215, 2016.

KNIGHT, C. A.; DEVRIES, A. L.; OOLMAN, L. D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. **Nature**, v. 308, n. 5956, p. 295–296, 1984.

KRISTIANSEN, E.; ZACHARIASSEN, K. E. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p. 262–280, 2005.

KULESHOVA, L. L. et al. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, n. 2, p. 119–30, 1999.

LADANYI, C. et al. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, p. 1–14, 2017.

LOETCHUTINAT, C. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 323–331, 2005.

LUNARDI, F. et al. Restoring fertility after ovarian tissue cryopreservation: a half century of research. **Zygote** (Cambridge, England), v. 21, n. 4, p. 394–405, 2013.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; CASARES-CRESPO, L.; VICENTE, J. S. Porcine oocyte vitrification in optimized low toxicity solution with open pulled straws. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 1–9, 2012.

MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Generation of live offspring from vitrified embryos with synthetic polymers Supercool X-1000 and Supercool Z-1000. **CryoLetters**, v. 35, n. 4, p. 286–292, 2014.

MARTINS, F. S. et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 8, p. 916–924, 2008.

MATOS, M. H. T. et al. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. **Zygote**, v. 15, n. 2, p. 173–182, 2007.

MITCHELL, D. E.; CAMERON, N. R.; GIBSON, M. I. Rational, yet simple, design and synthesis of an antifreeze-protein inspired polymer for cellular cryopreservation. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 65, p. 12977–12980, 2015.

NUBANI, R. et al. VIABILITY TESTING OF CRYOPRESERVED OVARIAN TISSUE. **Fertility and Sterility**, p. S209, 1998.

OKTAY, K. et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and sterility**, v. 67, n. 3, p. 481–6, 1997.

OKTEM, O. et al. Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimullerian hormone than slow-frozen ovaries. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 8, p. 2661–2664.e1, 2011.

OLIJVE, L. L. C. et al. Blocking rapid ice crystal growth through non-basal plane adsorption of antifreeze proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 14, p. 3740–3745, 2016.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 309–318, 2010.

ROSENDAHL, M. et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 2, p. 162–171, 2011.

SALES, A. D. et al. Structure, function, and localization of aquaporins: Their possible implications on gamete cryopreservation. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6718–6732, 2013.

SALES, A. D. et al. Modulation of aquaporins 3 and 9 after exposure of ovine ovarian tissue to cryoprotectants followed by in vitro culture. **Cell and Tissue Research**, v. 365, n. 2, p. 415–424, 2016.

SANTOS, R. R. et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v. 325, n. 3, p. 523–531, 2006.

SCALERCIO, S. R. et al. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1854–1864, 2016.

SILVA, J. R. V et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 3, p. 203–209, 2002.

SILVA, J. R. V. et al. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3–4, p. 273–286, 2004.

SUZUKI, N. et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, n. 3, p. 608–615, 2015.

TANPRADIT, N. et al. Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1553–1561, 2015.

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

TING, A. Y., YEOMAN R.R., LAWSON M. S., Z. M. B. Synthetic polymers improve vitrification outcomes of macaque ovarian tissue as assessed by histological integrity and the in vitro development of secondary follicles. **Human Reproduction**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2012.

TING, A. Y. et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267–1279, 2013.

WOWK, B. et al. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. **Cryobiology**, v. 40, n. 3, p. 228–236, 2000.

WOWK, B.; FAHY, G. M. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. **Cryobiology**, v. 44, n. 1, p. 14–23, 2002.

WOWK, B. Anomalous high activity of a sub fraction of polyvinyl alcohol ice blocker. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 325–331, 2005.

ZACHARIASSEN, K. E.; KRISTIANSSEN, E. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. **Cryobiology**, v. 41, n. 4, p. 257–279, 2000.

ZHANG, J.-M. et al. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, n. 2–3, p. 137–142, 2009.

ZHOU, X. L. et al. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 66–72, 2010.

7 CONCLUSÕES

O polímero sintético SuperCool X-1000 manteve a morfologia folicular semelhante à observada no tecido fresco. Isso significa que folículos vitrificados na presença deste polímero sintético resistem melhor ao estresse sofrido durante o processo de vitrificação.

8 PERSPECTIVAS

O melhoramento dos protocolos de vitrificação de tecido ovariano visando a sua utilização na clínica médica com a intenção de restaurar a fertilidade das mulheres precisa de resultados que garantam a preservação da morfologia folicular e oocitária além de obter boas taxas de desenvolvimento folicular. Nós acreditamos que a utilização de um ambiente *in vivo* como o xenotransplante (a diferença do *in vitro* utilizado no presente trabalho) possa melhorar essas taxas de desenvolvimento. Além disso, seria interessante fazer um análise hormonal para avaliar a funcionalidade desses folículos pré-antrais.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 5, p. 641–650, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Treatment & Survivorship Facts & Figures 2016-2017. **American Cancer Society**, p. 44, 2016.
- AMORIM, C. A. et al. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 2, p. 160–186, 2011.
- AMORIM, C. A. et al. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 3, p. 1094–1097, 2011.
- AMORIM, C. A. et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 5, p. 1291–1298.e2, 2012.
- AMORIM, C. A. et al. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 28, n. 8, p. 2146–2156, 2013.
- ANCHORDOGUY, T. J. et al. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 324–331, 1987.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 78, 2014.
- ARGYLE, C. E.; HARPER, J. C.; DAVIES, M. C. Oocyte cryopreservation: Where are we now? **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 440–449, 2016.
- AUBARD, Y. et al. Ovarian tissue cryopreservation and gynecologic oncology: A review. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 97, n. 1, p. 5–14, 2001.

BADRZADEH, H. et al. Super cool X-1000 and Super cool Z-1000, two ice blockers, and their effect on vitrification/warming of mouse embryos. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 151, n. 1, p. 70–71, 2010.

BANDEIRA, F. et al. Two Methods of Vitrification Followed by In Vitro Culture of the Ovine Ovary: Evaluation of the Follicular Development and Ovarian Extracellular Matrix. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 177–185, 2015.

BIELANSKI, A et al. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 110–116, 2000.

BIELANSKI, A. et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 46, p. 146–152, 2003.

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

BORGES, E. N. et al. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 195–200, 2009.

BORMAN, S. M. et al. Low-dose antiprogestin treatment prevents pregnancy in rhesus monkeys and is reversible after 1 year of treatment. **Human Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 69–76, 2003.

BROCKBANK, K. G. M. et al. Vitrification: Preservation of Cellular Implants. **Topics in Tissue Engineering**, p. 1–26, 2003.

CABRITA, E. et al. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v. 251, n. 2–4, p. 245–255, 2006.

CALLEJO, J. et al. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. **Journal of ovarian research**, v.

6, n. 1, p. 33, 2013.

CARVALHO, A. D. A. et al. Vitriificação : Uma Alternativa Para a Preservação De Embriões E Material Genético De Fêmeas Mamíferas Em. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 236–248, 2011.

CARVALHO, A. D. A. et al. Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. March, p. 1–15, 2012.

CARVALHO, A. A. et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3–4, p. 220–227, 2013.

CARVALHO, A. A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 140–147, 2014.

CASTRO, S. V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. January, p. 1–18, 2011.

CASTRO, S. V. et al. Proteínas de choque térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261–271, 2013.

CASTRO, S. V. et al. Frozen and fresh ovarian tissue require different culture media to promote in vitro development of bovine preantral follicles. **Biopreservation and biobanking**, v. 12, n. 5, p. 317–24, 2014.

CHIAN, R.-C.; QUINN, P. Fertility Cryopreservation. First Edit ed. New York: **Cambridge University Press**; 1st edition (June 14, 2010), 2010.

CHOI, W. J. et al. Developmental competence and cryotolerance of caprine parthenogenetic embryos cultured in chemically defined media. **Theriogenology**, v. 86,

n. 2, p. 596–603, 2015.

COCCIA, P. F. et al. Adolescent and Young Adult Oncology , Featured Updates to the NCCN Guidelines. **NCCN Guidelines Insights**, v. 12, n. 1, 2014.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 326, n. 1, p. 1–16, 1997.

CONGDON, T.; NOTMAN, R.; GIBSON, M. I. Antifreeze (Glyco)protein mimetic behavior of poly(vinyl alcohol): Detailed structure ice recrystallization inhibition activity study. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 5, p. 1578–1586, 2013.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A C. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. **Human reproduction**, Oxford, England, v. 11, n. 12, p. 2656–2666, 1996.

CURCIO, B. R. et al. Ultrastructural morphology and nuclear maturation rates of immature equine oocytes vitrified with different solutions and exposure times. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 632–640, 2014.

DE LEEUW, F. E. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, 1993.

DELLER, R. C. et al. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–7, 2013.

DENKER, B. M. et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 30, p. 15634–15642, 1988.

DITTRICH, R. et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue - A

systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 6, p. 1557–1565, 2015.

DONNEZ, J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, n. 9443, p. 1405–10, 2004.

DONNEZ, J. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 519–535, 2006.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 28, n. 8, p. 1188–1197, 2014.

FABBRI, R. et al. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. **Human Reproduction**, v. 31, n. 8, p. 1838–1849, 2016.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, n. 4, p. 407–426, 1984.

FAHY, G. M. et al. Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. **Cryobiology**, v. 48, n. 2, p. 157–178, 2004.

FAHY, G. M. et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 22–35, 2004.

FAUSTINO, L. R. et al. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 90–97, 2010.

FAUSTINO, L. R. et al. Criopreservação de tecido ovariano: limitações e perspectivas para a preservação da fertilidade de fêmeas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 55, n. January, p. 1–15, 2011.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V.
Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA In:
Gonçalves PBD, FIGUEIREDO JR, FREITAS VJF. **Biotécnicas aplicadas à
reprodução animal**, 2. ed., São Paulo, Roca, 2008, p. 303-327.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Cryopreservation and in vitro culture of caprine preantral
follicles. **Reproduction, fertility, and development**, v. 23, n. 1, p. 40–7, 2011.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen
state. **Cryo-Letters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine.
Reproductive biomedicine online, v. 9, n. 6, p. 680–691, 2004.

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

GIBSON, M. I. et al. Inhibition of ice crystal growth by synthetic glycopolymers:
Implications for the rational design of antifreeze glycoprotein mimics.
Biomacromolecules, v. 10, n. 2, p. 328–333, 2009.

GLUJOVSKY, D. et al. Vitrification versus slow freezing for women undergoing
oocyte cryopreservation. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 9, n. 9, p.
CD010047, 2014.

GONZÁLEZ, C. et al. Combined strategy for fertility preservation in an oncologic
patient: Vitrification of in vitro matured oocytes and ovarian tissue freezing. **Journal of
Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 12, p. 1147–1149, 2011.

GUPTA, P. S. P. et al. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown
preantral follicles. **Zygote**, Cambridge, England, v. 16, n. 1, p. 57–63, 2008.

HADAR, T. et al. Expression of p53, Ki-67 and Bcl-2 in parathyroid adenoma and

residual normal tissue. **Pathology oncology research**, v. 11, n. 1, p. 45–49, 2005.

HASHIMOTO, S. et al. Growing porcine oocyte-granulosa cell complexes acquired meiotic competence during in vitro culture. **The Journal of reproduction and development**, v. 53, n. 2, p. 379–84, 2007.

HARDING, M. M.; ANDERBERG, P. I.; HAYMET, A. D. J. “Antifreeze” glycoproteins from polar fish. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 7, p. 1381–1392, 2003.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 4, p. 501–509, 2010.

HIRAO, Y. et al. In Vitro Growth and Development of Bovine Oocyte-Granulosa Cell Complexes on the Flat Substratum: Effects of High Polyvinylpyrrolidone Concentration in Culture Medium. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 83–91, 2003.

JAIN, J.; PAULSON, R. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4, p. 1037–1046, 2006.

JERUSS, J. S.; WOODRUFF, T. K. Preservation of Fertility in Patients with Cancers. **N Engl J Med**, v. 360, n. 9, p. 14, 2009.

JIMENEZ, C. R. et al. Vitrification of bovine preantral follicles with dimethylsulfoxide and sucrose plus α -tocopherol. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 209–215, 2016.

KAPP, M. B. Ethical and legal issues in research involving human subjects: do you want a piece of me? **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 4, p. 335–339, 2006.

KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, n. 7, p. 1670–1683, 2009.

LADANYI, C. et al. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, p. 1–14, 2017.

LAMBERTINI, M. et al. Ovarian suppression using luteinizing hormone-releasing hormone agonists during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility of breast cancer patients: A meta-analysis of randomized studies. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 12, p. 2408–2419, 2015.

LEE, D. M. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 137–138, 2004.

LEVINE, J. M. et al. Infertility in reproductive-age female cancer survivors. **Cancer**, v. 121, n. 10, p. 1532–1539, 2015.

LOETCHUTINAT, C. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 323–331, 2005.

LORNAGE, J. et al. Vitrication du tissu ovarien : cortex et ovaire entier chez la brebis. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, n. 9, p. 746–753, 2006.

LUCAS, K.; HENSEL, D. Fertility Preservation Options for Women Treated for Cancer. **Nursing for Women's Health**, v. 18, n. 2, p. 138–147, 2014.

LUNARDI, F. O. et al. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2–3, p. 121–130, 2012.

LUNARDI, F. O. et al. Restoring fertility after ovarian tissue cryopreservation: a half century of research. **Zygote**, Cambridge, England, v. 21, n. 4, p. 394–405, 2013.

LUNARDI, F. O. et al. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and

form antrum after a short period of in vitro culture. **Cell and Tissue Research**, v. 362, n. 1, p. 241–251, 2015.

LUZ, H. K. M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1–14, 2011.

MAHAJAN, N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 8, n. 1, p. 3, 2015.

MAKAREVICH, A. V. et al. Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant. **Zygote**, Cambridge, England, v. 18, n. 2, p. 145, 2010.

MANDELBAUM, J. et al. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. **Human reproduction**, Oxford, England, v. 13 Suppl 3, p. 161-74–7, 1998.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; CASARES-CRESPO, L.; VICENTE, J. S. Porcine oocyte vitrification in optimized low toxicity solution with open pulled straws. **Zygote**, Cambridge, England, v. 22, n. 2, p. 1–9, 2012.

MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Generation of live offspring from vitrified embryos with synthetic polymers Supercool X-1000 and Supercool Z-1000. **CryoLetters**, v. 35, n. 4, p. 286–292, 2014.

MEIROW, D.; LEVRON, J. Pregnancy after Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue in a Patient with Ovarian Failure after Chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, p. 318–321, 2005.

MILENKOVIC, M. et al. Whole sheep ovary cryopreservation: Evaluation of a slow freezing protocol with dimethylsulphoxide. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 1, p. 7–14, 2011.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice.

Transfusion, v. 47, n. 5, p. 935–945, 2007.

MITCHELL, D. E.; CAMERON, N. R.; GIBSON, M. I. Rational, yet simple, design and synthesis of an antifreeze-protein inspired polymer for cellular cryopreservation. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 65, p. 12977–12980, 2015.

ORYAN ABKENAR, Z. et al. Vitrification and subsequent in vitro maturation of mouse preantral follicles in presence of growth factors. **Cell Journal**, v. 16, n. 3, p. 271–8, 2014.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. **Methods in molecular biology**, v. 368, p. 39–57, 2007.

PIASSI, L. M. et al. Efeito de crioprotetores impermeáveis sobre a viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de camundongos (*Mus musculus*) das linhagens SWISS-ALBINA e BALB. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, p. 1161–1170, 2009.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. **Nature**, 1985.

REVELLI, A. et al. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 1, p. 227–230, 2013.

RIENZI, L. et al. Oocyte , embryo and blastocyst cryopreservation in ART : systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitri fi cation to produce evidence for the development of global guidance. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 2, p. 139–155, 2017.

RODRIGUES, Ana Paula. **Criopreservação e cultivo in vitro de oócitos em folículos pré-antrais caprinos**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

RODRIGUES, A. P. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1009–1024, 2004a.

RODRIGUES, A. P. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1–2, p. 211–227, 2004b.

RODRIGUEZ-WALLBERG, K. A. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation among alternatives for fertility preservation in the Nordic countries – compilation of 20 years of multicenter experience. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 95, n. 9, p. 1015–1026, 2016.

ROSENDAHL, M. et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 2, p. 162–171, 2011.

RUIZ, J. et al. Vitrification of in vitro mature alpaca oocyte: Effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1–4, p. 72–78, 2013.

SALES, A. D. et al. Structure, function, and localization of aquaporins: Their possible implications on gamete cryopreservation. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6718–6732, 2013.

SAMARTZI, F. et al. Cryopreservation of sheep embryos by slow freezing or vitrification with or without caffeic acid. **Animal Reproduction**, 2015.

SANFILIPPO, S. et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 67, 2015.

SANTOS, R. R. et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v. 325, n. 3, p. 523–531, 2006.

SANTOS, R. R. et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 9–15, 2008.

SUZUKI, N. et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, n. 3, p. 608–615, 2015.

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

TANPRADIT, N. et al. Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1553–1561, 2015.

TING, A. Y. et al. Synthetic polymers improve vitrification outcomes of macaque ovarian tissue as assessed by histological integrity and the in vitro development of secondary follicles. **Cryobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2012.

TING, A. Y. et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267–1279, 2013.

TORRES, P. et al. Vitrificación de tejido ovárico porcino : efecto de diferentes agentes crioprotectores en la preservación de la morfología de folículos preantrales. **InVet**, v. 14, n. 1, p. 87–99, 2012.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7212–7220, 2005.

WANG, X. et al. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 527–535, 2009.

WANG, X. et al. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified

murine ovarian tissue: Oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**, v. 141, n. 2, p. 183–191, 2011.

WOWK, B. et al. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. **Cryobiology**, v. 40, n. 3, p. 228–236, 2000.

WOWK, B.; FAHY, G. M. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. **Cryobiology**, v. 44, n. 1, p. 14–23, 2002.

WOWK, B. Anomalous high activity of a subfraction of polyvinyl alcohol ice blocker. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 325–331, 2005.

WOWK, B.; FAHY, G. M. Ice nucleation and growth in concentrated vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 55, n. 3, p. 330, 2007.

ZHANG, J.-M. et al. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, n. 2–3, p. 137–142, 2009.

ZHANG, J.-M. et al. Comparisons of Different Protocols for Vitrifying Mouse Ovarian Tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 694–698, 2010.

ZHOU, X. L. et al. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 66–72, 2010.

ZHOU, Y. et al. An efficient method for the sanitary vitrification of bovine oocytes in straws. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 19, 2014.