



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



**INFLUÊNCIA DOS FATORES BMP15 E GDF9 LIVRES EM MATRIZ DE
HIDROGEL NA RECUPERAÇÃO FOLICULAR PÓS TRANSPLANTE E NO
CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO DE
CADELAS**

Bruna Afonso de Azevedo

Dissertação de Mestrado

Brasília – DF

2026

**INFLUÊNCIA DOS FATORES BMP15 E GDF9 LIVRES EM MATRIZ DE
HIDROGEL NA RECUPERAÇÃO FOLICULAR PÓS TRANSPLANTE E NO
CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO DE
CADELAS**

Bruna Afonso de Azevedo

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fernanda Paulini

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

In memoriam

À minha mãe, que, com dedicação e sacrifício, plantou em mim o valor da educação e o desejo de crescer. Cada página desta dissertação carrega um pouco do que aprendi com o seu amor.

RESUMO

A criopreservação de tecido ovariano é uma tecnologia de reprodução assistida eficaz para a preservação da fertilidade feminina e também para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. Entretanto, essa técnica enfrenta desafios devido à perda folicular que ocorre durante o congelamento deste tecido, além do período de isquemia durante o transplante e a quantidade limitada de oxigênio no cultivo *in vitro* que também afetam a viabilidade dos folículos ovarianos. Assim, o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas é necessário para a preservação e recuperação folicular, como a utilização de uma matriz hidrogel que simule o microambiente ovocitário, podendo-se adicionar fatores de crescimento, como o GDF9 e o BMP15, que atuam diretamente nas células da granulosa dos folículos. O presente estudo buscou avaliar o efeito dos fatores BMP15 e GDF9 livres, incorporados em matriz de hidrogel, na recuperação e viabilidade folicular de tecido ovariano criopreservado de cadelas após transplante ou cultivo *in vitro*. Para isso, foram coletados ovários de 16 cadelas, cujos fragmentos foram vitrificados e, após o descongelamento, distribuídos em grupos: controle fresco (G1), controle da criopreservação (G2), controle negativo (G3) e grupos tratados com BMP15 (G4), GDF9 (G5) ou a combinação de ambos (G6) e incorporados à uma matriz de hidrogel. Os fragmentos foram cultivados *in vitro* ou transplantados em camundongos imunossuprimidos por um período de 21 dias. Foram feitas análises de histologia clássica para classificação morfológica dos folículos e análises imunohistoquímicas com marcadores para a identificação de proliferação (Ki-67) apoptose (caspase) celular. Os resultados demonstraram que o grupo controle fresco (G1) obteve a maior proporção de folículos morfológicamente normais (MN). Dentre os grupos tratados com fatores de crescimento, o uso de BMP15 (G4) no transplante apresentou melhor desempenho na preservação de folículos primordiais MN (61,6%) em comparação ao cultivo. A combinação BMP15+GDF9 (G6) no cultivo resultou em taxas superiores de folículos em crescimento MN (42,3%) do que o uso isolado de cada fator. A viabilidade folicular pode ser observada pela marcação positiva para Ki-67 em 98,7% dos folículos transplantados e pela ausência de apoptose em 99,1% dos mesmos. Deste modo, a incorporação dos fatores de crescimento BMP15 e GDF9 em matriz de hidrogel favorece a sobrevivência e a recuperação do desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: criopreservação; tecido ovariano; xenotransplante; fatores de crescimento; matriz de hidrogel.

ABSTRACT

Cryopreservation of ovarian tissue is an effective assisted reproduction technology for preserving female fertility and conserving endangered species. However, this technique faces challenges due to follicular loss during tissue freezing, as well as the ischemic period following transplantation and the limited oxygen supply in *in vitro* culture, which also affect the viability of ovarian follicles. Thus, the development of reproductive biotechnologies is necessary for follicular preservation and recovery, such as the use of a hydrogel matrix that simulates the oocyte microenvironment, allowing the addition of growth factors like GDF9 and BMP15, which act directly on follicle granulosa cells. The present study aimed to evaluate the effect of free BMP15 and GDF9 factors, incorporated into a hydrogel matrix, on the recovery and follicular viability of cryopreserved ovarian tissue from female dogs after transplantation or *in vitro* culture. For this purpose, ovaries were collected from 16 female dogs, and the fragments were vitrified. After warming, the fragments were distributed into groups: fresh control (G1), cryopreservation control (G2), negative control (G3) and groups treated with BMP15 (G4), GDF9 (G5), or a combination of both (G6), and incorporated into a hydrogel matrix. The fragments were either cultured *in vitro* or transplanted into immunosuppressed mice for a period of 21 days. Classical histological analyses were performed for morphological classification of the follicles, and immunohistochemical analyses were conducted using markers for identifying cellular proliferation (Ki-67) and apoptosis (caspase). The results showed that the fresh control group (G1) achieved the highest proportion of morphologically normal (MN) follicles. Among the groups treated with growth factors, the use of BMP15 (G4) in transplantation showed better performance in preserving MN primordial follicles (61.6%) compared to the culture. The combination of BMP15+GDF9 (G6) in the culture resulted in higher rates of MN growing follicles (42.3%) than the isolated use of each factor. Follicular viability was observed by positive staining for Ki-67 in 98.7% of the transplanted follicles and the absence of apoptosis in 99.1% of them. In conclusion, the incorporation of growth factors BMP15 and GDF9 into a hydrogel matrix promotes survival and the recovery of follicular development.

Keywords: Cryopreservation; Ovarian tissue; Xenotransplantation; BMP15; GDF9; Hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	41
Figura 2. Representação de fragmentos ovarianos embebidos em matriz de hidrogel e transplantados em camundongos imunossuprimidos.....	44
Figura 3. Distribuição dos fragmentos ovarianos embebidos em matriz de hidrogel na placa de cultivo de acordo com os grupos experimentais.....	46
Figura 4. Folículos morfologicamente normais presentes nos grupos controles.....	51
Figura 5. Folículos morfologicamente normais presentes nos grupos tratados com os fatores de crescimento BMP15 e GDF.....	55
Figura 6. Folículos marcados com Ki-67 nos grupos tratados com os fatores de crescimento.....	63
Figura 7. Folículos caspase negativos nos grupos experimentais.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade total de folículos (%média±DP), quantidade de folículos morfolologicamente normais (MN) primordiais (%média± DP) e em crescimento (%média± DP) nos fragmentos de tecido ovariano dos grupos controle.....50

Tabela 2. Quantidade total média de folículos (%média± DP), quantidade de folículos totais e folículos morfolologicamente normais (MN) primordiais (%média± DP) e em crescimento (%média± DP) nos fragmentos de tecido ovariano dos Quantidade de folículos totais e médios (± DP) e morfolologicamente normais (MN) encontrados nos fragmentos de tecido ovariano dos grupos tratados com fatores de crescimento BMP15 e GDF9.....52

Tabela 3. Quantidade de folículos totais e médios (± DP) morfolologicamente normais (MN) nos fragmentos de controle frescos e tratados e transplantados ou cultivados *in vitro*.....57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Quantidade de folículos que apresentaram ou não marcação com Ki-67 no cultivo in vitro.....60

Gráfico 2. Comparação entre a quantidade de folículos marcados com Ki-67 nos grupos amostrais cultivados.....61

Gráfico 3. Comparação entre a quantidade de folículos marcados com Ki-67 nos grupos amostrais cultivados.....64

Gráfico 4. Comparação entre a quantidade de folículos que apresentaram ou não marcação para a caspase nos grupos controles.....66

Gráfico 5. Comparação entre o grupo controle negativo cultivado e demais grupos tratados e cultivados.....67

SIGLAS E ABREVIACÕES

ACP – Agentes crioprotetores

BMP15 – Proteína Morfogenética Óssea

CG – Células da granulosa

CL – Congelamento lento

CO₂ – Dióxido de carbono

DG – degenerados

DP – Desvio padrão

DMSO – Dimetilsulfóxido

EG - Etilenoglicol

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FIG α – Fator da Linha Germinativa Alfa

FIV – Fertilização in vitro

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GDF9 – Fator de Crescimento e Diferenciação

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

LH – Hormônio Luteinizante

MN – Morfologicamente normais

OSH - Ovariohisterectomia

PVP - Polivinilpirrolidona

SE – Solução de equilíbrio

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema nervoso central

SV – Solução de vitrificação

TGF – Fator de Crescimento Transformador

TRAs – Técnicas de Reprodução Assistida

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
	2.1. Aspectos biológicos da reprodução das fêmeas em mamíferos	16
	2.2. Biotecnologias reprodutivas aliadas à preservação da fertilidade	18
	2.2.1. A criopreservação como recurso para a preservação da fertilidade	21
	2.2.1.1. Criopreservação de tecido ovariano	27
	2.2.1.2. Transplante de tecido ovariano	30
	2.2.1.3. Cultivo in-vitro de tecido ovariano	31
	2.2.2. Os Fatores de crescimento BMP15 e GDF9	33
	2.2.3. Uso de matrizes de hidrogel na biotecnologia reprodutiva	36
3.	JUSTIFICATIVA	38
4.	OBJETIVOS	38
	4.1. Objetivo geral	38
	4.2. Objetivo específico	39
5.	MATERIAL E MÉTODOS	39
	5.1. Coleta de tecido ovariano e animais	39
	5.2. Delineamento Experimental	40
	5.3. Vitrificação e reaquecimento do tecido ovariano	41
	5.4. Preparo da matriz de hidrogel	42
	5.5. Cirurgias e eutanásias	43
	5.5.1. Ovariectomia (OSH) e transplante de tecido ovariano	43
	5.5.2. Eutanásias	44
	5.6. Cultivo de tecido ovariano	45
	5.7. Análises histológicas	46

	5.8. Análises imunohistoquímicas	47
	5.9. Análise estatística	49
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
	6.1. Desenvolvimento folicular	49
	6.2. Viabilidade folicular	60
7.	CONCLUSÃO	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9.	ANEXO I	85

1. INTRODUÇÃO

O avanço das biotecnologias reprodutivas ao longo das últimas décadas tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da área da reprodução, de forma a aprimorar a eficiência e a produtividade dessas técnicas, e assim, estabelecer protocolos que contribuam para a preservação da fertilidade em diferentes espécies (GRAHAM *et. al*, 2023). Esses avanços podem beneficiar a superação da infertilidade, a preservação de espécies ameaçadas de extinção e o aumento da produtividade de animais de rebanho (SOBOLEWSKI, 2020).

A partir desse contexto, dentre as biotecnologias é possível citar as Técnicas de Reprodução Assistidas (TRAs), que compreendem desde procedimentos mais simples, como a Inseminação Artificial, em que o gameta masculino é introduzido diretamente no aparelho reprodutivo da fêmea para facilitar a fecundação, até métodos mais complexos, como a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), a Fertilização *in vitro* (FIV), a produção *in vitro* e transferência de embriões, a clonagem e a seleção de embriões (GONÇALVES *et. al*, 2021).

Associada a essas técnicas, a criopreservação pode ser utilizada para o armazenamento dos gametas ou o tecido ovariano por tempo indeterminado (FABRI *et. al*, 2016). Esse processo ocorre em nitrogênio líquido, sob temperaturas extremamente baixas, o que reduz o metabolismo celular e preserva a funcionalidade, permitindo o seu restabelecimento após o reaquecimento (DAY *et. al*, 2008). Para manter a viabilidade das amostras, são adicionados crioprotetores (CPAs), que minimizam danos celulares como a formação de cristais de gelo (DALWADI *et. al*, 2020). Essas substâncias aumentam a concentração dos solutos e diminuem o ponto de fusão da solução, contribuindo para a integridade celular durante o congelamento e descongelamento (PEGG, 2009).

A criopreservação de tecido ovariano representa uma opção viável para a preservação da fertilidade feminina, visto que é nesse tecido que os ovócitos estão localizados (LIU *et. al*, 2002). O tecido pode ser congelado inteiro ou em pequenos fragmentos retirados do córtex ovariano, região rica em folículos primordiais, que apresentam uma melhor resistência ao congelamento, principalmente devido ao seu pequeno tamanho, o que facilita a penetração dos crioprotetores e aumenta a eficiência do processo (DOLMANS *et. al*, 2021).

Para avaliar a retomada da função ovariana, tanto reprodutiva quanto endócrina, após o congelamento, podem ser empregadas duas abordagens: o transplante (HORNSHØJ *et. al*, 2021) e o cultivo *in vitro* do tecido ovariano (ACKERMANN *et. al*, 2017). No transplante, fragmentos do tecido são inseridos no local de origem ou em outro local do organismo (AMORIM *et. al*, 2019). Já no cultivo *in vitro*, esses fragmentos são colocados em uma placa de cultivo com um meio de cultura rico em nutrientes essenciais para a sobrevivência e incubados em condições controladas de temperatura e concentração de dióxido de carbono (CO₂) (AGUIAR *et. al*, 2016). Entretanto, ambos os métodos apresentam desafios, incluindo a perda folicular: no transplante, essa perda ocorre principalmente devido à isquemia no intervalo entre a retirada e revascularização do tecido (LIU *et. al*, 2002). No cultivo *in vitro*, a dificuldade de oxigenação do tecido pode comprometer sua viabilidade ao longo do tempo (FILATOV *et. al*, 2016).

Assim, fatores de crescimento têm sido utilizados associados a essas técnicas para incrementar a sobrevivência e recuperação dos folículos após a criopreservação, com destaque para a Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP15) e o Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF9), que possuem atuação direta nos folículos primordiais, induzindo o seu desenvolvimento e controlando o crescimento do gameta feminino (RIEPSAMEN *et. al*, 2023; HUANG *et. al*, 2023). Eles atuam nos primeiros estágios da foliculogênese, regulando a

atividade e a proliferação das células da granulosa e possuem um papel fundamental na expressão gênica das células somáticas foliculares (PAULINI & MELO, 2011).

Quando colocados em matrizes de hidrogel, que são redes de polímeros biofabricadas que mimetizam a matriz extracelular, esses fatores são menos suscetíveis à degradação e são liberados gradativamente para o tecido ovariano (HOSTE *et. al*, 2004), promovendo uma melhor maturação folicular; pois eles conseguem simular melhor o microambiente e a estrutura ovariana, essenciais para o desenvolvimento dos folículos (TOH & LOH, 2014). Estudos demonstram que folículos de porcos cultivados com o uso de matriz de alginato conseguiram se desenvolver até o estágio antral, produzindo ovócitos capazes de atingir o estágio de meiose 2 (PARK *et. al*, 2012).

Apesar de serem bastante exploradas em algumas espécies, as TRAs possuem uma utilização bastante limitada em canídeos (SUZUKI *et. al*, 2022). A falta de desenvolvimento de TRAs nessa espécie se deve principalmente às diferenças fisiológicas reprodutivas que ela possui se comparado com as demais espécies (NAGASHIMA *et. al*, 2015), como, por exemplo, uma inatividade ovariana prolongada (ou anestro), resultando em uma ou duas ovulações por ano (CONCANNON, 2011).

Em cadelas, os ovócitos são ovulados em estágios imaturos, se comparado com outras espécies, e necessitam ficar entre 48 e 72 horas no oviduto após a ovulação para completar a maturação nuclear (REYNAUD *et. al*, 2005). Além disso, os ovócitos caninos são mais escuros devido à grande quantidade de lipídeos que possuem, tornando difícil a identificação de estruturas intracelulares por microscopia de luz e a criopreservação de ovócitos funcionais e de embriões (CHASTANT-MAILLARD *et. al*, 2010).

Nesse contexto, investigar estratégias que favoreçam o desenvolvimento e a maturação dos ovócitos dessa espécie não apenas amplia o entendimento da biologia reprodutiva canina,

mas também abre caminho para avanços significativos em biotecnologias da reprodução, com potencial impacto na conservação, na medicina veterinária e no aprimoramento de técnicas reprodutivas inovadoras.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos biológicos da reprodução das fêmeas em mamíferos

A reprodução é essencial para os seres vivos, pois ela é responsável pela transmissão das informações genéticas e, conseqüentemente, pela continuidade das espécies ao longo do tempo. Em mamíferos, esse mecanismo é regulado por dois sistemas: o endócrino e o nervoso, que, apesar de terem funções específicas, atuam juntos para regular a cascata de eventos necessários desde a formação dos gametas até a fertilização e o nascimento (PTASZYNSKA, 2007).

Dentre os órgãos presentes nas fêmeas, estão os ovários, os ovidutos, o útero, a cérvix uterina, a vagina e a genitália externa; os ovários possuem funções hormonais endócrinas, com a produção de esteroides, e exócrinas, na liberação de ovócitos, e é composto por duas partes: a medula, formada por tecido conjuntivo, nervos e vasos sanguíneos, e o córtex, onde os folículos ovarianos se desenvolvem (MAGOFFIN *et. al*, 2005). Nele estão presentes as ovogônias, e é a partir delas que os gametas femininos são formados, dando início à primeira divisão meiótica que será interrompida na prófase da meiose I (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Importante ressaltar que a reserva folicular feminina é limitada, pois nenhuma ovogônia é produzida após o nascimento (MOORE *et. al*, 2020). O recrutamento de folículos primordiais que ainda não começaram a crescer para um conjunto de folículos em desenvolvimento tem início durante a fase embrionária, logo após os folículos primordiais

terem sido formados no ovário, e continua até que a população folicular esteja esgotada (MAGOFFIN *et. al*, 2005).

Após a ativação da foliculogênese, as células da granulosa tornam-se cuboides nos folículos primordiais e se proliferam para formar as multicamadas das células somáticas que estão presentes nos folículos secundários; após a puberdade, as gonadotrofinas estimulam o crescimento folicular e a formação de uma cavidade preenchida com fluido formando o folículo antral (DEAN, 2002). Os ovócitos ficam retidos por suas interações com as células da granulosa até o estágio pré-ovulatório, momento em que avançam para a metáfase da meiose II em antecedência da ovulação e posterior fertilização (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Quando o indivíduo atinge a maturidade sexual, ocorre o amadurecimento do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal; a partir dessa fase, a cada ciclo ovulatório, folículos antrais são recrutados para o crescimento com a finalidade de permitir o desenvolvimento do ovócito e a ovulação (CARRILHO, 2013). A reprodução nos mamíferos é regulada por uma combinação de atividades interligadas entre o sistema nervoso central (SNC), tecidos secretórios, células-alvo e hormônios; esse sistema é responsável por receber informações do ambiente onde está o animal e enviar informações reprodutivas para as gônadas via eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal, e receber informações de taxas hormonais, formando um sistema de *feedback*, que regula sua atividade (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Esse sistema de *feedback* atua da seguinte forma: os neurônios endócrinos do hipotálamo produzem o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) a partir de um estímulo do SNC, que atua nas células do eixo para secretar o Hormônio Foliculo Estimulante (FSH), responsável pelo desenvolvimento folicular, e o Hormônio Luteinizante (LH), responsável pela maturação desses folículos e pela síntese de androstenediona, que será convertida em estradiol pela influência do FSH nas células da granulosa do folículo,

exercendo um *feedback* positivo no hipotálamo e na pituitária; quando o estradiol ultrapassa certo nível, o hipotálamo responde com um pico de GnRH, que induz um pico de LH e assim inicia-se a ovulação (PTASZYNSKA, 2007).

O sistema reprodutivo feminino é bastante complexo e o melhor entendimento de como a reprodução é regulada possibilita o desenvolvimento de biotécnicas que ajudem a aprimorar as diversas etapas que estão envolvidas, desde a produção dos gametas até a fertilização e desenvolvimento do embrião e conseqüentemente, a superar casos de infertilidade (GRAHAM *et. al*, 2023).

2.2. Biotecnologias reprodutivas aliadas à preservação da fertilidade

Um dos desafios enfrentados pela medicina reprodutiva contemporânea é a infertilidade, que é considerada um problema de saúde comum, com diversas causas, que atinge milhões de pessoas no mundo e que frequentemente possui conseqüências devastadoras (COX *et. al*, 2022). Nesses casos, são utilizadas TRA que incluem tratamentos para infertilidade nos quais os gametas ou embriões são manipulados para promover a gestação e o nascimento de uma prole saudável (GRAHAM *et. al*, 2023).

Dentre as TRA, a Inseminação Artificial é a mais simples e consiste na deposição manual do sêmen no trato reprodutivo feminino, facilitando o encontro dos gametas (ovócito e espermatozoide) (MORRELL, 2011). Esse procedimento tem baixo custo e possui bons resultados, a depender da causa da infertilidade associada, mas necessita de um criterioso e rígido controle das etapas envolvidas, como por exemplo o processamento do sêmen (GONÇALVES *et. al*, 2021).

Outra TRA bastante utilizada é a FIV, que também é uma opção de tratamento para a infertilidade; nela, ovócitos maduros são retirados dos ovários, cultivados *in vitro* juntos ao

espermatozoide para que ocorra a fertilização e os embriões resultantes são transferidos para o útero. Entretanto, para que isso ocorra, é necessária a estimulação ovariana com a combinação de diversos hormônios que induzem a ovulação, por isso, não é indicada a todas as pacientes, visto que pode levar à síndrome da hiperestimulação ovariana (PALOMBA *et. al*, 2023).

Similarmente à FIV, a ICSI também utiliza ovócitos maduros e espermatozoides coletados, a diferença é que nela um único gameta masculino é injetado diretamente dentro do ovócito, facilitando a passagem pela zona pelúcida; é a TRA mais utilizada (cerca de 66,5% das clínicas de reprodução a utilizam) e é indicada principalmente para a infertilidade masculina, em que a contagem espermática é baixa ou os parâmetros do sêmen estão anormais, como por exemplo a motilidade (HADDAD *et. al*, 2021).

Após a FIV e a ICSI, os embriões produzidos podem ser cultivados *in vitro* para acompanhar o seu desenvolvimento e selecionar os melhores blastocistos para posterior transferência embrionária, baseando-se em características morfológicas (KIM *et. al*, 2021). Diversas pesquisas têm sido feitas utilizando embriões de bovinos (ARIAS *et. al*, 2022), cavalos (CLAES & STOUT, 2021), cães (MALANSKI *et. al*, 2024) e até mesmo de leões (ZAHMEL *et. al*, 2022) e camelos (WANI, 2021).

Os embriões possuem uma grande plasticidade e são capazes de se desenvolver em meios com diferentes composições, que vão de simples soluções salinas balanceadas até sistemas complexos contendo soro e células somáticas (LONERGAN & FAIR, 2013). A produção *in vitro* ocasiona estresse mecânico aos embriões, por serem manipulados diversas vezes, além das mudanças no pH e na osmolaridade, que podem afetar a sua qualidade; pesquisadores vêm desenvolvendo sistemas microfluídicos com a utilização de microchips que simulam as condições do ambiente *in vivo* para que os embriões passem por menos

manipulações, aprimorando a maturação *in vitro* de embriões (WHEELER & RUBESSA, 2017; TALEBJEDI, *et. al*, 2021).

As TRAs também podem ser utilizadas na medicina reprodutiva animal, tendo diversas aplicações e vantagens, como por exemplo o aumento da produção e o melhoramento genético em animais de rebanho (com a seleção de machos doadores de espermatozoides com um alto mérito genético para fêmeas superiores), o controle de doenças contagiosas, a reprodução de animais em diferentes espaços geográficos e também a conservação de diversas espécies ameaçadas de extinção (SOBOLEWSKI, 2020).

Nas últimas décadas, emergiu uma tecnologia de edição gênica conhecida como CRISPR, em que caspases clivam uma sequência-alvo específica de ácidos nucleicos (NAKAMURA *et. al*, 2021), que permitem assim a manipulação genética com uma alta eficiência, especificidade e precisão (LIU *et. al*, 2022). Ela também tem sido utilizada na área reprodutiva, melhorando o conhecimento dos genes e do desenvolvimento do controle pré-implantacional, muito ligado aos casos de infertilidade, além de poder controlar a função genética em embriões (PLAZA REYES *et. al*, 2017). Há estudos com embriões de bovinos (DAIGNEAULT *et. al*, 2018), embriões de camundongos (YASUE *et. al*, 2014), ovócitos de ovelhas (VILARINO *et. al*, 2017), dentre outros. Além disso, em 2015 foi noticiado o primeiro caso de edição gênica utilizando CRISPR-Cas9 em um embrião humano, o que ocasionou diversos debates acerca dos limites socialmente aceitos da ciência (LIANG *et. al*, 2015).

Apesar de promissor, é importante salientar que o avanço das biotecnologias reprodutivas encontra limitações relacionadas à bioética, que visa impedir os abusos nas experimentações animais e humanas e a manipulação desenfreada de embriões, como por exemplo a clonagem e a manipulação gênica, pois, a depender de como são empregadas,

podem afetar negativamente a sociedade, devendo-se analisar as vantagens e as desvantagens do emprego de certas tecnologias ou experimentos (GONÇALVES *et. al*, 2021). Uma frequente discussão ética está relacionada ao destino de embriões criopreservados e que estão supranumerários resultantes das TRAs, se eles poderiam ser doados para pesquisas ou descartados, de acordo com a sua qualidade, o desejo da paciente e as legislações envolvidas (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2022).

Os gametas e embriões utilizados nessas técnicas podem ser frescos, refrigerados ou congelados. A criopreservação de gametas ocorre há décadas e é uma boa maneira de se preservar a fertilidade, sendo o espermatozoide o primeiro a ser congelado; em 1953 aconteceu a primeira criopreservação bem sucedida de espermatozoides humano (BUNGE & SHERMAN, 1953). Alguns anos depois, Chen (1986) relatou o primeiro caso de criopreservação de sucesso de ovócitos humanos e que levou ao nascimento bem sucedido de gêmeos após uma FIV. O tecido ovariano também pode ser criopreservado e posteriormente transplantado, sendo que em 2004 houve o registro de nascimento vivo em humanos a partir dessa técnica (DONNEZ *et. al*, 2004). Os embriões são frequentemente congelados e o início se deu com a criopreservação de embriões de camundongos em 1972 por congelamento lento e que resultou em nascimentos vivos (WHITTINGHAM *et. al*, 1972).

2.2.1. A criopreservação como recurso para a preservação da fertilidade

A criopreservação é uma técnica que utiliza temperaturas ultra baixas para fazer o armazenamento de amostras, como células, tecidos e órgãos em nitrogênio líquido à -196°C; ela atua na diminuição do metabolismo e, em condições adequadas, aumenta a longevidade e proporciona estabilidade a células vivas (DAY *et. al*, 2008). Isso acontece porque, graças a esse processo, todas as atividades biológicas são descontinuadas – inclusive as reações

biológicas que levam à morte celular e à degradação do DNA (BOZKURT, 2018). O sucesso da utilização dessa técnica para conservar amostras biológicas vem sendo aperfeiçoada a cada ano, graças ao maior entendimento dos processos físicos e químicos da água que ocorrem durante os ciclos de congelamento e descongelamento (BOZKURT, 2018).

A água existe em quatro estados físicos: líquido, sólido, vapor e vítreo; sua formação é influenciada principalmente pela temperatura. É comum acreditarmos que a água congele à temperatura de 0°C, mas isso é raro e na falta de condições que permitam a agregação das moléculas de água, ela pode congelar em temperaturas bem abaixo de zero (DAY *et. al*, 2008).

As complexas mudanças transicionais que a água sofre em baixas temperaturas são determinantes para que a criopreservação seja bem-sucedida, influenciando na sobrevivência da amostra e na eficácia da crioproteção; isso se deve principalmente às suas propriedades químicas, térmicas, coligativas e osmóticas, que são particulares das moléculas de água (DAY *et. al*, 2008). Mazur (1963) descobriu que a taxa da mudança de temperatura é importante porque ela controla o transporte de água pela membrana celular e, conseqüentemente, atua de forma indireta na probabilidade da formação de gelo intracelular.

Para prevenir a morte celular na conservação de amostras, a temperatura costuma ser reduzida para evitar que isso ocorra, porém a taxa de congelamento também afeta a sobrevivência celular, pois pode resultar na desidratação, caso a amostra seja colocada em uma solução hipotônica, ou na formação de gelo intracelular, durante a redução da temperatura (BHATTACHARYA, 2018).

As crioinjúrias são conhecidas por serem fatores danosos às células e a tolerância à criopreservação depende da habilidade de superá-las ou evitá-las (DAY *et al*, 2008). Esse é um dos principais problemas que devem ser controlados para manter a membrana celular

inalterada e, conseqüentemente, a viabilidade das amostras utilizadas (BOZKURT, 2018), e é capaz de causar principalmente danos osmóticos e estruturais às estruturas celulares mais frágeis (DAY *et. al*, 2008).

O resfriamento de amostras durante o processo de criopreservação pode levar à formação de cristais de gelo, que podem ser letais para as células (DALWADI *et. al*, 2020). É um princípio comum que uma célula, na ausência de atividade metabólica, ajuste sua concentração interna de água e de solutos permeáveis para que fique em equilíbrio com o meio externo, levando-a a responder à desidratação osmótica durante o congelamento causado pela nucleação e crescimento de gelo formado extracelularmente (HUNT, 2017).

Outro fator que causa danos às células é o estresse oxidativo, já que os processos de congelamento e descongelamento podem afetar negativamente as estruturas celulares, como DNA, proteínas e lipídeos, pois há aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (TATONE *et. al*, 2010). Quando há um desbalanceamento entre a quantidade de EROs que é formada e dos fatores antioxidantes produzidos pelas células, ocorre esse fenômeno. Essa injúria coligativa pode estar associada ao excesso de concentrações de solutos crioprotetores, ou também ao reparo dos danos causados às células durante a criopreservação, já que há um aumento na produção de energia para que isso ocorra (ODANI *et. al*, 2003).

Para evitar essas lesões celulares, são utilizados agentes crioprotetores (ACP), que atuam diminuindo o ponto de congelamento do citosol e do meio, interferindo no processo pelo qual os cristais de gelo são formados (DALWADI *et. al*, 2020). Isso ocorre porque esse tipo de produto aumenta a concentração dos solutos, já que a quantidade de gelo que será formada em determinada temperatura depende da composição inicial da solução em que a amostra será inserida (KARLSSON & TONER, 1996).

O que eles fazem é, basicamente, depois de se dissolverem na solução protetora, diminuir o ponto de fusão da solução, de modo que as amostras podem se congelar em sua volta, mas não internamente, sendo os ACP mais utilizados o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO), em uma concentração de 5 a 15%, que ajudam a formar grandes bolsos de descongelamento, prevenindo assim as crioinjúrias e danos estruturais (BHATTACHARYA, 2018).

Em uma solução parcialmente congelada, a concentração total dos solutos na fração descongelada é fixa e independe da natureza dos solutos; como o efeito danoso dos sais utilizados nas soluções está relacionado diretamente à concentração, ao reduzir essa concentração pela substituição de uma parte dos solutos danosos em uma solução parcialmente congelada com ACP, resultará em menos danos às amostras em qualquer temperatura abaixo de zero (HUNT, 2017).

Os ACP são classificados como penetrantes ou não penetrantes; o primeiro diz respeito aqueles que conseguem entrar nas amostras e seu papel principal é reduzir a formação de gelo e a desidratação celular, isso porque são pequenas moléculas não iônicas com alta solubilidade em água que podem se difundir livremente pela membrana plasmática e se equilibrar no compartimento intracelular (HUNT, 2017). Já o segundo tipo de crioprotetor não consegue entrar na célula pois tem um tamanho molecular maior e age inibindo a formação de gelo, porém é bem mais tóxico se comparado aos penetrantes na mesma concentração (BHATTACHARYA, 2018).

Os dois tipos de ACP são frequentemente usados juntos na composição das soluções, como, por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO) ou Etilenoglicol (EG), atuando como penetrantes, e a Polivinilpirrolidona (PVP), como não penetrante (DAY *et. al*, 2008) Sem a utilização adequada desses agentes, as células se rompem devido a uma injúria do efeito da

solução, na qual a solução residual das células alteram a forma, sua força mecânica e é seguido por uma oscilação osmótica durante a desidratação no processo de resfriamento (BHATTACHARYA, 2018), já que os sistemas biológicos possuem diversas barreiras para a livre difusão de solutos (membranas), que podem resultar em mudanças nos volumes dos compartimentos celulares; se excessivas, elas podem ser prejudiciais (PEGG, 2009).

A cinética da resposta à saída de água das células durante o processo de criopreservação depende de alguns fatores, como a taxa de congelamento, a permeabilidade de membrana celular à água e a superfície/volume celular (HUNT, 2017). A criopreservação é feita usando duas principais técnicas que estão diretamente ligadas ao uso dos ACP: o congelamento lento e a vitrificação; elas se diferem principalmente quanto ao tempo de redução da temperatura durante o processo de congelamento e quanto à concentração de crioprotetores que serão utilizados para evitar danos às amostras (DAY *et. al*, 2008).

O congelamento lento (CL) é feito com a redução gradual da temperatura, permitindo que a água saia aos poucos da célula, assim ela consegue restabelecer o equilíbrio osmótico com o meio extracelular (HUNT, 2017). Neste método são utilizados ACPs em concentrações mais baixas e normalmente os protocolos baseados no controle do congelamento utilizam crioprotetores coligativos sozinhos ou combinados com aditivos osmóticos, além de ser necessário o controle da cristalização do gelo extracelular, feito por um processo conhecido como nucleação ou *seeding*, que é o ponto onde os cristais de gelo se formam (DAY, 2008).

No CL a temperatura da amostra é reduzida em 2°C por minuto até atingir entre -4 e -9°C, sendo mantida por aproximadamente 15 minutos para alcançar uma estabilidade térmica, na qual o *seeding* é feito de modo manual para evitar o resfriamento e a desidratação excessivos (DOS SANTOS, 2007). Durante o processo, a temperatura continua sendo reduzida a -0,3°C por minuto, permitindo que a água saia lentamente e evitando um

resfriamento exagerado, ocasionando o congelamento intracelular entre -30 e - 80°C (MAZUR, 1984)

A vitrificação é uma alternativa para o CL e é um processo que utiliza altas concentrações de ACP e reduz rapidamente a temperatura, para isso é necessário que a célula armazene uma alta viscosidade crítica para que na sua exposição a temperaturas congelantes, a água entre em estado vítreo, que é um líquido solidificado mais viscoso que é amorfo, metaestável e não cristalino, e que são menos danosos às células pois não possuem uma estrutura organizada, se comparado ao gelo (DAY *et. al*, 2008).

Nessa técnica, um dos problemas associados é a utilização de altas concentrações de soluções crioprotetoras, que podem danificar as células devido à toxicidade química desses compostos e ao choque osmótico, já que o movimento compensatório de saída da água pode ser insuficiente; apesar disso, ela evita completamente a formação de gradientes de concentração durante a cristalização, além de evitar injúrias osmóticas associadas com a cristalização (YAVIN & ARAV, 2007).

Para que as amostras sejam viáveis após o descongelamento, é necessário que os protocolos estejam associados às taxas de congelamento e às estratégias crioprotetoras, visto que eles estão diretamente relacionados com o sucesso da criopreservação, já que o reaquecimento das amostras também pode influenciar no sucesso da sobrevivência celular no processo de criopreservação (DAY *et. al*, 2008). Hunt (2017) evidencia que quanto mais rápido esse processo, melhor para a amostra, já que previne ou evita uma recristalização do gelo formado e diminui assim a possibilidade de causar mais danos.

Quando um crioprotetor penetrante é removido pela exposição das células a uma menor concentração do componente, a captação osmótica de água faz com que as células inchem acima do seu volume inicial e depois encolhem à medida que o ACP sai acompanhado

de água suficiente para manter o equilíbrio osmótico; geralmente as células são mais sensíveis ao aumento do volume celular do que a redução, por isso a remoção dos crioprotetores é mais sensível do que a adição (DAY *et. al*, 2008).

Na área reprodutiva, a criopreservação vem sendo muito utilizada em tratamentos de infertilidade, principalmente com o congelamento de gametas. As primeiras células reprodutivas a serem congeladas com sucesso foram os espermatozoides e até hoje continuam sendo as mais fáceis de se criopreservar, devido à pouca quantidade de citoplasma e, conseqüentemente, de água em seu interior (BOZKURT, 2018).

Nos canídeos, as técnicas de criopreservação tem sido usadas para congelar sêmen (BUNYAGA & KASHOMA, 2017), ovócitos (WAKASA *et. al*, 2017), embriões (ABE *et. al*, 2011) e tecido ovariano (ISHIJIMA *et. al*, 2006), sendo boas tecnologias reprodutivas que permitem otimizar a utilização de recursos genéticos em programas de reprodução animal, além da criação de bancos genéticos (em casos de espécies raras ou ameaçadas) e no aprimoramento de abordagens clínicas para a infertilidade (ABE *et. al*, 2011).

2.2.1.1. A criopreservação de tecido ovariano

A preservação do potencial reprodutivo feminino é possível por meio da criopreservação de ovócitos, embriões e tecido ovariano (ARAPAKI *et. al*, 2022). Um dos benefícios do congelamento do tecido se refere à manutenção da fertilidade de pacientes oncológicas, já que a quimioterapia e a radioterapia podem levar a uma gonadotoxicidade e causar danos aos ovários e à depleção de ovócitos, diminuindo o potencial reprodutivo; além disso, esse é o único método que pode ser utilizado para meninas pré-purberes (LADANYI *et. al*, 2017).

Essa técnica é realizada por meio de uma laparoscopia, procedimento cirúrgico pouco invasivo de retirada dos ovários, seguido por remoção de todo o córtex ou de pequenos fragmentos ovarianos, que serão posteriormente conservados em nitrogênio líquido (ARAPAKI *et. al*, 2022).

O ovário é uma estrutura complexa e é composto por diferentes tipos de células, por isso, ao se comparar com ovócitos ou embriões, a criopreservação de tecido ovariano é mais sofisticada já que os diferentes tipos celulares necessitam de variadas requisições para uma boa sobrevivência após o processo de congelamento e descongelamento (SEGINO *et. al*, 2005). Apesar disso, a criopreservação desse tecido se mostra eficaz para a manutenção da fertilidade pois o seu córtex é rico em folículos primordiais, que são menos suscetíveis aos danos causados durante o processo de criopreservação já que são pequenos e pouco desenvolvidos, possuem poucas organelas, não possuem zona pelúcida e serem quiescentes metabolicamente (GOSDEN *et. al*, 1994). Em humanos, o congelamento lento é mais utilizado para preservar esse tipo de tecido, apesar de não haver significativas diferenças entre as duas técnicas de criopreservação na quantidade de folículos primordiais (SHI *et. al*, 2017).

A vitrificação de tecidos ovariano implica diretamente na sua qualidade, principalmente pelo dano proveniente do estresse oxidativo causado pela alta concentração de crioprotetores e que leva a um desbalanceamento do sistema de defesa antioxidante, resultando em uma grande quantidade de EROs que afetam diversas estruturas, como a membrana plasmática e o DNA, além da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas (DOS SANTOS MORAIS *et. al*, 2019). Pesquisas vêm sendo feitas para aprimorar a utilização de antioxidantes que diminuem a formação de EROs com diversos compostos como o ácido ascórbico (COSTA *et. al*, 2025), a melatonina (LIU *et. al*, 2020), a quercetina (CEREZETTI *et. al*, 2021) e o cloreto de zinco (HICKS *et. al*, 2021).

A influência do tempo de armazenamento durante a criopreservação na qualidade tecidual e na recuperação das atividades ovarianas após o reaquecimento já foi uma preocupação, entretanto Campos (2011) demonstrou que o armazenamento por um curto período (30 dias e 180 dias) não impacta nessa posterior recuperação, além de ter sido provado que o armazenamento por longos períodos também não impede a retomada da atividade do ovário (FABBRI *et. al*, 2016), inclusive com a avaliação de tecido ovariano armazenado em nitrogênio líquido por mais de uma década com a manutenção da qualidade tecidual (KRISTENSEN *et. al*, 2018; FABBRI *et. al*, 2016).

Ao longo dos anos, vários modelos animais têm sido utilizados em pesquisas com a criopreservação de tecido ovariano, como camundongos (YOUM *et. al*, 2014), vacas (SUGISHITA *et. al*, 2022), ovelhas (DAVIS *et. al*, 2021), cadelas (ISHIJIMA *et. al*, 2006; LOPES *et. al*, 2016), gatas (SILVA *et. al*, 2024), macacas (GADEK *et. al*, 2024) e humanos (KRISTENSEN *et. al*, 2018; DONNEZ *et. al*, 2004).

A criopreservação de tecido ovariano é uma boa alternativa para os tratamentos que requerem estimulação ovariana, representando uma estratégia promissora para preservar a função reprodutiva e a atividade esteroideogênica em pacientes com grande risco de falência ovariana prematura (FABBRI *et. al*, 2016), ou para a criopreservação de ovócitos, principalmente em meninas pré-púberes, já que essa estimulação e subsequente remoção ovocitária não é viável nessa idade, principalmente devido à natureza invasiva do método, virgindade e problemas de imaturidade das pacientes (DOLMANS *et. al*, 2021). Além disso, também é uma biotecnologia importante para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, podendo ser usada para a criação de bancos de germoplasma (SANTOS *et. al*, 2010).

Após o reaquecimento do tecido, é necessário que se avalie a retomada das funções endócrinas e reprodutivas, para isso, podem ser utilizadas duas técnicas: o transplante (AMORIM *et. al*, 2019) e o cultivo *in vitro* de tecido ovariano (FILATOV *et. al*, 2016).

2.2.1.2. Transplante de tecido ovariano

A criopreservação de tecido ovariano associada ao seu posterior transplante vem sendo estudada já há alguns anos, sendo o primeiro experimento realizado em 1954 com ovário de rata sendo transplantado em uma outra rata para demonstrar a restauração de sua funcionalidade (DEANESLY, 1954). O primeiro transplante de tecido ovariano humano foi realizado em 1999 (OKTAY & KARLIKAYA, 2000) e, poucos anos depois, em 2004, foi relatado o primeiro nascimento vivo resultante desse procedimento (DONNEZ *et. al*, 2004).

A criopreservação e o transplante de tecido ovariano podem ser usados para restaurar a fertilidade de mulheres que passaram por diversos tratamentos, como quimioterápicos e radioterápicos, ou que possuem doenças genéticas que causem a perda folicular prematura (HORNSHØJ *et. al*, 2021). A estrutura do ovário é adequada para o armazenamento tecidual, pois os folículos primordiais são abundantes, seu desenvolvimento folicular é quiescente e eles estão localizados periféricamente (LIU *et. al*, 2002).

A função ovariana pode ser afetada devido a uma redução na reserva ou a um dano direto no tecido ovariano remanescente (AMORIM *et. al*, 2019). A maior perda folicular em tecidos ovarianos criopreservados não ocorre durante o processo de congelamento e descongelamento, mas sim no período de isquemia após o transplante (LIU *et. al*, 2002), isto é, o período em que o tecido fica sem vascularização, já que o ovário é um órgão altamente vascular para a produção de gametas, portanto, quanto maior o tempo sem receber o suporte sanguíneo, maior a perda folicular (YIN *et. al*, 2003).

Em humanos, é necessário entre 4 a 6 meses para que os folículos quiescentes alcancem o estágio pré-ovulatório depois do transplante (HORNSHØJ *et. al*, 2021), já que o processo de foliculogênese leva aproximadamente esse mesmo tempo, durante o qual o ovócito e as células somáticas que o circundam passam por diversas mudanças que eventualmente resultam no desenvolvimento de um grande folículo antral, capaz de produzir um ovócito maduro (GOUGEON, 1996).

Além disso, o transplante pode ser classificado como ortotópico ou heterotópico, de acordo com o local onde ele será inserido; o primeiro diz respeito ao que é reinserido em seu local natural, no ovário, ou em um local bem próximo com uma condição ambiental similar (peritônio pélvico ou ligamento largo); já no segundo, o tecido é implantado em um local diferente do natural, como por exemplo o antebraço, parede abdominal, espaço subperitoneal e peitoral (AMORIM *et. al*, 2019). O autotransplante de ovário inteiro de humanos é desafiador se comparado ao de animais de tamanhos menores, isso se deve principalmente à sua grande superfície, já que os agentes crioprotetores não conseguem penetrar no tecido (DONNEZ *et. al*, 2010).

O uso de tecido ovariano criopreservado e transplantado vem sendo utilizado ao longo do tempo em diversas pesquisas com diferentes espécies, como murinos (SHAW & TROUNSON, 2002; RODRIGUES, 2021), equinos (SOUZA *et. al*, 2021), felinos (VILELA *et. al*, 2019; PAULINI *et. al*, 2021), caninos (WAKASAKA *et. al*, 2017) e ovinos (ARAV *et. al*, 2005; CAMPBELL *et. al*, 2014).

2.2.1.3. Cultivo *in-vitro* de tecido ovariano

Outra estratégia de preservação da fertilidade feminina é o cultivo *in vitro*, em que podem ser utilizados todo ovário, fragmentos do tecido ou apenas os folículos; os fragmentos

podem ser obtidos pela dissecação do tecido cortical, onde se encontram os folículos ovarianos em diferentes estágios, mas com os primordiais em maior quantidade (FILATOV *et. al*, 2016).

O cultivo pode ser feito na forma 2D ou 3D. No primeiro caso, os sistemas 2D apresentam baixa correspondência com as condições *in vivo*, causando perda da forma dos folículos e do ambiente celular dos ovócitos, sendo regulados apenas por agentes químicos (fatores de crescimento, hormônios, dentre outros); já os sistemas 3D permitem um maior controle das condições do tecido ovariano que está sendo cultivado, combinando agentes químicos e ajustes nas propriedades físicas do microambiente (FILATOV, 2016).

Um dos principais benefícios dessa técnica com o uso de tecido ovariano diz respeito à diminuição ou à eliminação do risco do reimplante de células cancerígenas que possam ter se estabelecido no ovário de pacientes oncológicas, o que é possível no caso de transplante do tecido (RODRIGUES *et. al*, 2006). Além disso, tem sido demonstrado que o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos de murinos podem levar à formação de ovócitos maduros capazes de passarem por fertilizações de sucesso e posterior desenvolvimento (FILATOV *et. al*, 2016; TELFER & ANDERSEN, 2021).

Apesar de ser um bom método, o cultivo *in vitro* utilizando todo o ovário ou seus fragmentos possui desvantagens, uma delas diz respeito à dificuldade de entregar oxigênio e nutrientes nas camadas mais internas do tecido, sendo melhor o uso de folículos ovarianos isolados, já que, nesse caso, é possível visualizar o desenvolvimento de cada um (FILATOV *et. al*, 2016). Os folículos obtidos de tecidos ovarianos criopreservados são menores nos que foram cultivados do que nos frescos, além de terem uma menor taxa de desenvolvimento naqueles que passaram pelo processo de congelamento (SEGINO *et. al*, 2003; RODRIGUES *et. al*, 2006).

A otimização das condições do cultivo *in vitro* para fragmentos de tecido ovariano criopreservados e descongelados representa uma etapa crítica para as estratégias de preservação da fertilidade (MARCOZZI *et. al*, 2025), já que os métodos em desenvolvimento ainda não estão 100% consolidados, além de serem necessários protocolos padronizados para a melhor obtenção de ovócitos viáveis para a fertilização *in vitro*, mas tem potencial para ser uma opção de preservação da fertilidade em meninas e mulheres (FILATOV *et. al*, 2016; TELFER & ANDERSEN, 2021). Diversos estudos vêm sendo realizados para estabelecer protocolos melhores com o uso de tecido de diferentes espécies com bons resultados para a sobrevivência dos folículos, como em humanos com uma taxa de 20% de sobrevivência (BJARKADOTTIR, *et. al*, 2021), equinos com uma taxa de 23,8% de sobrevivência (AGUIAR *et. al*, 2020) e caninos com uma taxa de 34,1% de sobrevivência (LUZ *et. al*, 2025).

Para a obtenção de melhores resultados, diversos estudos têm utilizado, além de suplementos convencionais no o meio de cultura, como FSH (AGUIAR *et. al*, 2016) e insulina (PAES *et. al*, 2018), os fatores de crescimento, que podem auxiliar na sobrevivência e na recuperação folicular. Dentre eles, é possível citar o IGF, que é produzido nas células da granulosa e está associado ao remodelamento do antro e o crescimento de folículos saudáveis (WANDJI *et. al*, 1998; SPITSCHAK & HOEFLICH, 2018); o EGF, que atua na maturação nuclear do ovócito, na aquisição de competência para o desenvolvimento e na expansão do *cumulus* (CONTI *et. al*, 2006); RICHANI & GILCHRIST, 2018), além do BMP15 e o GDF9 (LEITÃO *et. al*, 2014), que atuam diretamente no crescimento desses folículos.

2.2.2. O uso dos fatores de crescimento BMP15 e GDF9 para preservação da fertilidade

Dentre os fatores de crescimento relacionados ao desenvolvimento folicular, o BMP15 e o GDF9 estão relacionados com a comunicação bidirecional entre o ovócito e as células da granulosa no ovário, que consiste na troca de nutrientes e sinais que influenciam no crescimento e na diferenciação de ambas as células somáticas e o ovócito por uma complexa rede regulatória de fatores autócrinos, parácrinos e justácrinos (EPPIG, 2001). Nesse processo, os ovócitos são considerados os principais condutores para o desenvolvimento, pois é a partir do tempo de organização folicular que é orquestrado seu desenvolvimento, controlando a diferenciação das células da granulosa em células que produzem os compostos adequados para o seu crescimento, como proteínas e esteroides, levando a um aumento na capacidade de resposta a gonadotrofinas, na diferenciação de células da teca, na expansão do cumulus e na ruptura final da parede folicular (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Já as células da granulosa são necessárias para o crescimento do ovócito, para a diferenciação, para o status nuclear meiótico, para a maturação do citoplasma e para a atividade gênica transcricional (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Os produtos gênicos expressos nos ovócitos desempenham um importante papel na foliculogênese, fertilização e desenvolvimento pré-implantacional. Um exemplo é o Fator da Linha Germinativa Alfa (FIG α) que atua na formação da zona pelúcida, sua ausência resulta na impossibilidade de formar folículos primordiais em ratos fêmeas, levando a uma grande degradação de ovócitos e esterilidade (DEAN, 2002).

Dois membros relacionados à superfamília de Fator de Crescimento Transformador (TGF) e que são derivados de ovócitos, o Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF9) e a Proteína Morfogenética Óssea (BMP15) foram descritos primariamente na década de 90 e demonstraram ser essenciais para o desenvolvimento folicular ovariano (JUENGEL *et. al*, 2004). Eles possuem um papel fundamental no controle da função ovariana, modulando o

destino celular das células somáticas da granulosa (CG) e a qualidade e a competência do desenvolvimento ovocitário (BELLI & SHIMASAKI, 2018).

Os fatores BMP15 e GDF9 são expressos principalmente em ovócitos de folículos em crescimento, sendo que a expressão de GDF9 é anterior a do BMP15, pois pode ser detectado em folículos primordiais (SHIMASAKI *et. al*, 2004); quando não são expressos, os ovários conseguem formar os folículos primordiais mas eles não evoluem desse estágio, causando infertilidade feminina (DEAN, 2002).

Otsuka (2000) descobriu que o fator de crescimento BMP15 é um potente regulador da mitose celular, sendo que as células da granulosa são alvos para os ligantes de BMP15 e que as vias de sinalização do receptor de BMP15 nas células da granulosa são funcionalmente acopladas à replicação do DNA/proliferação celular e à modulação da ativação de FSH.

O GDF9 possui um padrão de expressão ovocitária específica similar ao do BMP15, possuindo diversas funções nas células da granulosa durante a foliculogênese, principalmente no aumento da proliferação dessas células e na síntese de DNA, e de ser um estimulador esteroideogênico, produzindo níveis basais de estradiol e progesterona (VITT *et. al*, 2000), além de aumentar o diâmetro e o conteúdo proteico de folículos pré-antrais (HAYASHI *et. al*, 1999).

Estudos demonstram que o uso desses fatores de crescimento, BMP15 e GDF9 pode estimular o desenvolvimento de folículos primordiais em cultivo *in vitro* pela estimulação das células da granulosa em humanos e murinos (KEDEM *et. al*, 2011; READER *et. al*, 2011) e que mutações na expressão gênica de BMP15 pode levar à infertilidade (GALLOWAY *et. al*, 2000). Quando suplementado com GDF9, o tecido ovariano cultivado *in vitro* manteve a sobrevivência folicular em equinos (MARINO *et. al*, 2019), além de promover a ativação de folículos primordiais em humanos (HREINSSON *et. al*, 2002), caprinos (MARTINS *et. al*,

2008) e bovinos (TANG *et. al*, 2012), além de reduzir a atresia em murinos (ORISAKA *et. al*, 2006) e caprinos (ALMEIDA *et. al*, 2011).

Para incrementar a ação desses fatores nos tecidos ovarianos, eles podem ser concentrados em matrizes de hidrogel em sistemas tridimensionais que mimetizam mais fielmente a arquitetura e o arranjo espacial folicular no tecido, permitindo a manutenção da sua estrutura fisiológica e da sua integridade funcional (MORSELLI *et. al*, 2017; PARK *et. al*, 2021).

2.2.3. Matrizes de hidrogel na biotecnologia reprodutiva

Uma das biotecnologias que podem ser usadas para melhorar os resultados de pesquisas feitas com a manutenção da viabilidade folicular está associada à utilização de matrizes de hidrogel, isso porque seu sucesso está relacionado à sua simplicidade para serem fabricadas, ao seu baixo custo para ser produzido e à sua alta adaptabilidade para entregar diferentes tipos de moléculas ativas (CACCAVO *et. al*, 2014).

Os hidrogéis são uma rede hidrofílica de polímeros que são vítreos quando estão desidratados, porém, quando há adição de água, eles formam géis elásticos (LEE, 1985). Eles podem absorver de 10-20% até milhares de vezes o seu peso seco de água; além disso, são quimicamente estáveis ou podem se degradar ou se dissolver (ROKHADE *et. al*, 2007).

O desenvolvimento hidrogéis como sistemas de entrega de moléculas baseado em polímeros naturais ganhou bastante notoriedade por sua aplicação de direcionamento passivo de substâncias e também pela liberação controlada desses compostos (HOSTE *et. al*, 2004). Peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e genes são componentes instáveis que precisam ser protegidos da degradação em ambientes biológicos (ROKHADE *et. al*, 2007); com a

utilização dos hidrogéis, esses compostos ficam protegidos e podem ser liberados gradualmente para o ambiente onde estão inseridos.

O Pluronic, conhecido como poloxâmico, é um copolímero tribloco de poli(óxido de etileno) e poli(óxido propileno) que possui diversas aplicações farmacêuticas; quando a temperatura da solução com o polímero aumenta, as cadeias com o copolímero se agregam em micelas esféricas, ficando um gel semi sólido à temperatura ambiente ou à temperatura corporal, estando ideal para a liberação controlada de compostos, e se torna líquido à uma temperatura entre 4 e 8°C. (ROKHADE *et. al*, 2007).

A engenharia tecidual vem ganhando uma grande notoriedade pelo uso desses géis na medicina regenerativa, já que eles conseguem mimetizar a matriz extracelular nativa dos tecidos, controlar o destino celular e suas funções, a modulação celular e a resposta tecidual contra o estresse oxidativo e a inflamação no ambiente tecidual, isso porque as células interagem com proteínas adesivas e fatores de crescimento da matriz extracelular através das integrinas e receptores que estão em suas superfícies (TOH & LOH, 2014; PARK *et. al*, 2021).

Já foram feitas pesquisas com o uso de matrizes de hidrogel para o cultivo 3D de ovócitos em felinos (MORSELLI *et. al*, 2017), humanos (ZHAO *et. al*, 2023), murinos (MATSUSHIGE *et. al*, 2022), além de células da granulosa em suínos (PARK *et. al*, 2021), de tecido ovariano criopreservado em caninos (THUWANUT *et. al*, 2021); e para o transplante com murinos (ZAND *et. al*, 2023) e humanos (CHITI *et. al*, 2022), todas elas demonstram a efetividade do uso da matriz por meio da sobrevivência e da retomada do crescimento folicular.

3. JUSTIFICATIVA

A preservação da fertilidade é extremamente importante e cada vez mais vem se tornando objeto de pesquisa por sua imensa contribuição, tanto para mulheres em processos de tratamento de câncer, em que há uma perda da função ovariana durante a quimioterapia (AMORIM et. al, 2019), quanto para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (LOPES et. al, 2016). Para isso, o conhecimento de eventos fisiológicos associados à reprodução é de suma importância, principalmente em canídeos, que possuem um processo de maturação ovocitária diferente de outras espécies (RAMIREZ et. al, 2020).

Em cadelas, a obtenção de ovócitos maduros é bastante desafiadora, pois normalmente eles são ovulados em estágios imaturos e necessitam ficar entre 48 e 72 horas no oviduto para que se complete a maturação nuclear (XU & FENG, 2017). Por isso, uma das formas de conservar essas espécies está relacionada à criopreservação do tecido ovariano para posterior obtenção de ovócitos viáveis (LOPES et. al, 2016).

A associação entre as TRAs – criopreservação de tecido ovariano, transplante e cultivo *in vitro* – com o uso de matriz de hidrogel enriquecida com os fatores de crescimento BMP15 e GDF9 pode ser uma ferramenta essencial para a preservação de espécies e para superar casos de infertilidade em fêmeas, já que atuam diretamente no desenvolvimento folicular. Apesar de ser promissora, a combinação dessas técnicas ainda é pouco relatada na literatura para essa espécie, portanto, o presente trabalho visa enriquecer o campo literário através da avaliação dos efeitos desses fatores nos folículos ovarianos dos canídeos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito dos fatores BMP15 e GDF9 livres, incorporados em matriz de hidrogel, na recuperação e viabilidade folicular de tecido ovariano criopreservado de cadelas após transplante ou cultivo *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- Analisar o desenvolvimento folicular em tecido ovariano criopreservado pós transplante e cultivo *in vitro* por meio de histologia clássica.
- Avaliar a viabilidade folicular pós transplante e cultivo de tecido ovariano criopreservado por marcadores imunohistoquímicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta de tecido ovariano e animais

Para a obtenção dos tecidos ovarianos, foram utilizadas 16 cadelas domésticas híidas submetidas à ovariectomia bilateral eletiva em clínicas de castração particulares de Brasília/DF. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução salina (0,9%) aquecida (37 °C) e imediatamente criopreservados.

Para receber os transplantes, foram utilizados 16 camundongos nude (*Swiss nu/nu*) fêmeas, com 19 semanas de idade, adquiridos do Biotério da Universidade Católica de Brasília. Os animais foram mantidos em mini-isoladores, em grupos de quatro, com temperatura ambiente controlada (24 °C) e ciclos claro-escuro de 12/12 horas. Os camundongos foram alimentados com ração padrão para roedores e acesso *ad libitum* a água autoclavada. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética

no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Processo SEI nº 23106.126845/2022-65) conforme certificado presente no Anexo I.

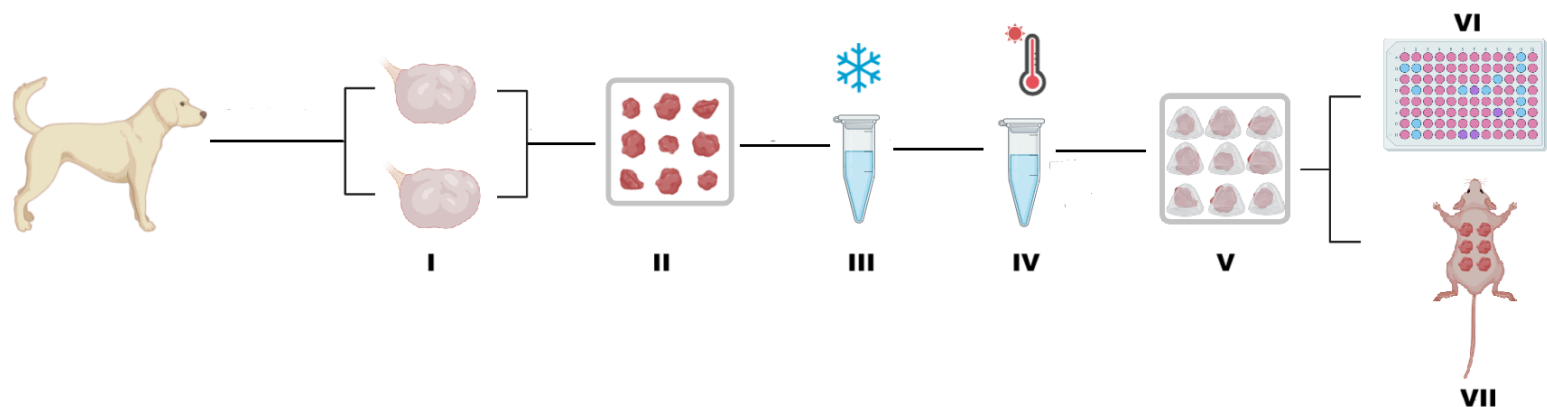
5.2. Delineamento Experimental

Cada ovário das 16 cadelas foi dividido em fragmentos de 3 mm³, resultando num total de 9 fragmentos por ovário (18 fragmentos por cadela) como mostra a Figura 1. No total, foram obtidos 288 fragmentos. Um fragmento ovariano de cada cadela foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% para o controle fresco (G1, n=16) e os demais foram imediatamente criopreservados por vitrificação e, após o reaquecimento, foram aleatoriamente distribuídos entre os seguintes grupos experimentais:

- Grupo 2 (G2) – Controle da Criopreservação: n = 16 fragmentos vitrificados, reaquecidos e imediatamente fixados em paraformaldeído 4%;
- Grupo 3 (G3) – Controle negativo: n = 64 fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 µL de matriz de hidrogel, sendo 32 fragmentos para o cultivo *in vitro* e 32 fragmentos para o transplante;
- Grupo 4 (G4) – BMP15 livre em matriz: n= 64 fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 µL de matriz de hidrogel com fator de crescimento BMP15 (10 ng/µL de matriz), sendo 32 fragmentos para o cultivo *in vitro* e 32 fragmentos para o transplante;
- Grupo 5 (G5) – GDF9 livre em matriz: n= 64 fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 µL de matriz de hidrogel com fator de crescimento GDF9 (10 ng/µL de matriz), sendo 32 fragmentos para o cultivo *in vitro* e 32 fragmentos para o transplante;

-Grupo 6 (G6) – BMP15 + GDF9 livre em matriz: n = 64 fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 μ L de matriz de hidrogel com fatores de crescimento BMP15 (10 ng/ μ L de matriz) e GDF9 (10 ng/ μ L de matriz), sendo 32 fragmentos para o cultivo *in vitro* e 32 fragmentos para o transplante.

Figura 1. Delineamento experimental.



Representação do delineamento experimental. Após a ovariectomia bilateral (n=16 cadelas), foram obtidos 9 fragmentos de 3mm³ do córtex de cada ovário (18 fragmentos por cadela), totalizando 288 fragmentos. Os fragmentos foram vitrificados, armazenados em nitrogênio líquido, descongelados e embebidos em matriz de hidrogel, com ou sem fatores de crescimento. Posteriormente, foram cultivados *in vitro* ou transplantedos. I: Obtenção de 2 ovários por cadela após ovariectomia bilateral. II: corte do córtex ovariano em fragmentos de 3mm³. III: vitrificação dos fragmentos. IV: reaquecimento dos fragmentos de tecido ovariano. V: fragmentos embebidos em matriz de hidrogel com ou sem fatores de crescimento (de acordo com o grupo experimental). VI: cultivo *in vitro*. VII: transplante em camundongos imunossuprimidos.

5.3. Vitrificação e reaquecimento do tecido ovariano

Os fragmentos de tecido ovariano foram criopreservados por meio da técnica de vitrificação, seguindo os procedimentos de Fujihara et al. (2019). Imediatamente após a coleta, três fragmentos distintos foram posicionados com distância de pelo menos 0,5cm entre eles em uma agulha (30G x ½). Em seguida, cada agulha contendo os fragmentos foi acondicionada em um criotubo contendo 1 ml de solução de equilíbrio (SE) (20% de Soro

Fetal Bovino (SFB) + 7,5% Etilenoglicol (EG) + 3,75% Dimetilsulfóxido (DMSO) + 1,25% Polivinilpirrolidona (PVP) em meio TCM- 199) por 10 minutos à 4 °C e depois foram transferidos para a solução de vitrificação (SV) (20% SFB+ sacarose 0,25M + 15% EG + 7,5 DMSO + 2,5% PVP em meio TCM- 199) por 10 minutos à 4°C. Em seguida, a agulha contendo os fragmentos foi submetida ao contato direto com nitrogênio líquido, atingindo a temperatura de -196°C. Posteriormente, as amostras foram transferidas para criotubos previamente resfriados em nitrogênio líquido e armazenadas por um período mínimo de uma semana.

Para o reaquecimento, as agulhas contendo os fragmentos de tecido foram removidas do criotubo em nitrogênio líquido e imediatamente transferidas para soluções de gradiente de lavagem, com Meio TCM- 199 com 20% de SFB suplementado com sacarose (0,5M, 0,25M e 0M) por 5 min em cada etapa à 37 °C em banho maria.

Após o reaquecimento, um fragmento de ovário de cada cadela foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% para o controle da criopreservação (G2) e os demais foram distribuídos de forma aleatória entre os 5 grupos experimentais da pesquisa descritos no delineamento experimental.

5.4. Preparo da matriz de hidrogel

Foi utilizada matriz de hidrogel comercial Pluronic F-127 preparada com água destilada e mantida na geladeira por um período de 24 horas para a obtenção de uma mistura homogênea. Para o preparo de 10 mL à 30% de concentração, foi pesada 2,4g da matriz e adicionada água destilada até completar o volume. Essa matriz foi utilizada nos grupos experimentais com a adição ou não de fatores de crescimento, sendo que cada fragmento de

tecido ovariano foi colocado em 10 μ L de matriz para que eles ficassem totalmente cobertos, nos seguintes grupos:

- G3 – controle negativo: fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 μ L de matriz de hidrogel;
- G4 – matriz com BMP15 livre: fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 μ L de matriz de hidrogel com fator de crescimento BMP15 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (10 ng/ μ L de matriz);
- G5 – matriz com GDF9 livre: fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 μ L de matriz de hidrogel com fator de crescimento GDF9 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (10 ng/ μ L de matriz);
- G6 – matriz com BMP15 + GDF9: fragmentos vitrificados, reaquecidos e colocados em 10 μ L de matriz de hidrogel com a combinação dos fatores de crescimento BMP15 (10 ng/ μ L de matriz) e GDF9 (10 ng/ μ L de matriz).

5.5. Cirurgias e eutanásias

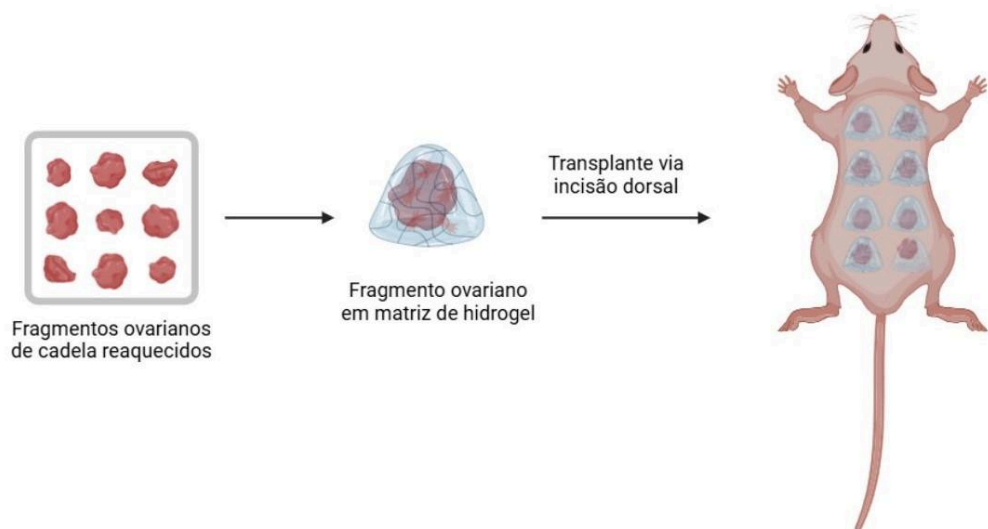
5.5.1. Ovariohisterectomia (OSH) e transplante de tecido ovariano

Antes do recebimento dos fragmentos de tecido ovariano de cadelas, todos os camundongos do grupo transplante passaram por ovariohisterectomia bilateral via incisão dorsal. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas. Os camundongos foram anestesiados com cetamina 10% (80 mg/kg Cetamin®) e xilazina 2% (10 mg/kg Xilazin® 2%, Syntec, São Paulo, Brasil), via intraperitoneal, com manutenção anestésica realizada por inalação de isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil) vaporizado em oxigênio puro. Meloxicam (5 mg/kg Maxican 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) e cloridrato

de tramadol (12,5 mg/kg Tramal, Pfizer, São Paulo, Brasil) foram administrados logo após a cirurgia para analgesia, via subcutânea.

No mesmo momento cirúrgico da OSH e após o reaquecimento, os fragmentos de tecido ovariano proveniente das cadelas foram transplantados para os camundongos ainda sob efeito anestésico. Como mostra a Figura 2, foram realizadas incisões na região subcutânea dorsal e um fragmento embebido em 10 μ L de matriz de hidrogel Pluronic F-127 contendo ou não os fatores livres foi colocado em cada incisão de acordo com os grupos experimentais: G3 – Controle negativo (somente matriz); G4 – BMP15 livre; G5 – GDF9 livre e G6 – BMP15 + GDF9 livre. Foram utilizados 16 camundongos e cada um recebeu 8 fragmentos via incisão dorsal. Para essa etapa, foram destinados 128 fragmentos (32 fragmentos para cada grupo experimental).

Figura 2. Representação de fragmentos ovarianos embebidos em matriz de hidrogel e transplantados em camundongos imunossuprimidos.



Cada animal recebeu 8 fragmentos via incisão subcutânea dorsal, de acordo com os grupos experimentais da pesquisa.

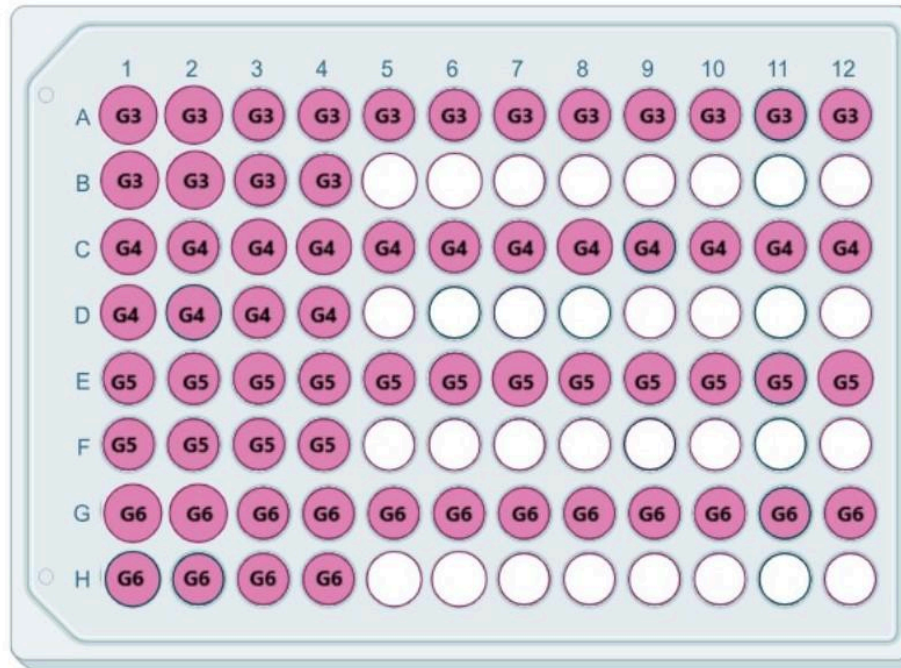
5.5.2. Eutanásias

Após 21 dias dos transplantes, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico e tiveram os fragmentos retirados via incisão dorsal cutânea e imediatamente fixados em paraformaldeído 4% por 24h para análises histológicas.

5.6. Cultivo de tecido ovariano

Imediatamente após o reaquecimento, 128 fragmentos de tecido ovariano foram aleatoriamente destinados ao cultivo. Esses foram embebidos em matriz de hidrogel comercial (Pluronic F-127) contendo os fatores livres de acordo com os grupos experimentais: G3 – Controle negativo (matriz); G4 – BMP15 livre em matriz; G5 – GDF9 livre em matriz e G6 – BMP15 + GDF9 livre em matriz. Cada grupo recebeu até 32 fragmentos, colocados nas placas em duplicata (16 em cada placa), como está demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Distribuição dos fragmentos ovarianos embebidos em matriz de hidrogel na placa de cultivo de acordo com os grupos experimentais.



Representação da distribuição dos fragmentos de tecido ovariano na placa de cultivo de acordo com os grupos experimentais. Grupo controle negativo cultivado (G3). Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4). Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6). G: grupo. O experimento foi realizado em duplicata.

Os sistemas (fragmentos + matriz + fatores de crescimento) foram transferidos separadamente para duas placas de cultura de 96 poços contendo 200 µl de meio de cultura M199 (pH 7,2–7,4) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,25 mM de piruvato, 10 IU/mL de hCG, 300 IU/mL de penicilina, 20 µg/mL de estreptomicina e 2 µg/mL de β-estradiol. Eles foram cultivados em estufa à 39 °C e com CO₂ a 5%. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, e, após 21 dias, os fragmentos recuperados foram fixados em paraformaldeído 4% para análises histológicas, segundo os procedimentos de De los Reyes *et al* (2021).

5.7. Análises histológicas

Para a análise histológica, os fragmentos ovarianos foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas, desidratados em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), durante 60 min cada, clarificados em três banhos de xilol durante 60 min cada, seguidos de 3 banhos em Paraplast por 60 minutos cada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e inclusão. Logo em seguida, os blocos foram cortados na espessura de 5µm. Para a montagem das lâminas histológicas, foi utilizado 1 em cada 5 cortes. As lâminas foram coradas com hematoxilina (Newprov Ltda, PR, Brasil) e eosina (Dinâmica Ltda, SP, Brasil) e montadas com lamínulas e verniz geral.

Cada fragmento foi analisado e os folículos classificados e contados em microscópio de luz (Leica DM500, Wetzlar, Germany). Foram considerados morfologicamente normais (MN) aqueles folículos que apresentavam organização das células da granulosa e ovócito arredondado e bem aderido à granulosa. Já os degenerados (DG) foram considerados os folículos com núcleo picnótico, vacúolos citoplasmáticos no ovócito, retração do ovócito, folículos descolados do estroma ou ainda em folículos com mais de uma das degenerações citadas, que foram considerados com degeneração total (PICTON, 2001; PICTON & GOSDEN, 2000). Eles também foram classificados em primordiais ou em crescimento, este último abrangendo folículos primários, secundários e antrais. Foram considerados folículos em crescimento todos aqueles que possuíam uma ou mais camadas de células da granulosa cuboides ao redor do ovócito. A média percentual de folículos primordiais MN foi calculada a partir do número de folículos primordiais MN multiplicados por 100 e divididos pelo número total de folículos primordiais (MN e degenerados). O mesmo cálculo foi realizado para se obter a média percentual de folículos em crescimento MN.

5.8. Análises imunohistoquímicas

Os demais cortes foram direcionados às análises imunohistoquímicas, em que foram utilizados os anticorpos primários KI-67 e caspase (em cortes com folículos) para a observação de células proliferativas e apoptose, respectivamente. O anticorpo KI-67 é responsável por marcar células proliferativas, pois a proteína KI-67 é expressa durante a divisão celular (SUN & KAUFMAN, 2018). A caspase é responsável por marcar células que entraram em processos apoptóticos, já que é expressa quando ocorre a clivagem internucleossômica do DNA (REED, 2000; GLAMOČLIJA, 2005).

Os ensaios para todos os anticorpos foram realizados de maneira semelhante. As lâminas foram desparafinizadas com 3 banhos de xilol (20 minutos cada) e banhos de um minuto em soluções decrescentes de álcool (3 vezes 100%, 95%, 80%, 70%). Logo após, foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato aquecido por uma hora. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, seguido do bloqueio das ligações inespecíficas, ambos com a utilização de soluções do kit. O anticorpo primário (Monoclonal rabbit anti-human, Invitrogen) foi utilizado na diluição de 1:25 (1µl de anticorpo em 25 µl de BSA) para o Ki-67 e na diluição de 1:100 (1µl de anticorpo em 100 µl de BSA) para a caspase, e a incubação ocorreu *overnight*.

No segundo dia, os cortes foram incubados no anticorpo secundário (Polyclonal rabbit anti-human, A0082, Dako Denmark A/S) por uma hora, e em seguida, ficaram sob a ação do polímero durante uma hora também. Para a revelação, foi utilizada a solução DAB diluída em água destilada e PBS (10 ml PBS), 10 ml de água destilada e 0,005g de DAB que foi preparada com a luz apagada, devido à sua fotossensibilidade. Ao pipetar a solução sobre cada corte, foi observada, no microscópio, a sua ação sobre o tecido. No momento em que foi percebida a marcação das células em questão (células da granulosa para KI-67 e caspase), o DAB foi lavado com PBS, e a lâmina imediatamente inserida em hematoxilina por 5

segundos. É importante ressaltar que entre cada etapa da imunohistoquímica, o material foi lavado em PBS.

Por fim, ocorreu a montagem das lâminas com as lamínulas sobre os cortes com Entellan™ (Novo rapid mounting medium for microscopy, Darmstadt, Germany). As soluções de bloqueio, o anticorpo secundário e o DAB que foram utilizados nas etapas descritas acima fazem parte do Kit Leica Novolink- Polimer Detection System (Newcastle upon Tyne, Reino Unido).

Foi utilizado o microscópio de luz para contagem de folículos e foram considerados positivos aqueles que possuíam ao menos uma das células da granulosa marcadas com o anticorpo Ki-67 ou caspase, e considerados negativos aqueles que não possuíam células da granulosa marcadas.

5.9. Análise estatística

Foi realizada uma comparação entre os grupos amostrais na contagem de folículos MN observados nas análises histológicas utilizando a análise de variância de um fator (*one way-ANOVA*) seguida do pós-teste Newman-Keuls. Para as análises imunohistoquímicas, foram utilizados teste qui-quadrado e teste de Fisher. Todas as análises foram realizadas por meio da utilização do programa de software SPSS (versão 20, Nova Iorque, Estados Unidos).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento folicular

Com relação aos controles, foram encontrados 1.239 folículos nos grupos controle fresco, controle da criopreservação e controle negativo (cultivo e transplante), sendo que 665 eram primordiais (53,7%) e 574 estavam em crescimento (46,3%). Após a análise, eles foram classificados como MN ou DG, de acordo com os seus aspectos morfológicos visualizados.

No grupo controle fresco estavam presentes 762 folículos, sendo que, dentre os considerados MN, 46,1% eram primordiais e 76,6% estavam em crescimento. Já no grupo controle da criopreservação, foram encontrados 134 folículos, sendo 10,3% primordiais MN e 11,1% em crescimento MN. Nos controles negativos, quando analisado o grupo transplante, foram encontrados 80 folículos ao todo, sendo considerados 28,8% primordiais MN e 15,1% em crescimento MN, e no grupo cultivo estavam presentes 263 folículos, sendo 25,6% primordiais MN e 21% em crescimento MN, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade total de folículos (%média±DP), quantidade de folículos morfolologicamente normais (MN) primordiais (%média± DP) e em crescimento (%média± DP) nos fragmentos de tecido ovariano dos grupos controle.

	<i>Total</i>		<i>Folículos Primordiais</i>				<i>Folículos Em crescimento</i>			
	<i>Folículos</i>	<i>n°</i>	<i>%</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	<i>n°</i>	<i>%</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	
G1	762	395	23,8 ± 29,6	394	46,1 ± 49,7 ^A	367	76,2 ± 29,6	295	76,6 ± 35,3 ^A	
G2	134	59	32,5 ± 26,4	9	10,3 ± 27,8 ^B	75	67,5 ± 26,4	9	11,1 ± 15,9 ^B	
G3-T	80	18	16,5 ± 26,6	9	28,8 ± 39,2 ^c	62	63,5 ± 40,6	19	15,1 ± 29,5 ^B	
G3-C	263	193	50,1 ± 32,3	67	25,6 ± 26,5 ^D	70	49,9 ± 32,3	11	21,0 ± 35,4 ^{BC}	

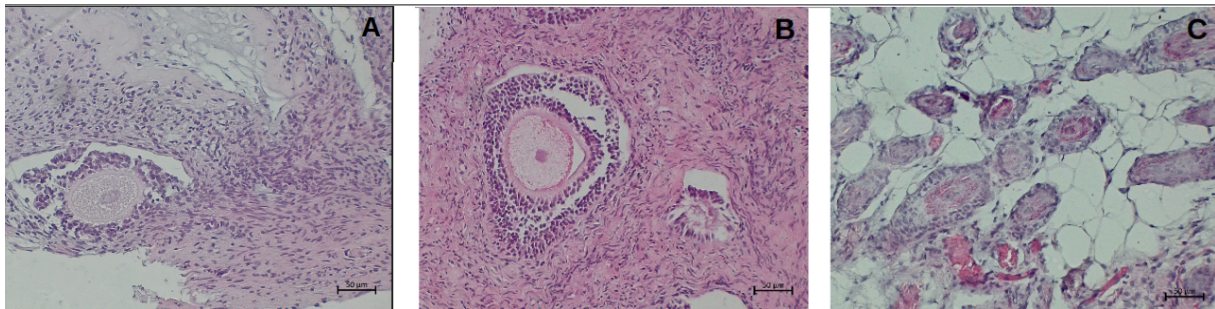
MN: morfolologicamente normais. DP: desvio padrão. Grupo controle fresco (G1). Grupo controle da criopreservação (G2). Grupo controle negativo cultivado (G3-C). Grupo controle negativo transplantado (G3-T). G: grupo. T: transplante. C: cultivo. ABCD - Letras diferentes indicam diferença significativa entre a quantidade de folículos MN nos grupos controles. Letras maiúsculas (p<0,01) e letras minúsculas (p<0,05).

O grupo controle fresco apresentou uma maior quantidade de folículos MN do que os demais grupos controle (criopreservação e negativos), tanto com relação aos folículos primordiais quanto aos em crescimento. Isso se deve provavelmente ao fato da

criopreservação diminuir a quantidade de folículos devido à formação de crioinjúrias, o que já foi observado e tem sido descrito em diversos trabalhos (PEGG, 2009).

Ao ser comparado com os grupos tratados, o controle fresco obteve mais folículos primordiais MN do que o grupos BMP15, no transplante ($p < 0,05$) e no cultivo ($p < 0,001$), e do que o grupo BMP15 + GDF9 no cultivo ($p < 0,01$). Com relação aos que estavam em crescimento, o fresco apresentou maior quantidade de folículos MN do que todos os grupos tratados. A figura 4 mostra folículos MN encontrados nos grupos controles.

Figura 4. Folículos morfologicamente normais presentes nos grupos controles.



A. Grupo controle fresco (G1). **B.** grupo controle da criopreservação (G2). **C.** grupo controle negativo transplantado (G3-T). G: grupo. T: transplante. Barras: 50 μ m.

Nos grupos tratados com BMP15, GDF9 e BMP15+GDF9, estavam presentes 1.385 folículos ao todo. Desses, 842 eram primordiais (60,8%) e 543 estavam em crescimento (39,2%), conforme a tabela 2. Ao ser comparado com os grupos tratados, o controle fresco obteve mais folículos primordiais MN do que o grupos BMP15, no transplante ($p < 0,05$) e no cultivo ($p < 0,001$), e do que o grupo BMP15 + GDF9 no cultivo ($p < 0,01$). Com relação aos que estavam em crescimento, o fresco apresentou maior quantidade de folículos MN do que todos os grupos tratados.

Tabela 2. Quantidade total média de folículos (%média± DP), quantidade de folículos totais e folículos morfologicamente normais (MN) primordiais (%média± DP) e em crescimento (%média± DP) nos fragmentos de tecido ovariano dos Quantidade de folículos totais e médios (± DP) e morfologicamente normais (MN) encontrados nos fragmentos de tecido ovariano dos grupos tratados com fatores de crescimento BMP15 e GDF9.

	<i>Total</i>		<i>Folículos Primordiais</i>				<i>Folículos Em crescimento</i>			
	<i>Folículos</i>	<i>n°</i>	<i>%</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	<i>n°</i>	<i>%</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	
<i>G4-T</i>	305	248	65,5 ± 36,4	170	61,6 ± 35,8 ^A	57	35,5 ± 36,4	17	38,3 ± 40,2 ^A	
<i>G4-C</i>	260	151	43,0 ± 33,4	49	21,2 ± 24,4 ^B	109	57,0 ± 33,4	2	1,5 ± 5,9 ^{Bb}	
<i>G5-T</i>	72	17	40,4 ± 37,7	8	47,9 ± 41,1 ^{AC}	55	59,6 ± 37,7	25	17,4 ± 26,2 ^{Cc}	
<i>G5-C</i>	178	95	51,3 ± 41,6	29	39,4 ± 41,7 ^{CD}	83	48,7 ± 41,6	15	9,3 ± 15,3 ^{bd}	
<i>G6-T</i>	132	83	55,6 ± 43,7	52	39,9 ± 44,5 ^{CD}	49	44,4 ± 43,7	1	7,7 ± 26,6 ^D	
<i>G6-C</i>	438	248	44,5 ± 28,7	60	27,2 ± 30,2 ^{BD}	190	55,5 ± 28,7	37	42,3 ± 41,8 ^A	

MN: morfologicamente normais. DP: desvio padrão. Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). Grupo tratado com BMP15 e transplantado (G4-T). Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5-C). Grupo tratado com GDF9 e transplantado (G5-T). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6-C). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e transplantado (G6-T). G: grupo. T: transplante. C: cultivo. ABCD - Letras diferentes indicam diferença significativa entre a quantidade de folículos MN nos grupos tratados. Letras maiúsculas (p<0,01) e letras minúsculas (p<0,05).

No grupo tratado com BMP15 e transplantado, estavam presentes 305 folículos, sendo que 61,6% eram primordiais MN. Ao comparar a quantidade de folículos primordiais MN com os demais grupos, ele obteve melhores resultados do que os tratados com GDF9 no cultivo (p < 0,01) e com BMP15+GDF9 tanto no transplante (p < 0,01) quanto no cultivo (p < 0,001), além do BMP15 ter tido um melhor desempenho no transplante do que no cultivo (p < 0,001).

Com relação aos folículos em crescimento MN no grupo BMP15 transplantado, foram identificados 17 (38,3%) deles ao todo. Ao comparar o desempenho desse fator de crescimento com o cultivo, no transplante ele resultou em mais folículos (p < 0,001). Com relação aos demais grupos, também teve melhores resultados do que o grupo GDF9 cultivo (p

< 0,001) e BMP15+GDF9 transplante ($p < 0,001$), e pior resultado ao compará-lo com o GDF9 transplante ($p < 0,001$), não havendo diferenças significativas em relação aos demais.

Os mecanismos que influenciam a perda folicular após o período do transplante de tecido ovariano ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que esse procedimento reduz significativamente a reserva folicular (CELIK *et. al*, 2020). Estima-se que a neovascularização e a angiogênese após o transplante duram em média de 3 a 7 dias, onde ocorrem estresses isquêmicos e outros danos (CHENG *et. al*, 2025), assim, o equilíbrio entre moléculas ativadoras e supressoras que impedem a depleção de folículos pré-antrais muda rapidamente, levando a uma perda folicular significativa (ADHIKARI & LIU, 2009).

Celik *et. al* (2018) demonstraram que a expressão de proteínas inibidoras que controlam a reserva de folículos primordiais diminui em ovários criopreservados e auto transplantados. Além disso, os mesmos autores demonstraram em outra pesquisa que a expressão de genes do fator BMP15 diminui significativamente nas células da granulosa de ovócitos em crescimento após o transplante (CELIK *et. al*, 2020).

No grupo tratado com BMP15 e cultivado, foram encontrados 260 folículos, conforme tabela 3. Destes, 21,2% eram primordiais MN, e ao comparar com os demais grupos, ele teve melhor resultado do que o GDF9 no cultivo ($p < 0,01$) e no transplante ($p < 0,001$), e pior do que BMP15+GDF9 ($p < 0,01$) e BMP15 no transplante, não tendo diferenças significativas com os outros grupos.

O BMP15 está envolvido na regulação de funções ovarianas e afeta o desenvolvimento ovocitário, isso porque possui um importante papel mediando as funções das CGs, promovendo suporte e sinalização durante a maturação dos ovócitos (FOUNTAS *et. al*, 2024). Garcia *et. al* (2019) demonstraram que a adição desse fator de crescimento ao meio de

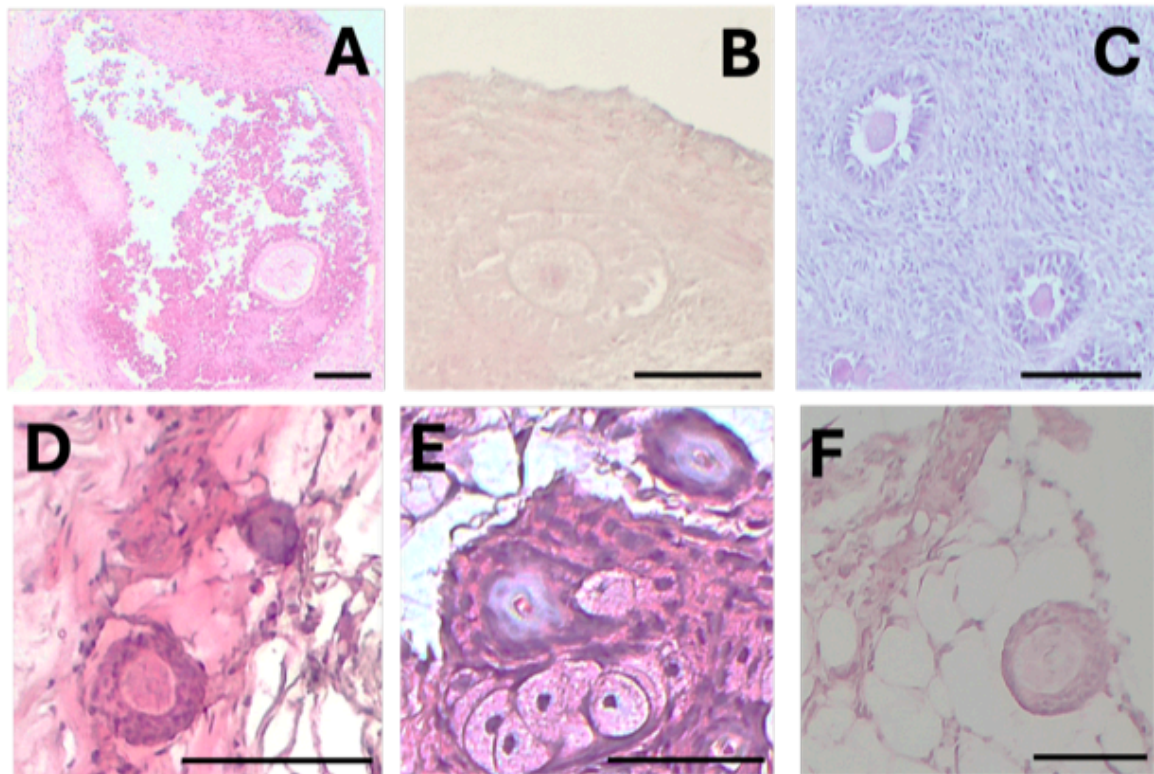
cultivo pode ajudar os ovócitos a superar o bloqueio inicial da vesícula germinativa, embora seu uso isolado não tenha aumentado significativamente a taxa de maturação final.

Ademais, apenas 1,5% dos folículos em crescimento foram classificados como MN no cultivo com BMP15, por isso só foi melhor com relação ao BMP15+GDF9 com transplante ($p < 0,05$). Com relação aos outros grupos, o BMP15 cultivado teve um pior desempenho ao comparar com o BMP15 transplante ($p < 0,001$), GDF9 no cultivo ($p < 0,05$) e no transplante ($p < 0,001$), e BMP15+GDF9 com cultivo ($p < 0,001$). Alguns folículos MN podem ser vistos na figura 4.

Shekarian *et. al* (2021) demonstraram que a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com BMP15 resultou em uma taxa de sobrevivência de 80% de folículos pré-antrais de murinos após 12 dias, além do crescimento folicular ser maior no grupo tratado com o fator de crescimento quando se comparado com o grupo que não recebeu a suplementação.

Além disso, Jitjumnong & Tang (2023) utilizaram um sistema de cultivo *in vitro* 3D com o uso de matriz de hidrogel associado ao BMP15 e demonstraram que, a partir do 10º dia de cultivo, os ovócitos secundários de murinos cultivados com o fator de crescimento atingiram maiores diâmetros do que aqueles do grupo controle, além de obterem também uma maior taxa de sobrevivência folicular (80,19%).

Figura 5. Folículos morfologicamente normais presentes nos grupos tratados com os fatores de crescimento BMP15 e GDF.



A. Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). **B.** Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5-C). **C.** Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6-C). **D.** Grupo tratado com BMP15 e transplantado (G4-T). **E.** Grupo tratado com GDF9 e transplantado (G5-T). **F.** Grupo tratado com BMP15+GDF9 e transplantado (G6-T). G: grupo. C: Cultivo. T: Transplante. Barras 50 μ m.

Quando analisado o grupo controle da criopreservação, a quantidade de folículos primordiais neste grupo foi menor quando se comparado aos demais grupos controles e aos grupos tratados com BMP15, tanto no cultivo ($p < 0,05$) quanto no transplante ($p < 0,001$), com GDF9 apenas no cultivo ($p < 0,001$), e com a combinação dos fatores BMP15+GDF9, no cultivo ($p < 0,01$) e no transplante ($p < 0,001$). O único tratamento que resultou em menos folículos MN quando comparado ao controle da criopreservação foi o GDF9 associado ao transplante ($p < 0,001$).

Com relação aos folículos em crescimento, a quantidade de folículos MN foi significativamente menor no controle da criopreservação quando comparado aos grupos

tratados com BMP15 no transplante ($p < 0,001$) e com GDF9 no cultivo ($p < 0,001$), e maior quando comparado com o grupo tratado com BMP15 no cultivo ($p < 0,01$).

Pode-se observar, assim, o potencial dos fatores de crescimento BMP15 e GDF9 na recuperação e na sobrevivência folicular, visto que houve uma preservação significativa entre o grupo apenas criopreservado e os demais que, além de terem sido criopreservados, tiveram a adição dos fatores de crescimento. Esse efeito é demonstrado na literatura, já que o BMP15 é conhecido por ter um papel essencial na regulação da função das CGs e o GDF9 por promover a proliferação e a diferenciação das CGs, dessa forma, ambos os fatores trabalham de forma conjunta para regular a foliculogênese, aumentando a eficiência desse processo (FOUNTAS *et. al*, 2024)

Ao fazer uma comparação entre os controles negativos e os grupos tratados, pode-se observar uma diferença significativa entre os folículos primordiais MN do controle negativo transplante e os tratado com BMP15 e com GDF9 e transplantados, na qual os tratados obtiveram melhores resultados ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Quando comparado o controle negativo cultivo com os demais grupos tratados, houve diferença significativa apenas entre o negativo cultivo e o tratado com GDF9 e cultivado, em que o tratado obteve melhores resultados ($p < 0,05$).

Observando os folículos MN em crescimento, foi notável que os tratados com BMP15 ($p < 0,001$) e com GDF9 ($p < 0,01$) e transplantados tiveram mais folículos do que o controle negativo cultivado, apenas o tratado com BMP15+GDF9 e transplantado teve menos folículos do que este controle ($p < 0,05$). Entretanto, quando observados os grupos tratados e cultivados, apenas o com BMP15 resultou em menos folículos do que o controle negativo cultivado ($p < 0,001$), os demais GDF9 ($p < 0,05$) e BMP15+GDF9 ($p < 0,01$) tiveram mais folículos.

Os fatores de crescimento BMP15 e GDF9 são descritos como tendo papéis relevantes nos mecanismos de regulação das células do *cumulus* do ovócito, já que elas expressam vários genes importantes desde estágios iniciais de maturação ovocitária (RAMIREZ *et. al*, 2020).

Ao comparar o controle negativo transplantado com os grupos tratados, o grupo controle obteve melhor resultado quando se comparado ao BMP15 no transplante ($p < 0,001$) e no cultivo ($p < 0,001$), e pior com relação ao tratado com BMP15+GDF9 no cultivo ($p < 0,001$), onde o tratamento proporcionou mais folículos MN em crescimento, conforme visto na tabela 3..

Ramirez *et. al* (2020) demonstraram em seu trabalho uma maior expansão das células do *cumulus* e maior expressão de genes dos fatores BMP15 e GDF9 em ovócitos cultivados com esses fatores do que os cultivados sem adicioná-los. Pode-se observar, deste modo, como a adição dos fatores de crescimento à matriz pode auxiliar na sobrevivência e na recuperação folicular, já que ela cria um microambiente e em que os fatores ficam em contato íntimo com o fragmento e podem estimular o desenvolvimento dos folículos.

Tabela 3. Quantidade de folículos totais e médios (\pm DP) morfologicamente normais (MN) nos fragmentos de controle frescos e tratados e transplantados ou cultivados *in vitro*.

	<i>Folículos Primordiais</i>		<i>Folículos Em crescimento</i>	
	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>
G1	394	46,1 \pm 49,7 ^A	295	76,6 \pm 35,3 ^A
G2	9	10,3 \pm 27,8 ^B	9	11,1 \pm 15,9 ^B
G3-T	9	28,8 \pm 39,2 ^{Cc}	19	15,1 \pm 29,5 ^{CB}
G3-C	67	25,6 \pm 26,5 ^D	11	21,0 \pm 35,4 ^{BCDd}
G4-T	170	61,6 \pm 35,8 ^E	17	38,3 \pm 40,2 ^E
G4-C	49	21,2 \pm 24,4 ^{CDf}	2	1,5 \pm 5,9 ^F
G5-T	8	47,9 \pm 41,1 ^{AG}	25	17,4 \pm 26,2 ^{BCDG}
G5-C	29	39,4 \pm 41,7 ^{ACH}	15	9,3 \pm 15,3 ^{BCHd}
G6-T	52	39,9 \pm 44,5 ^{ACI}	1	7,7 \pm 26,6 ^{BCI}
G6-C	60	27,2 \pm 30,2 ^{CDJ}	37	42,3 \pm 41,8 ^J

MN: morfologicamente normais. DP: desvio padrão. Grupo controle fresco (G1). Grupo controle da criopreservação (G2). Grupo controle negativo cultivado (G3-C). Grupo controle negativo transplantado (G3-T).

Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). Grupo tratado com BMP15 e transplantado (G4-T). Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5-C). Grupo tratado com GDF9 e transplantado (G5-T). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6-C). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e transplantado (G6-T). G: grupo. T: transplante. C: cultivo. ABCDEFGHIJ - Letras diferentes indicam diferença significativa entre a quantidade de folículos MN nos grupos controles e nos grupos tratados. Letras maiúsculas ($p < 0,01$) e letras minúsculas ($p < 0,05$).

No grupo GDF9 transplante, foram encontrados 47,9% de folículos primordiais MN, não resultando em diferenças significativas entre os demais grupos, e 17,4% de folículos em crescimento MN, que apresentaram melhores resultados quando comparados com os grupos BMP15 cultivo ($p < 0,001$) e transplante ($p < 0,001$), e com BMP15+GDF9 cultivo ($p < 0,05$), não havendo diferenças significativas com os outros grupos tratados.

Vatanparast *et. al* (2018) utilizaram tecido ovariano de ovinos criopreservado e transplantado na membrana corioalantoica de embrião de galinha com a adição de GDF9 no meio de cultivo por 5 dias, resultando em uma melhor foliculogênese, com um aumento na neovascularização e com menores áreas de fibrose e necrose, quando comparado ao grupo que não recebeu o fator de crescimento.

Já no cultivo, o grupo tratado com GDF9 apresentou 36,4% de folículos primordiais MN e 9,3% secundários MN. Assim, houve apenas uma diferença significativa ao comparar os folículos em crescimento deste grupo com os do grupo BMP15 cultivo ($p < 0,05$), não havendo diferenças significativas com os demais em crescimento e entre os primordiais.

O fator de crescimento GDF9 é essencial para a formação de ovócitos normais e das CGs, bem como das células da teca; embora haja uma relativa competência meiótica quando sua expressão está prejudicada em folículos em estágios iniciais, há estudos que demonstram que a ausência da expressão de GDF9 afeta eventos secretórios tardios, tendo, assim um papel importante durante estágios finais de crescimento folicular antes da ovulação (OTSUKA *et. al*, 2011).

Mohsenzadeh *et. al* (2022) usaram o fator de crescimento GDF9 para suplementar o meio de cultivo para a maturação de ovócitos de humanos, sendo que aqueles que estavam no meio suplementado apresentaram melhores qualidades da zona pelúcida. Além disso, Campos *et. al* (2021), ao adicionarem 200 ng/mL de GDF9 ao meio de cultivo *in vitro*, conseguiram manter a viabilidade e o diâmetro de folículos e ovócitos de murinos após 7 dias de cultivo, demonstrando assim que esse fator de crescimento possui um efeito protetor.

O grupo BMP15+GDF cultivo apresentou o total de 438 folículos, sendo que 27,2% eram primordiais MN e 42,3% em crescimento MN e obteve a maior quantidade de folículos dos grupos tratados. Ao comparar os primordiais MN, este grupo só mostrou melhores resultados em comparação com o grupo GDF9 transplante ($p < 0,01$), e pior resultado do que o BMP15 transplante ($p < 0,001$), sem diferenças significativas com os demais.

Com relação aos em MN em crescimento, o BMP15+GDF9 cultivo rendeu estatisticamente melhores resultados ao ser comparado com o BMP15 cultivo ($p < 0,001$), com o GDF9 cultivo ($p < 0,001$) e o transplante ($p < 0,001$), e com o BMP15+GDF9 transplante ($p < 0,001$).

O grupo BMP15+GDF9 transplante obteve 132 folículos, sendo que 39,9% eram primordiais MN. Assim, a combinação dos fatores de crescimento demonstrou um bom resultado apenas quando comparado ao BMP15 cultivo ($p < 0,01$) e um pior com relação ao BMP15 transplante ($p < 0,01$), não havendo diferenças significativas com os folículos primordiais MN dos demais grupos. Apenas 1 folículo em crescimento MN (7,7%) foi encontrado no BMP15+GDF9 transplante, não havendo bons resultados ao compará-lo com os outros grupos.

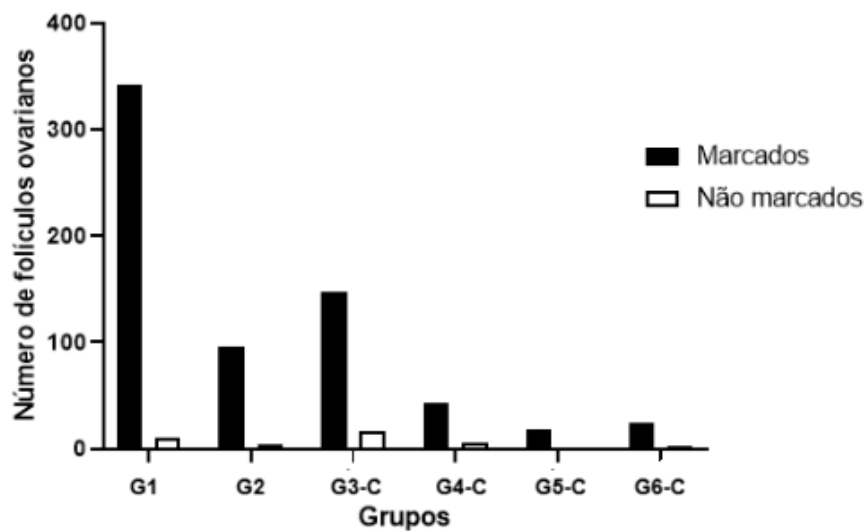
Garcia *et. al* (2019) demonstraram que o uso combinado dos fatores BMP15+GDF9 no cultivo *in vitro* de oócitos caninos resulta em melhores taxas de maturação folicular do que

o uso isolado, sugerindo que a combinação dos fatores pode trazer melhores resultados. Mottershead *et. al* (2015) descobriu que as ações sinérgicas dos dois fatores nas CGs podem ser atribuídas à formação de um heterodímero, denominado cumulina, indicando que a formação desse complexo estável de proteínas dá sustentação e ativa essas células, por isso a combinação dos fatores seria mais indicada, já que mimetiza a real fisiologia ovocitária.

6.2. Viabilidade folicular

Para a análise de proliferação celular com o marcador Ki-67, foram analisados 617 folículos nos grupos controles (controle fresco, controle crio e controles negativos cultivo e transplante), sendo que 586 (95%) apresentaram marcações. Nos grupos tratados e cultivados (BMP15, GDF9 e BMP15+GDF9), foram analisados 94 folículos, dentre os quais 86 (91,5%) apresentaram marcação com Ki-67, como mostra o Gráfico 1. Foram considerados proliferativos os folículos que apresentaram pelo menos uma célula da granulosa marcada.

Gráfico 1. Quantidade de folículos que apresentaram ou não marcação com Ki-67 no cultivo *in vitro*.



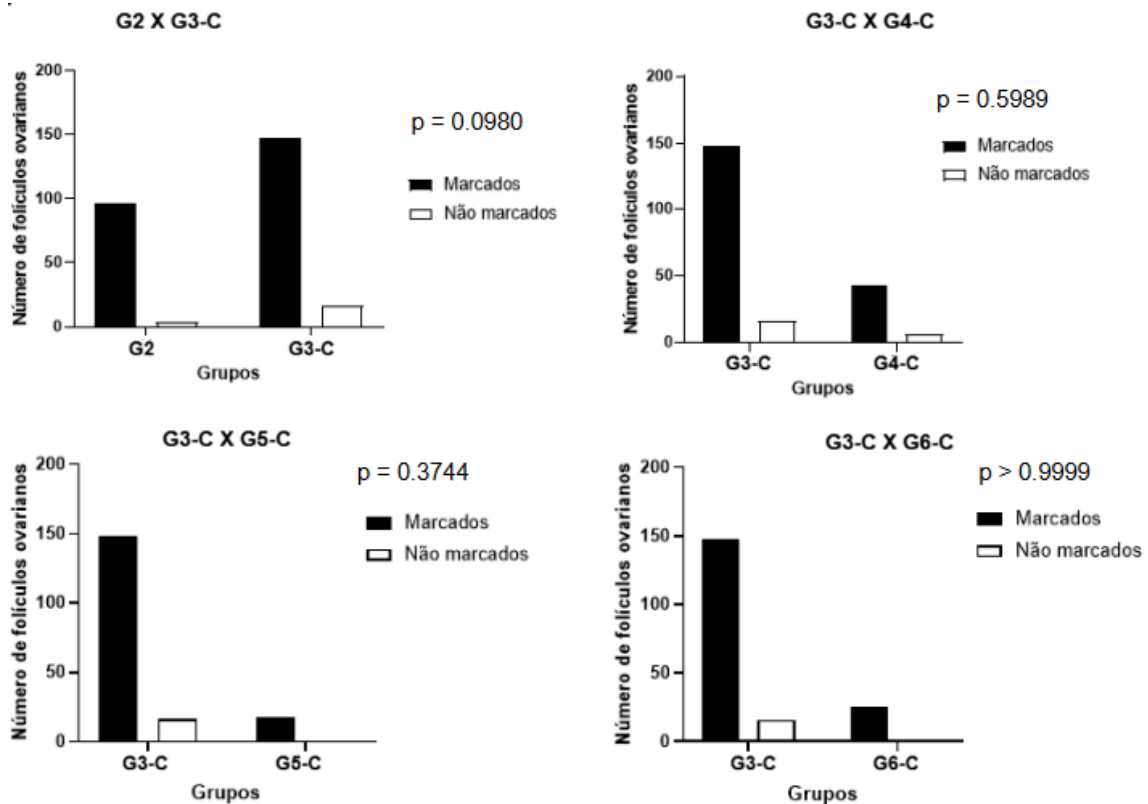
Grupo controle fresco (G1). Grupo controle da criopreservação (G2). Grupo controle negativo cultivado (G3-C). Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5-C). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6-C). G: grupo. C: cultivo.

A proliferação das células da granulosa está relacionada a diversos processos ligados à maturação folicular; os fatores de crescimento BMP15 e GDF9 possuem uma grande importância fisiológica nesses processos e é comprovado que defeitos genéticos relacionados a eles impedem a progressão folicular a partir do estágio primário em ovinos e murinos, além de estarem relacionados com a insuficiência ovariana prematura em humanos (DALBIES-TRAN *et. al*, 2020; CHAUVIN, 2025).

Ao comparar os grupos controles, não houve diferença significativa entre o controle fresco e o controle crio ($p = 0.7509$), indicando que a criopreservação não teve efeitos na atividade proliferativa folicular. Ao comparar o controle fresco com o controle negativo no cultivo, o negativo apresentou um maior número de folículos não marcados ($p = 0.026$), demonstrando que o cultivo *in vitro* consegue influenciar a atividade proliferativa.

Ao comparar o grupo controle negativo no cultivo, não houve diferenças estatísticas significativas com relação ao controle crio ($p = 0.0980$) e aos tratados com BMP15 ($p = 0.5989$), com GDF9 ($p = 0.3744$) e com BMP15+GDF9 ($p > 0.9999$). Assim, não houve uma mudança significativa no padrão proliferativo entre os grupos do controle negativo cultivo e os demais tratados, conforme o Gráfico 2.

Gráfico 2. Comparação entre a quantidade de folículos marcados com Ki-67 nos grupos amostrais cultivados.

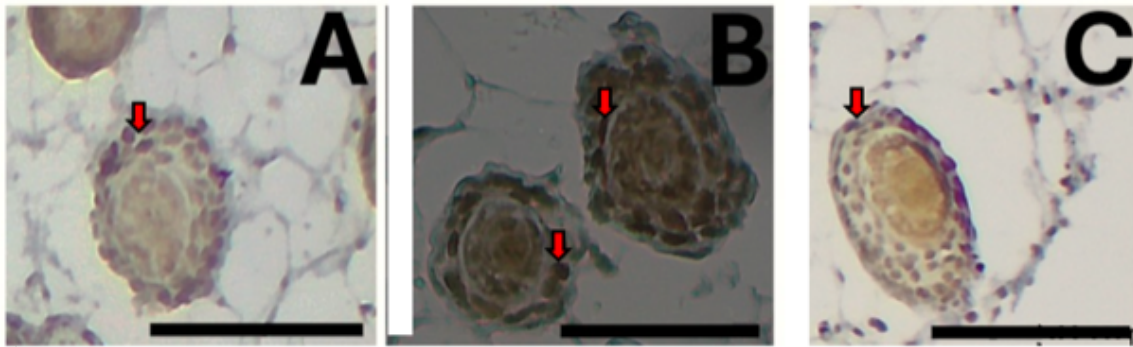


Grupo controle da criopreservação (G2). Grupo controle negativo cultivado (G3-C). Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5-C). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6-C). G: grupo. C: cultivo.

Dentre os grupos tratados e cultivados, também não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com BMP15 e GDF9 ($p = 0.1806$), os tratados com BMP15 e BMP15+GDF9 ($p = 0.7042$) e os tratados com GDF9 e BMP15+GD9 ($p = 0.5091$). As variações observadas refletem principalmente diferenças no total de folículos avaliados por grupo, não sendo possível atribuir efeito proliferativo diferencial aos tratamentos com fatores livres.

Nos grupos tratados e transplantados (BMP15, GDF9 e BMP15+GDF9), foram analisados 298 folículos, dentre os quais 294 (98,7%) apresentaram pelo menos uma célula da granulosa marcada conforme mostra a Figura 5.

Figura 6. Folículos marcados com Ki-67 nos grupos tratados com os fatores de crescimento.



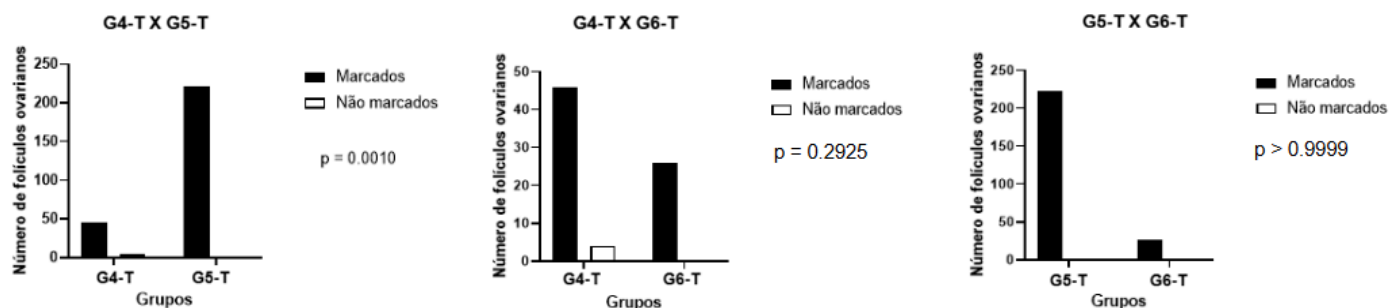
A. folículo presente no grupo tratado com BMP15 e transplantado (G4-T). **B.** folículos presentes no grupo tratado com GDF9 e transplantado (G5-T). **C.** folículo presente no grupo tratado com BMP15+GDF9 e transplantado (G6-T). G: grupo. C: Culivo. T: Transplante. As setas indicam a presença de células marcadas com Ki-67. Barras: 50 μ m.

Ao comparar os grupos tratados com os fatores de crescimento com o controle negativo transplantado, houve uma diferença significativa apenas com o tratado com GDF9 ($p = 0.0001$), o que pode estar relacionado à quantidade de folículos presente em cada grupo. Com relação aos grupos outros tratados com BMP15 e com BMP15+GDF9, não houve diferenças significativas na comparação com o controle negativo transplantado ($p > 0.9999$ e $p = 1342$, respectivamente).

A comparação entre os grupos tratados com BMP15 e GDF9 evidenciou diferença estatisticamente significativa na quantidade de folículos Ki-67 positivos após o transplante ($p = 0,0010$) conforme pode ser visto no Gráfico 3, em função da ausência de folículos não marcados no grupo tratado com GDF9. O grupo tratado com GDF9 destaca-se no transplante por apresentar perfil proliferativo mais homogêneo, sem folículos Ki-67 negativos.

Vatanparast *et. al* (2018) demonstraram que o tratamento com GDF9 em tecido ovariano de ovinos criopreservado e transplantado mantém a capacidade proliferativa dos folículos, destacando, assim, o papel desse fator de crescimento em promover a proliferação folicular.

Gráfico 3. Comparação entre a quantidade de folículos marcados com Ki-67 nos grupos amostrais cultivados.

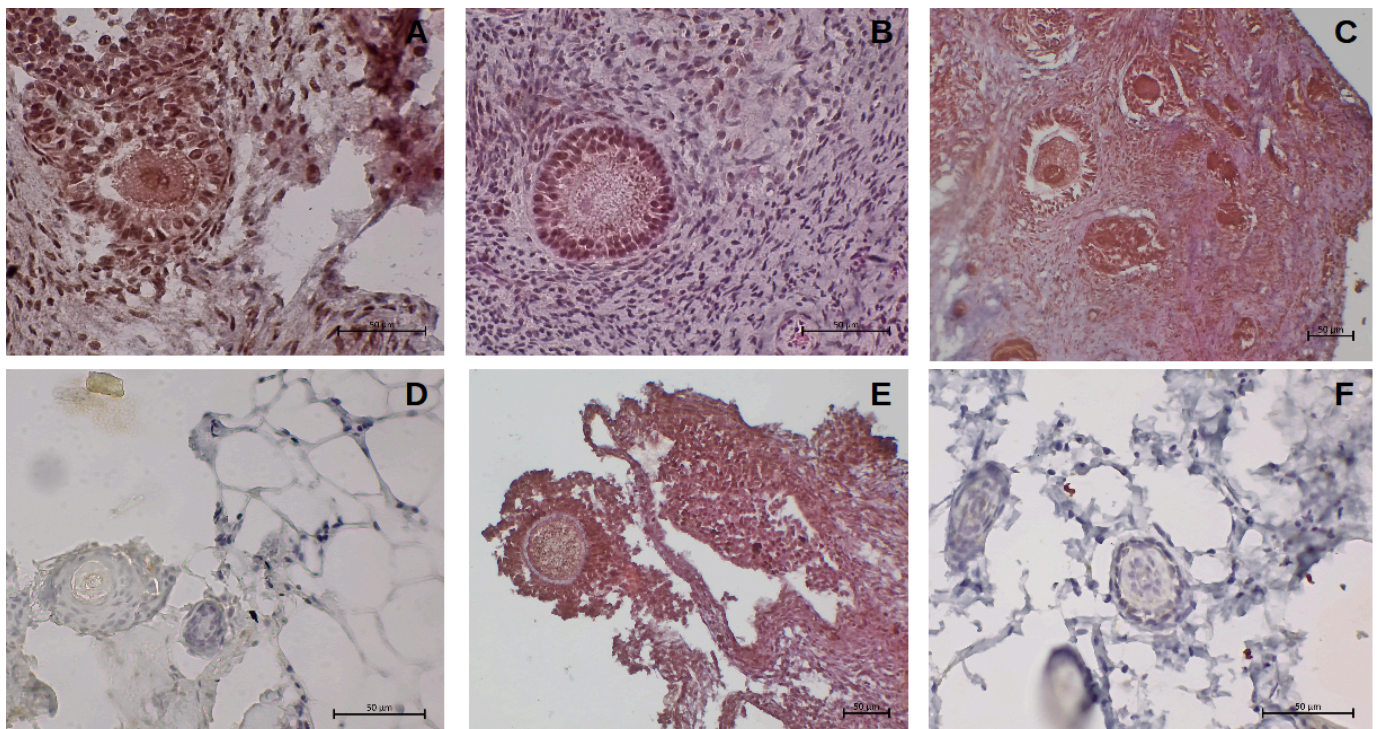


Grupo tratado com BMP15 e transplantado (G4-T). Grupo tratado com GDF9 e transplantado (G5-T). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e transplantado (G6-T). G: grupo. T: transplante.

Com relação aos demais grupos tratados, não houve diferenças significativas entre BMP15 e BMP15+GDF9 ($p = 0.2925$) e também entre GDF9 e BMP15+GDF9 ($p > 0.9999$), demonstrando o potencial proliferativo dos fatores nos folículos ovarianos.

Para a análise da sobrevivência folicular com a caspase, foram analisados 473 folículos nos grupos controles (controle fresco, controle crio e controle negativo), dentre os quais 96,2% não apresentaram marcações. Além disso, foram analisados 55 folículos nos grupos tratados e associados ao cultivo in vitro, sendo que 89,1% deles não apresentaram marcações. Foram considerados marcados os folículos que apresentaram pelo menos uma célula da granulosa marcada. A figura 7 mostra folículos negativos para a caspase nos grupos experimentais.

Figura 7. Folículos caspase negativos nos grupos experimentais.



A. Grupo controle fresco. **B.** Grupo controle da criopreservação. **C.** Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). **D.** Grupo tratado com GDF9 e transplantado (G5-T). **E.** Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado. **F.** Grupo tratado com BMP15+GDF9 e transplantado. G: Grupo. C: Cultivo. T: Transplante. Barras: 50 µm.

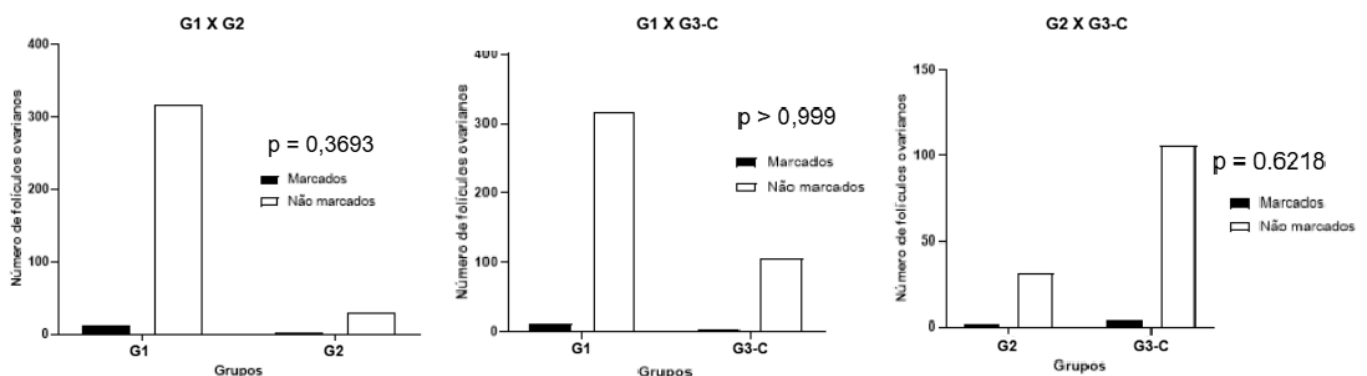
A apoptose é uma forma de morte programada das células e é mediada, dentre outros, por uma família de proteínas denominadas de caspase, que são responsáveis pelo início da execução da morte celular, incluindo a fragmentação do DNA, o remodelamento das mitocôndrias e a produção de EROs (BRENTNALL et. al, 2013).

O complexo controle da foliculogênese é resultado do balanço entre fatores proapoptóticos e antiapoptóticos que regulam a sobrevivência celular, já que a apoptose nas CGs ocorre predominantemente *via* rotas de sinalização dependentes de caspase; o tipo de apoptose e a rota de sinalização dependem do estágio de desenvolvimento do folículo e a

origem dos gatilhos intrínsecos e extrínsecos, sendo que uma alta taxa de apoptose nas CGs levam à morte do folículo ovariano (REGAN *et. al*, 2018).

Dentre os grupos controles, não houve diferença significativa quando comparado o grupo controle fresco com o controle crio ($p = 0.3693$) nem com o controle negativo no cultivo ($p > 0.9999$). Também não houve diferença estatística ao comparar o controle crio com o controle negativo cultivado ($p = 0.6218$), conforme o Gráfico 4. Podendo inferir, assim, que a criopreservação preservou a viabilidade dos folículos e que o cultivo *in vitro*, sozinho, não induziu a uma apoptose folicular significativa.

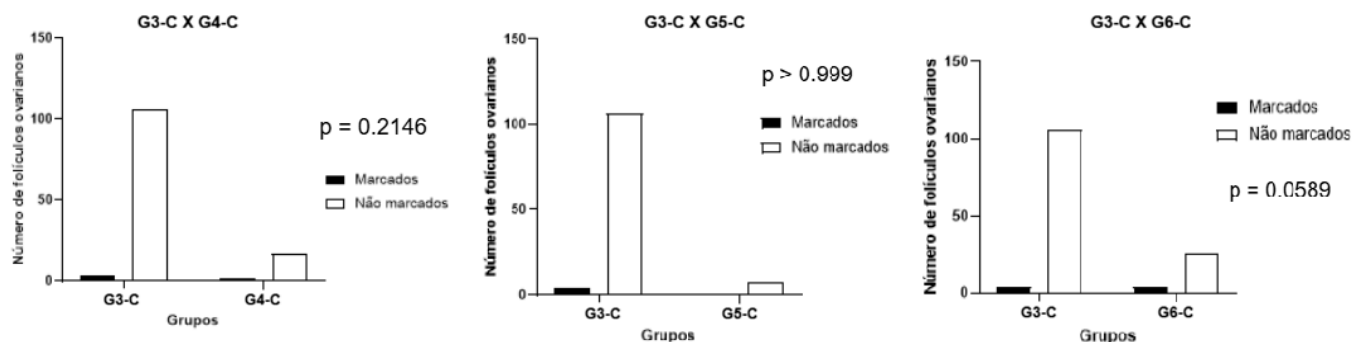
Gráfico 4. Comparação entre a quantidade de folículos que apresentaram ou não marcação para a caspase nos grupos controles.



Grupo controle fresco (G1). Grupo controle da criopreservação (G2). Grupo controle negativo cultivado (G3-C).

Também não houve diferenças estatísticas entre o controle negativo cultivado e os grupos tratados com BMP15 ($p = 0.2146$), com GDF9 ($p > 0.999$) e com BMP15+GDF9 ($p = 0.0589$), conforme o Gráfico 5. Ainda assim, pode-se ressaltar que, apesar de não ter atingido o limiar de significância, o tratamento combinando BMP15+GDF9 apresentou aumento expressivo na proporção de folículos positivos em relação ao controle negativo.

Gráfico 5. Comparação entre o grupo controle negativo cultivado e demais grupos tratados e cultivados.



Grupo controle negativo cultivado (G3-C). Grupo tratado com BMP15 e cultivado (G4-C). Grupo tratado com GDF9 e cultivado (G5-C). Grupo tratado com BMP15+GDF9 e cultivado (G6-C). G: grupo. C: cultivo.

Comparando os grupos tratados e cultivados, não houve diferenças na apoptose entre os grupos cultivados com BMP15 e BMP15+GDF ($p > 0.999$), entre BMP15 e GDF9 ($p > 0.999$) e entre GDF9 e BMP15+GDF9 ($p = 0.5658$). Dessa forma, infere-se que o GDF9 pode ter um efeito protetor nos folículos, entretanto, o tamanho amostral limita conclusões definitivas, sendo necessários estudos com maior amostragem.

A ausência do desenvolvimento folicular está ligada diretamente à falha em manter a proliferação das células da granulosa, resultando no aumento da taxa de apoptose dessas células; Jiao *et. al* (2023) demonstraram que a ausência de BMP15 levou a um severo comprometimento da proliferação das células da granulosa e a retenção do desenvolvimento folicular no estágio pré-antral.

Além disso, o GDF9 atua diretamente nas células da granulosa para suprimir a apoptose, isso porque ele promove a expressão de proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2,

inibindo vias intrínsecas da apoptose, o que garante a continuidade do desenvolvimento e da sobrevivência folicular (SANFINS *et. al*, 2018)

Foram analisados 108 folículos nos grupos tratados associados ao transplante, sendo que 99,1% não apresentaram marcações com a caspase, sendo considerados marcados aqueles que tiveram pelo menos uma célula da granulosa marcada. Não foi observada associação significativa entre os grupos experimentais e a ocorrência de apoptose no transplante, considerando todos os grupos simultaneamente. A análise global por teste por qui-quadrado não mostrou uma associação significativa entre os grupos experimentais e a marcação por caspase no transplante de tecido ovariano ($\chi^2 = 3,045$; $gl = 4$; $p = 0,5502$).

Assim, as análises estatísticas não evidenciaram diferenças significativas na ocorrência de apoptose folicular entre os grupos, tanto no cultivo quanto no transplante de tecido ovariano. Os grupos controles apresentaram baixas taxas de marcação por caspase, validando o modelo experimental. Nos tratamentos com fatores livres, observaram-se variações numéricas, com tendência a maior apoptose no cultivo, especialmente na combinação BMP15+GDF9, porém sem significância estatística.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a utilização dos fatores de crescimento BMP15 e GDF9 associados à matriz de hidrogel exerce uma influência positiva na recuperação e sobrevivência folicular em tecido ovariano criopreservado de cadelas.

Os resultados histológicos indicaram que o grupo tratado com BMP15 no transplante apresentou o melhor desempenho na preservação de folículos primordiais morfológicamente normais, superando significativamente o controle da criopreservação. Por outro lado, a

combinação BMP15+GDF9 no cultivo *in vitro* mostrou-se superior para o desenvolvimento de folículos em crescimento MN, sugerindo um efeito sinérgico que favorece estágios mais avançados da foliculogênese.

As análises imunohistoquímicas confirmaram que a maioria dos folículos recuperados manteve atividade proliferativa e baixos índices de apoptose. Assim, o enriquecimento de matrizes de hidrogel com fatores de crescimento em tecidos ovarianos constitui uma estratégia biotecnológica promissora para otimizar a preservação da fertilidade e a conservação genética na espécie canina. Entretanto, são necessários mais estudos que demonstrem melhor a atividade desses fatores em matrizes de hidrogel, principalmente associando-os ao transplante de tecido ovariano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y. et al. Cryopreservation of canine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 2, p. 363-368, 2011.

ACKERMANN, C. L. et al. Evaluation of follicular growth and tissue viability in vitrified/warmed domestic dog ovaries after in vitro culture. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, p. 77-81, 2017.

ADHIKARI, D; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews*, v. 30, n. 5, p. 438-464, 2009.

AGUIAR, F. L. N. et al. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 85, n. 6, p. 1106-1112, 2016.

AGUIAR, F. L. N. et al. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. *Theriogenology*, v. 156, p. 296-309, 2020.

ALMEIDA, A. P. et al. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the in vitro culture of caprine preantral ovarian follicles. *Small Ruminant Research*, v. 100, n. 2-3, p. 169-176, 2011.

AMORIM, C. A. et al. Cryostorage and retransplantation of ovarian tissue as an infertility treatment. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 33, n. 1, p. 89-102, 2019.

ARAV, A. et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Human Reproduction*, v. 20, n. 12, p. 3554-3559, 2005.

ARIAS, M. E. et al. Simple and efficient chemically defined in vitro maturation and embryo culture system for bovine embryos. *Animals*, v. 12, n. 21, p. 3057, 2022.

BELLI, M.; SHIMASAKI, S. Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. *Vitamins and hormones*, v. 107, p. 317-348, 2018.

BHATTACHARYA, S.. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*,-2018, 2018.

BJARKADOTTIR, B. D. et al. Analysing culture methods of frozen human ovarian tissue to improve follicle survival. *Reproduction and Fertility*, v. 2, n. 1, p. 59-68, 2021.

BOZKURT, Y. (Ed.). *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences*. BoD–Books on Demand, 2018.

BRENTNALL, M. et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, v. 14, n. 1, p. 32, 2013.

BUNGE, R. G.; SHERMAN, J. K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, v. 172, n. 4382, p. 767-768, 1953.

BUNYAGA, A. S.; KASHOMA, I. P. Cryopreservation of dog semen as an alternative method to improved fertility in bitches: a review article. 2017.

CACCAVO, D. et al. Modeling the drug release from hydrogel-based matrices. *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 474-483, 2015.

CAMPBELL, B. K. et al. Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Human reproduction*, v. 29, n. 8, p. 1749-1763, 2014.

CAMPOS, J. R. et al. Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. *Clinics*, v. 66, p. 2093-2097, 2011.

CAMPOS, L. B. et al. Effect of growth differentiation factor 9 (GDF-9) on in vitro development of collared peccary preantral follicles in ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*, v. 226, p. 106717, 2021.

CELIK, S. et al. Expression of inhibitor proteins that control primordial follicle reserve decreases in cryopreserved ovaries after autotransplantation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 35, n. 4, p. 615-626, 2018.

CELIK, S. et al. Altered expression of activator proteins that control follicle reserve after ovarian tissue cryopreservation/transplantation and primordial follicle loss prevention by rapamycin. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 37, n. 9, p. 2119-2136, 2020.

CEREZETTI, M. B. et al. Impact of the antioxidant quercetin on morphological integrity and follicular development in the in vitro culture of *Bos indicus* female ovarian fragments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 57, p. 856-864, 2021.

CHASTANT-MAILLARD, S. et al. Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, n. 7, p. 1049-1056, 2010.

CHAUVIN, S. Role of Granulosa Cell Dysfunction in Women Infertility Associated with Polycystic Ovary Syndrome and Obesity. *Biomolecules*, v. 15, n. 7, p. 923, 2025.

CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet*, v. 327, n. 8486, p. 884-886, 1986.

CHENG, J. et al. Revascularization of human ovarian cortical grafts is not equally efficient from both sides of the cortex tissue. *Frontiers in Endocrinology*, v. 16, p. 1679248, 2025.

CHITI, M-C. et al. Ovarian extracellular matrix-based hydrogel for human ovarian follicle survival in vivo: A pilot work. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 110, n. 5, p. 1012-1022, 2022.

CLAES, A.; STOUT, T. A. E. Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*, v. 187, p. 215-218, 2022.

CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal reproduction science*, v. 124, n. 3-4, p. 200-210, 2011.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Resolução CFM nº 2.320/2022. Normas éticas para a utilização de técnicas de reprodução assistida. *Diário Oficial da União* de 15 de junho de 2021, Seção I, p. 60.

CONTI, M. et al. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles, *Molecular Endocrinology*, Volume 20, Issue 4, 1 April 2006, Pages 715–723,

COSTA, F. C. et al. Ascorbic acid and resveratrol improve the structural integrity of the extracellular matrix and enhance follicular survival in cultured bovine ovarian tissue. *Theriogenology*, 2025.

COX, C. M. et al. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Open*, v. 2022, n. 4, p. hoac051, 2022.

DAIGNEAULT, B. W. et al. Embryonic POU5F1 is required for expanded bovine blastocyst formation. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 7753, 2018.

DALBIES-TRAN, R. et al. A comparative analysis of oocyte development in mammals. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 1002, 2020.

DALWADI, M. P. et al. A mathematical framework for developing freezing protocols in the cryopreservation of cells. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, v. 80, n. 2, p. 657-689, 2020.

DAVIS, A. C. et al. Diverse Approaches to Ovarian Tissue Cryopreservation Have Equivalent Outcomes in Markers of Tissue Viability. *Reproductive Sciences*, v. 28, p. 2129-2135, 2021.

DAY, J. G. et al. Cryopreservation: conservation of bioresources at ultra low temperatures. *Molecular biotechnology handbook*, p. 917-947, 2008.

DEAN, J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *Journal of reproductive immunology*, v. 53, n. 1-2, p. 171-180, 2002.

DEANESLY, R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *Journal of Endocrinology*, v. 11, n. 2, p. 197-NP, 1954.

DE LOS REYES, M. et al. Cyclooxygenase 2 messenger RNA levels in canine follicular cells: interrelationship with GDF-9, BMP-15, and progesterone. *Domestic animal endocrinology*, v. 74, p. 106529, 2021.

DOLMANS, M. et al. Fertility preservation: the challenge of freezing and transplanting ovarian tissue. *Trends in molecular medicine*, v. 27, n. 8, p. 777-791, 2021.

DONNEZ, J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The lancet*, v. 364, n. 9443, p. 1405-1410, 2004.

DONNEZ, J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, v. 24, n. 1, p. 87-100, 2010.

DOS SANTOS, R. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation. 2007. Tese de Doutorado.

DOS SANTOS MORAIS, M. L. G. et al. Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. *Reproductive Biology*, v. 19, n. 3, p. 270-278, 2019.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

FABBRI, R. et al. Long-term storage does not impact the quality of cryopreserved human ovarian tissue. *Journal of ovarian research*, v. 9, p. 1-10, 2016.

FILATOV, M. A. et al. Female fertility preservation strategies: cryopreservation and ovarian tissue in vitro culture, current state of the art and future perspectives. *Zygote*, v. 24, n. 5, p. 635-653, 2016.

FOUNTAS, S. et al. The roles of GDF-9, BMP-15, BMP-4 and EMMPRIN in Folliculogenesis and in vitro fertilization. *Journal of Clinical Medicine*, v. 13, n. 13, p. 3775, 2024.

FUJIHARA, M.; KANEKO, T.; INOUE-MURAYAMA, M. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 3970, 2019.

GADEK, L. et al. Thawing fertility: a view of ovarian tissue cryopreservation processes and review of ovarian transplant research. *Fertility and Sterility*, 2024.

GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature genetics*, v. 25, n. 3, p. 279-283, 2000.

GARCIA, P. et al. Influence of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction in domestic animals*, v. 54, n. 2, p. 373-380, 2019.

GLAMOČLIJA, V. et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and sterility*, v. 83, n. 2, p. 426-431, 2005.

GONÇALVES, P. B. D. et. al. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e humana. 3. ed. - Rio de Janeiro : Roca, 2021.

GOSDEN, R. G. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 C. *Human Reproduction*, v. 9, n. 4, p. 597-603, 1994.

GRAHAM, M. E. et al. Assisted reproductive technology: Short-and long-term outcomes. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 65, n. 1, p. 38-49, 2023.

HADDAD, M. et al. Thoughts on the popularity of ICSI. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 38, p. 101-123, 2021.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. *Reprodução animal*, v. 6, p. 513, 2004.

HANRAHAN, J. P. et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction*, v. 70, n. 4, p. 900-909, 2004.

HAYASHI, M. et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, v. 140, n. 3, p. 1236-1244, 1999.

HICKS, E. C. et al. Zinc Chloride Supplemented during Ovarian Tissue Vitrification Improves In Vitro Follicle Development and Fertilization in Pigs. *The Ohio Journal of Science*, v. 121, n. 2, p. 56-63, 2021.

HORNSHØJ, V. G. et al. Hormonal response in patients transplanted with cryopreserved ovarian tissue is independent of whether freezing was performed in childhood or adulthood. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 38, p. 3039-3045, 2021.

HOSTE, K. et al. Polymeric prodrugs. *International journal of pharmaceutics*, v. 277, n. 1-2, p. 119-131, 2004.

HREINSSON, J. G. et al. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 87, n. 1, p. 316-321, 2002.

HUANG, T. et al. Decreased GDF9 and BMP15 in follicle fluid and granulosa cells and outcomes of IVF-ET among young patients with low prognosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 40, n. 3, p. 567-576, 2023.

HUNT, C. J. Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. *Stem cell banking: concepts and protocols*, p. 41-77, 2017.

ISHIJIMA, T. et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *Journal of Reproduction and Development*, v. 52, n. 2, p. 293-299, 2006.

ISRAELY, T. et al. Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: Multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, v. 52, n. 4, p. 741-750, 2004.

JEWGENOW, K. et al. Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. *International Zoo Yearbook*, v. 45, n. 1, p. 124-132, 2011.

JIAO, Y. et al. Molecular characterization of the follicular development of BMP15-edited pigs. *Reproduction*, v. 166, n. 4, p. 247-261, 2023.

JIVAGO, J. L. P. R. et al. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles. *Cryobiology*, v. 81, p. 34-42, 2018.

JITJUMNONG, J.; TANG, P. Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) Improves In Vitro Mouse Folliculogenesis. *Animals*, v. 13, n. 6, p. 980, 2023.

JUENGEL, J. L. et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal reproduction science*, v. 82, p. 447-460, 2004.

KARLSSON, J. O. M.; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, v. 17, n. 3, p. 243-256, 1996.

KEDEM, A. et al. Growth differentiating factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 both activate development of human primordial follicles in vitro, with seemingly more beneficial effects of GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 96, n. 8, p. E1246-E1254, 2011.

KIM, H. J. et al. Embryo selection based on morphological parameters in a single vitrified-warmed blastocyst transfer cycle. *Reproductive Sciences*, v. 28, p. 1060-1068, 2021.

KRISTENSEN, S. G. et al. A simple method to quantify follicle survival in cryopreserved human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 33, n. 12, p. 2276-2284, 2018.

LADANYI, C. et al. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 34, p. 709-722, 2017.

LEE, P. I. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *Journal of Controlled Release*, v. 2, p. 277-288, 1985.

LEITÃO C. C. F. et al. Effects of GDF-9 and FSH on mRNA expression for FSH-R, GDF-9 and BMPs in in vitro cultured goat preantral follicles. *Braz Arch Biol Techn.* 2014;57:200-8

LIAO, W. X. et al. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9: implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 6, p. 3713-3719, 2003.

- LIU, G. et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular cell*, v. 82, n. 2, p. 333-347, 2022.
- LIU, X. C. et al. Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved ovarian tissue in mice. *Cryobiology*, v. 96, p. 99-105, 2020.
- LIU, J. et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human reproduction*, v. 17, n. 3, p. 605-611, 2002.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 49-55, 2014.
- LOPES, C. A. P. et al. Cryopreservation of canine ovarian cortex using DMSO or 1, 3-propanediol. *Theriogenology*, v. 86, n. 5, p. 1165-1174, 2016.
- LUZ, N. R. N. et al. Short-term in vitro culture of canine ovarian tissue after cryopreservation by different techniques. 2025.
- MAGOFFIN, D. et al. Endocrinology of the Ovary. *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*, p. 391-403, 2005.
- MALANSKI, E. et al. Reproduction of the dog snapper *Lutjanus jocu* in captivity, linking ecological, and production observations. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 50, 2024.
- MARCOZZI, S. et al. Short-Term In Vitro Culture of Human Ovarian Tissue: A Comparative Study of Serum Supplementation for Primordial Follicle Survival. *Life*, v. 15, n. 10, p. 1509, 2025.
- MARINO, P. C. et al. Growth and differentiation factor-9 supplementation affects viability and morphology of preantral follicles in equine ovarian fragments during short-term in vitro culture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 62, p. e19180346, 2019.
- 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.
- MARTINS, J. L. A. et al. Cat preantral follicle survival after prolonged cooled storage followed by vitrification. *Cryobiology*, [s. l.], v. 81, n. September 2017, p. 94–100, 2018.
- MATSUSHIGE, C. et al. RGD-modified dextran hydrogel promotes follicle growth in three-dimensional ovarian tissue culture in mice. *Theriogenology*, v. 183, p. 120-131, 2022.

MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of general physiology*, v. 47, n. 2, p. 347-369, 1963.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MOHSENZADEH, M. et al. High efficiency of homemade culture medium supplemented with GDF9- β in human oocytes for rescue in vitro maturation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, v. 49, n. 2, p. 149, 2022.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. (Ed.). *Embriología clínica*. Elsevier, 2020.

MORRELL, J. M. Artificial insemination: current and future trends. *Artificial insemination in farm animals*, v. 1, p. 1-14, 2011.

MORSELLI, M. G. et al. A three-dimensional alginate system for in vitro culture of cumulus-denuded feline oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 1, p. 83-88, 2017.

MOTTERSHEAD, D. G. et al. Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 39, p. 24007-24020, 2015.

NAGASHIMA, J. B. et al. Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by in vitro fertilization. *PLoS One*, v. 10, n. 12, p. e0143930, 2015.

NAKAMURA, M. et al. CRISPR technologies for precise epigenome editing. *Nature Cell Biology*, v. 23, n. 1, p. 11-22, 2021.

ODANI, M. et al. Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiology*, v. 47, n. 2, p. 155-164, 2003.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *New England Journal of Medicine*, v. 342, n. 25, p. 1919-1919, 2000.

ORISAKA, M. et al. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 10, p. 2456-2468, 2006.

ORISAKA, M. et al. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*, v. 150, n. 6, p. 2740-2748, 2009.

OTSUKA, F. et al. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

OTSUKA, F.; MCTAVISH, K. J.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular reproduction and development*, v. 78, n. 1, p. 9-21, 2011.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology*, v. 143, n. 12, p. 4938-4941, 2002.

PAES, V. M. et al. Goat in vitro follicular response to insulin concentration is affected by base medium and follicular stage. *Small Ruminant. Res.* 2018;169:62-6

PALERMO, G. D. et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertility and sterility*, v. 63, n. 6, p. 1231-1240, 1995.

PALOMBA, Stefano et al. Beyond the Umbrella: a systematic review of the interventions for the Prevention of and reduction in the incidence and severity of ovarian hyperstimulation syndrome in patients who Undergo in Vitro fertilization treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 18, p. 14185, 2023.

PARK, K. E. et al. Effects of alginate hydrogels on in vitro maturation outcome of mouse preantral follicles. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, n. 3, p. 170-174, 2012.

PARK, J. E. et al. In vitro maturation on ovarian granulosa cells encapsulated in agarose matrix improves developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, v. 164, p. 42-50, 2021.

PAULINI, F; MELO, E. O. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in domestic animals*, v. 46, n. 2, p. 354-361, 2011.

PAULINI, F. et al. Avaliação da administração de eritropoietina na sobrevivência folicular em xenotransplante de tecido ovariano de gatas domésticas: um estudo piloto. 2021.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. *Preservation of human oocytes*, p. 34-46, 2009.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. *Theriogenology*, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 1193–1210, 2001.

PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G. In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 27–35, 2000.

PLAZA REYES, A.; LANNER, F. Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. *Development*, v. 144, n. 1, p. 3-7, 2017.

PTASZYNSKA, M. *Compêndio de reprodução animal*. Cap. 1, p. 1-19, Intervet, 2007.

RAMIREZ, G. et al. GDF-9 and BMP-15 mRNA levels in canine cumulus cells related to cumulus expansion and the maturation process. *Animals*, v. 10, n. 3, p. 462, 2020.

READER, K. L. et al. Signalling pathways involved in the cooperative effects of ovine and murine GDF9+ BMP15-stimulated thymidine uptake by rat granulosa cells. *Reproduction*, v. 142, n. 1, p. 123, 2011.

REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, v. 157, n. 5, p. 1415-1430, 2000.

REGAN, S. et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view, *Front. Endocrinol.* 9 (2018) 61 [em linha]. 2018.

REYNAUD, K. et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, v. 130, n. 2, p. 193-201, 2005.

RICHANI, D.; GILCHRIST, R. B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human reproduction update*, v. 24, n. 1, p. 1-14, 2018.

RIEPSAMEN, A. H. et al. Serum GDF9 and BMP15 as potential markers of ovarian function in women with and without polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, v. 98, n. 4, p. 567-577, 2023.

RODRIGUES, A. P. R. et al. In vitro culture of cryopreserved caprine ovarian tissue pieces and isolated follicles. *Cell Preservation Technology*, v. 4, n. 4, p. 290-298, 2006.

RODRIGUES, A. Q.. *Criopreservação e transplante de ovário em camundongos: atividade mitocondrial ovariana e efeito da eritropoietina sobre a sobrevivência folicular*. 2021.

ROKHADE, A. P. et al. Novel hydrogel microspheres of chitosan and pluronic F-127 for controlled release of 5-fluorouracil. *Journal of microencapsulation*, v. 24, n. 3, p. 274-288, 2007.

SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal reproduction science*, v. 122, n. 3-4, p. 151-163, 2010.

SEGINO, M. et al. In vitro culture of mouse GV oocytes and preantral follicles isolated from ovarian tissues cryopreserved by vitrification. *Human cell*, v. 16, n. 3, p. 109-116, 2003.

SEGINO, M. et al. In vitro follicular development of cryopreserved mouse ovarian tissue. *Reproduction*, v. 130, n. 2, p. 187-192, 2005.

SHAW, J. M.; TROUNSON, A. O. Ovarian tissue transplantation and cryopreservation: Application to maintenance and recovery of transgenic and inbred mouse lines. *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, p. 229-252, 2002.

SHEKARIAN, A. et al. In Vitro Culture of Mouse Preantral Follicle in Supplemented Medium with Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15). *Journal of Otorhinolaryngology and Facial Plastic Surgery*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2021.

SHI, Q. et al. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 8538, 2017.

SHIMASAKI, S. et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine reviews*, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004.

SILBER, S. J. et al. In-vitro maturation and transplantation of cryopreserved ovary tissue: understanding ovarian longevity. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 44, n. 3, p. 504-514, 2022.

SILVA, I. M. G. et al. Erythropoietin effects on cryopreserved/transplanted cat ovarian tissue: A comparison of two incubation methods. *Cryobiology*, v. 115, p. 104861, 2024.

SOBOLEWSKI, J. Studies of assisted reproductive technology in the 19th and 20th centuries. *Med. Weter*, v. 76, n. 11, p. 666-671, 2020.

SOUZA, S. S. et al. Equine ovarian tissue xenografting: impacts of cooling, vitrification, and VEGF. *Reproduction and Fertility*, v. 2, n. 4, p. 251-266, 2021.

SPITSCHAK, M.; HOEFLICH, A.. Potential functions of IGFBP-2 for ovarian folliculogenesis and steroidogenesis. *Frontiers in endocrinology*, v. 9, p. 119, 2018.

SUGISHITA, Y. et al. Quantification of residual cryoprotectants and cytotoxicity in thawed bovine ovarian tissues after slow freezing or vitrification. *Human Reproduction*, v. 37, n. 3, p. 522-533, 2022.

SUN, X.; KAUFMAN, P. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, v. 127, p. 175-186, 2018.

SUZUKI, H. et al. Assisted reproductive techniques for canines: Preservation of genetic material in domestic dogs. *Journal of Reproduction and Development*, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2022.

SWANSON, W. F. Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids. *ILAR journal*, v. 44, n. 4, p. 307-316, 2003.

SZAMATOWICZ, M. Assisted reproductive technology in reproductive medicine—possibilities and limitations. *Ginekologia polska*, v. 87, n. 12, p. 820-823, 2016.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological endocrinology*, v. 26, n. 8, p. 563-567, 2010.

TANG, K. Q. et al. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. *Animal reproduction science*, v. 131, n. 3-4, p. 129-134, 2012.

TELFER, Evelyn E.; ANDERSEN, Claus Yding. In vitro growth and maturation of primordial follicles and immature oocytes. *Fertility and Sterility*, v. 115, n. 5, p. 1116-1125, 2021.

THUWANUT, Paweena et al. Influence of hydrogel encapsulation during cryopreservation of ovarian tissues and impact of post-thawing in vitro culture systems in a research animal model. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, v. 48, n. 2, p. 111, 2021.

TOH, W S; LOH, Xian Jun. Advances in hydrogel delivery systems for tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, v. 45, p. 690-697, 2014.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VATANPARAST, M. et al. GDF9- β promotes folliculogenesis in sheep ovarian transplantation onto the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) in cryopreservation programs. *Archives of gynecology and obstetrics*, v. 298, n. 3, p. 607-615, 2018.

VILARINO, Marcela et al. CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 17472, 2017.

VILELA, J. M. V. et al. Function of Cryopreserved Cat ovarian tissue after Autotransplantation. *Animals* 1065: 1–13 [em linha]. 2019.

VITT, U. A. et al. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of reproduction*, v. 62, n. 2, p. 370-377, 2000.

XU, B; FENG, H. L. Ovulation, fertilization and preimplantation embryonic development in raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*). *Animal reproduction science*, v. 176, p. 78-84, 2017.

WAKASA, I. et al. Distribution of follicles in canine ovarian tissues and xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissues with even distribution of follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, p. 219-223, 2017.

WANDJI S. A. et al.. Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology* (1998) 139(12):5205–14.

WANI, Nisar Ahmad. In vitro embryo production (IVEP) in camelids: Present status and future perspectives. *Reproductive Biology*, v. 21, n. 1, p. 100471, 2021.

WHEELER, M. B., RUBESSA, M. Integration of microfluidics in animal in vitro embryo production. *Molecular Human Reproduction*, Volume 23, Issue 4, April 2017

WHITTINGHAM, David G.; LEIBO, Stanley P.; MAZUR, Peter. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. *Science*, v. 178, n. 4059, p. 411-414, 1972.

WILDT, D. E. et al. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in North American zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. *Zoo Biology*, v. 12, n. 1, p. 45-80, 1993.

YASUE, Akihiro et al. Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems. *Scientific reports*, v. 4, n. 1, p. 5705, 2014.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, v. 67, n. 1, p. 81-89, 2007.

YIN, H. et al. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Human Reproduction*, v. 18, n. 6, p. 1165-1172, 2003.

YOUM, H. W. et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Human reproduction*, v. 29, n. 4, p. 720-730, 2014.

ZAHMEL, J. et al. Current state of In vitro embryo production in African lion (*Panthera leo*). *Animals*, v. 12, n. 11, p. 1424, 2022.

ZAND, E et al. Successful 3D culture and transplantation of mouse isolated preantral follicles in hydrogel of bioengineered Wharton's jelly. *Plos one*, v. 18, n. 9, p. e0290095, 2023.

ZANETTA, L. et al. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *International journal of cancer*, v. 85, n. 2, p. 281-288, 2000.

ZHAO, X. et al. A novel three-dimensional follicle culture system decreases oxidative stress and promotes the prolonged culture of human granulosa cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 15, n. 12, p. 15084-15095, 2023.

ANEXO I



Universidade de Brasília

Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 23 de novembro de 2022.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**PRODUÇÃO DE MATRIZ OVARIANA BIOFABRICADA ASSOCIADA A FATORES DE CRESCIMENTO NANOENCAPSULADOS PARA O CULTIVO 3D E TRANSPLANTE: UMA ALTERNATIVA INOVADORA NA RETOMADA DA FERTILIDADE FEMININA IN VIVO E IN VITRO**”, SEI n. 23106.126845/2022-65, sob responsabilidade da pesquisadora Fernanda Paulini, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 9ª reunião extraordinária, em 17/11/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* – nude (25 fêmeas), provenientes da Universidade Católica de Brasília. O presente certificado é válido pelo período de 30/11/2022 a 25/12/2025.



Carina Krewer

Dra. Carina da Costa Krewer

Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.