



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA ANIMAL



**Recelularização de matriz extracelular descelularizada de tecido ovariano  
bovino com fibroblastos humanos – viabilidade e caracterização morfológica**

**Mariana Sousa Matos**

Brasília

Janeiro de 2026



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOLOGIA ANIMAL



**Recelularização de matriz extracelular descelularizada de tecido ovariano bovino com fibroblastos humanos – viabilidade e caracterização morfológica**

**Mariana Sousa Matos**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador(a): Carolina Madeira Lucci

Brasília

Janeiro de 2026

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que me acompanharam nessa jornada desafiadora que me trouxe muitos aprendizados e crescimento pessoal.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Dra. Carolina Madeira Lucci, pela confiança no desenvolvimento do projeto, orientação, incentivo e dedicação na orientação, que diante dos todos os percalços, se mostrou disponível para tirar dúvidas e discutir novas ideias para o andamento do trabalho.

Agradeço a todos os colegas do laboratório, que acompanharam de perto a rotina de experimentos e indagações. Em especial, agradeço à Bruna e Louiz, pela amizade, companheirismo e conselhos.

À minha família, em especial minha mãe e irmã, Adriana, que não mediram esforços para que chegasse até aqui. Agradeço pelo apoio, carinho e pela paciência. Obrigada por acreditarem em mim em todos os momentos que passamos, pelo acolhimento e amor incondicional.

Ao meu namorado, Vinícius, que ao longo dessa etapa se tornou meu marido e companheiro de vida. Agradeço não somente pelo companheirismo, mas pelo apoio emocional e incentivo. Sem dúvidas, sem sua compreensão, atenção e paciência não poderia ter concluído esse trabalho. Obrigada por acreditar e não duvidar de mim, por estar presente nos altos e baixos, no cansaço e na incerteza, mas sempre me trazendo a confiança que precisava para perseverar.

Agradeço aos meus amigos, que se fizeram presentes em várias etapas do processo, desde o incentivo para começar, quanto para terminar o mestrado.

Agradeço à EMBRAPA-CENARGEN pela doação dos ovários bovinos, em especial Isabella Grisi.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para a conclusão desta etapa tão importante da minha formação.

## SUMÁRIO

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>RESUMO</b> .....                                                     | ii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                   | iii |
| <b>I. INTRODUÇÃO</b> .....                                              | 1   |
| <b>II. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                    | 3   |
| 2.1 Alternativas de manutenção/recuperação da fertilidade feminina..... | 3   |
| 2.2 Morfologia ovariana .....                                           | 6   |
| 2.2.1 Matriz extracelular ovariana .....                                | 7   |
| 2.2.2 Células estromais .....                                           | 9   |
| 2.2.3 Folículos ovarianos .....                                         | 11  |
| 2.3. Foliculogênese.....                                                | 11  |
| 2.4 Ovário Artificial Transplantável (OAT).....                         | 16  |
| 2.5. Matriz Extracelular Descelularizada (dMEC).....                    | 20  |
| <b>III. OBJETIVOS</b> .....                                             | 23  |
| 3.1 Objetivo geral.....                                                 | 23  |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                         | 23  |
| <b>IV. METODOLOGIA</b> .....                                            | 24  |
| 4.1 Obtenção da matriz extracelular descelularizada .....               | 24  |
| 4.2 Cultivo celular .....                                               | 24  |
| 4.3 Análises microscópicas.....                                         | 25  |
| <b>V. RESULTADOS</b> .....                                              | 27  |
| <b>VI. DISCUSSÃO</b> .....                                              | 35  |
| <b>VII. CONCLUSÃO</b> .....                                             | 39  |
| <b>VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                 | 39  |
| <b>IX. REFERÊNCIAS</b> .....                                            | 41  |

## RESUMO

A engenharia de tecidos surge com uma nova alternativa para a restauração da fertilidade de pacientes oncológicas: o desenvolvimento de um ovário artificial transplantável (OAT). Um OAT pode ser desenvolvido a partir de diversos materiais, mas dentre eles, a produção de um tecido acelular através da técnica de descelularização tem se tornado uma estratégia promissora. A preservação de componentes e estruturas presentes na matriz extracelular (MEC) após a descelularização do tecido nativo é necessário para que esse biomaterial possa ser novamente colonizado por células. O tecido ovariano bovino foi previamente descelularizado com a combinação do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e o hidróxido de sódio (NaOH), e a sua capacidade de recelularização foi avaliada através do método de agitação (*rotational seeding*). As matrizes extracelulares descelularizadas (dMEC) derivadas de tecido ovariano bovino foram incubadas com as células de linhagem fibroblásticas humanas L-132 ao longo de 14 dias. Os resultados indicaram que o método escolhido favoreceu a adesão celular inicial, bem como uma infiltração celular progressiva no interior da dMEC, promovendo uma íntima relação célula-dMEC. As análises morfológicas apontaram a integridade da dMEC ao longo do tempo, e as análises ultraestruturais indicaram a sua remodelagem ao longo do cultivo devido à interação com as células. Esses achados implicam que essa metodologia possibilita uma recelularização eficiente. A dMEC ovariana bovina demonstrou plena biocompatibilidade com as células derivadas de outro tecido, permitindo o crescimento celular adequado ao longo do cultivo, o que reforça o potencial de um tecido acelular no desenvolvimento de um OAT.

**Palavra-chave:** recelularização, colonização, morfologia, ultraestrutura, tecido ovariano, fibroblastos

**ABSTRACT**

Tissue engineering has emerged as a novel alternative for the restoration of fertility in oncological patients through the development of a transplantable artificial ovary (TAO). A TAO can be developed from different materials; however, among them, the production of an acellular tissue through the decellularization technique has become a promising strategy. The preservation of components and structures present in the extracellular matrix (ECM) after decellularization of the native tissue is required to enable subsequent cell colonization of this biomaterial. Bovine ovarian tissue was previously decellularized using a combination of the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium hydroxide (NaOH), and its recellularization capacity was evaluated using the rotational seeding method. Decellularized extracellular matrices (dECM) derived from bovine ovarian tissue were incubated with human fibroblastic L-132 cells for 14 days. The results indicated that the selected method favored initial cell adhesion, as well as progressive cellular infiltration into the dECM, promoting an intimate cell–dECM interaction. Morphological analyses demonstrated the integrity of the dECM over time, while ultrastructural analyses indicated its remodeling throughout the culture period due to cell interaction. These findings imply that this methodology enables an efficient recellularization. Bovine ovarian dECM demonstrated full biocompatibility with cells derived from a different tissue, enabling adequate cell growth throughout the culture period, which reinforces the potential of an acellular tissue in the development of a TAO.

**Keywords:** recellularization, colonization, morphology, ultrastructure, ovarian tissue, fibroblasts

## I. INTRODUÇÃO

Censo recente mostra que, cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com câncer, das quais mais de 9,6 milhões eram mulheres (World Health Organization, 2024; World Cancer Research Fund, 2024). Além disso, a incidência de câncer em crianças e adolescentes aumenta 0,6% e 0,7% a cada ano, respectivamente (SIEGEL et al., 2021). A sobrevivência dos pacientes após tratamento oncológico aumentou (SIEGEL et al., 2021), mas o tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia expõe as pacientes à insuficiência ovariana prematura (IOP) e/ou infertilidade (CHEMAITILLY et al., 2017). Os efeitos gonadotóxicos do tratamento incluem a morte de folículos primordiais (ALSHAIKH et al., 2020, MALHOTRA et al., 2025), fibrose ovariana e perda de vasos sanguíneos (CANOSA et al., 2023), além de possivelmente estar envolvido na indução da apoptose de folículos em estágio de desenvolvimento mais avançado (BÖTTCHER e WINKLER-CREPAZ, 2020).

Como em muitos casos o tratamento oncológico deve ser iniciado imediatamente, restam poucas alternativas para preservar a fertilidade dessas mulheres. A criopreservação do tecido ovariano tem sido uma das opções mais indicadas para a restauração da fertilidade (MIRZAEIAN et al., 2023), com o posterior autotransplante, uma vez cessado o tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia e confirmada a remissão da doença. Entretanto, o transplante de tecido ovariano pode envolver o risco de reintrodução de células malignas, especialmente em alguns tipos de cânceres, como neuroblastoma, leucemia, linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin, que apresentam grande chance de metástase ovariana (AMORIM e SHIKANOV, 2016; LAVAFIAN et al., 2023).

Assim, como uma alternativa para esses casos, surge o ovário artificial transplantável (OAT), cujo principal objetivo é permitir o crescimento e desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais da mesma maneira que ocorre no tecido *in vivo*, e que possam ser transplantados sem risco de reintrodução de células cancerígenas (WU et al., 2023). Para tal, folículos ovarianos precisam ser isolados e realocados em uma base tridimensional que, após o transplante, permita o crescimento folicular e vascularização, providenciando assim oxigênio e nutrientes para as células ovarianas, endoteliais e estruturas foliculares (CANOSA et al., 2023). Essa base pode ser derivada de substâncias naturais, como polímeros de fibrina e alginato, ou sintéticas como o polietilenoglicol (PEG) (BÖTTCHER e WINKLER-

CREPAZ, 2020). Apesar das várias investigações sobre os polímeros naturais na engenharia de tecidos, a sua degradabilidade é bastante variável *in vivo*, além de não conter uma estrutura tridimensional tão estável quanto a encontrada no órgão nativo. Assim um biomaterial de origem natural tem ganhado mais destaque nos últimos anos, obtida através da técnica de descelularização (ISAEVA et al., 2022).

Esse biomaterial derivado de uma matriz extracelular descelularizada (dMEC) exhibe grandes vantagens, pois as características específicas de cada tecido e órgão, como disposição e organização de moléculas importantes para o crescimento celular são preservadas (EIVAZKHANI et al., 2019; WU et al., 2023). Essa estrutura também aparenta não conter moléculas que possam resultar em reações inflamatórias e/ou imunes (LIU et al., 2022), tornando-a promissora para transplantes. O trabalho pioneiro de Laronda e colaboradores demonstrou que o transplante de um tecido acelular bovino, previamente cultivado com células ovarianas isoladas de camundongos, foi capaz de restaurar a produção hormonal em camundongos sem apresentar uma resposta imune exacerbada, apontando a efetividade desse material (LARONDA et al., 2015).

A obtenção de um tecido acelular a partir da técnica de descelularização pode ser feita a partir de diversos protocolos, utilizando diferentes reagentes e tempos de incubação, visando tanto a preservação da arquitetura tridimensional do tecido, quanto a eficiência em eliminar as células. Com esse objetivo, um novo protocolo foi estabelecido por León-Félix e colaboradores, combinando o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS) com a base inorgânica hidróxido de sódio (NaOH) para a preparação de uma dMEC derivada de tecido ovariano bovino (LEÓN-FÉLIX et al., 2024). Este método demonstrou a menor concentração dos reagentes (0,1% de SDS e 0,02 M de NaOH) e o menor tempo de incubação (12h) do tecido na solução capazes de descelularizar completamente o tecido, e preservar não somente a microarquitetura das amostras, mas também conservar mais de 90% das proteínas que constituem o matrissoma simultaneamente (LEÓN-FÉLIX et al., 2025). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a dMEC produzida a partir desse novo protocolo é viável para a recelularização.

## II. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Alternativas de manutenção/recuperação da fertilidade feminina

A infertilidade e suas consequências impactam não apenas a qualidade de vida do casal que deseja uma família, mas também a economia e cadeia produtiva devido a diminuição da taxa de natalidade (ALMEIDA et al., 2023). Além disso, é fato que a infertilidade impacta a mulher de forma significativa na sua vida emocional e pessoal. Pode ser causada por diversos fatores, podendo ser um processo espontâneo ou induzido como consequência de tratamentos contra doenças, como quimioterapia e/ou radioterapia (KHALEGHI et al., 2023). Estima-se que 1 em cada 6 mulheres desenvolvam câncer ao longo da vida, cujo tratamento agressivo possa levar à IOP (KHALEGHI et al., 2023). A preservação da fertilidade feminina ainda é um desafio, especialmente em casos de cânceres hematológicos, onde o tratamento com radioterapia, quimioterapia (principalmente com agente alquilantes), ou a combinação desses procedimentos podem induzir a IOP (DONNEZ e DOLMANS, 2017). A ciclofosfamida é o alquilante que tem o maior efeito deletério tanto no ovócito quanto nas células da granulosa (DONNEZ e DOLMANS, 2017; MALHOTRA et al., 2025), além da radioterapia na região pélvica e abdominal ser conhecida por causar disfunção ovariana, uma vez que o ovócito humano é extremamente sensível a radiação (DONNEZ e DOLMANS, 2017; TSUI et al., 2024). Além dos efeitos deletérios na reserva ovariana, os hormônios ovarianos também são afetados pelo tratamento oncológico, levando a menopausa precoce e provocando outros distúrbios sistêmicos, como problemas cardiovasculares e ósseos, além de afetar a capacidade cicatrizante da paciente (HENNING et al., 2021).

Para preservar a fertilidade, a vitrificação de ovócitos maduros pode ser uma alternativa para mulheres adultas. Entretanto, a taxa de nascimentos após a vitrificação de ovócitos é menor em pacientes com câncer em relação às mulheres que realizaram o procedimento devido a subfertilidade relacionada com outros fatores não oncológicos, como a idade (COBO et al, 2016; DONNEZ e DOLMANS, 2017). No entanto, a eficiência do congelamento dos ovócitos depende de vários fatores, e o número é limitado ao de folículos antrais disponíveis no momento da coleta. Além disso, é preciso ter em mente que, para a vitrificação de ovócitos, é necessário adiar a quimioterapia em cerca de duas semanas, e ainda, em casos de protocolos específicos para a estimulação ovariana, é preciso verificar se os estrógenos

utilizados podem afetar o tipo de câncer a ser tratado (CAKMAK e ROSEN, 2013; DONNEZ e DOLMANS, 2017).

Já para pacientes adolescentes, crianças ou que por qualquer motivo não podem passar pelo processo de estimulação ovariana, a criopreservação do tecido ovariano é a única opção. Uma vez que o eixo hipotálamo-hipófise-ovário ainda não está totalmente desenvolvido, pacientes pré-púberes são não-responsivas ao tratamento de estimulação ovariana (TSUI et al., 2024), pois essa maturação só é alcançada nas etapas finais da puberdade (MIHM et al., 2011). Pacientes que precisam iniciar o tratamento imediatamente não dispõem de tempo suficiente para passar pelo procedimento de estimulação ovariana, e tumores responsivos a estrógenos tornam inviável o procedimento (MEHNERT, 2015). Nestes casos, a única alternativa é a criopreservação do tecido ovariano, que após a remissão da doença pode ser transplantado de volta para a paciente. A grande preocupação com essa técnica é o risco de reintroduzir células malignas que possam ter sido preservadas no tecido, pois um estudo já demonstrou que o congelamento seguido do transplante de tecido ovariano obtido de camundonga com metástase ovariana tem o potencial de levar a recorrência de novos tumores (DOLMANS et al., 2016; CANOSA et al., 2023).

A criopreservação do tecido ovariano seguida de autotransplante tem sido bastante utilizada e já resultou em mais de 200 nascimentos ao redor do mundo (ALMEIDA et al., 2023). Após o transplante do tecido ovariano, a sua atividade é restaurada em mais de 95% dos casos (DONNEZ e DOLMANS, 2017). Mesmo assim, a chance de gravidez espontânea em pacientes que trataram câncer é reduzida para cerca de 30% em comparação com a população em geral (GANDOLFI et al., 2019). Os mecanismos moleculares envolvidos na maturação folicular ainda não são completamente conhecidos, logo, a perda significativa dos folículos observada após o transplante ainda não é algo elucidado. Estudos indicam que o processo de congelamento em si é bem deletério para os folículos, e o quadro de baixa oxigenação nos momentos iniciais pós-transplante também contribuem para essa perda (THUWANUT et al., 2025).

Todavia, outras alternativas estão sendo investigadas, como tratamentos hormonais, crescimento de folículos *in vitro*, e na última década, o desenvolvimento de um ovário artificial tem sido explorado para garantir a restauração da função ovariana (BUCKENMEYER ET AL., 2023).

O tratamento com os agonistas do hormônio GnRH (do inglês, *gonadotropin releasing hormone*) geralmente é utilizado para induzir a maturação de ovócitos que serão criopreservados. O momento ideal de sua aplicação (começo ou fim do ciclo menstrual) ainda é alvo de debate, pois existe o risco de induzir a síndrome da hiperestimulação ovariana (SHO), algo que deve ser evitado no contexto oncológico em que a paciente se encontra (MAHAJAN, 2015; VALSAMAKIS et al., 2022). No contexto das mulheres com IOP induzidas pela quimioterapia, o uso de agonista de GnRH tem sido adotado como uma estratégia para proteger o ovário durante o tratamento, podendo evitar o quadro de amenorreia comumente induzido e trombocitopenia; entretanto, sua eficiência ainda é alvo de estudos (FISCH E ABIR, 2018; OKTAY et al., 2018).

Já a técnica de desenvolvimento de folículos *in vitro* busca obter ovócitos competentes para a fertilização *in vitro* (FIV); é uma abordagem promissora e foi aprimorada ao longo dos últimos anos, com o uso de culturas tridimensionais utilizando hidrogéis que mimetizam a estrutura nativa do ovário para a foliculogênese (GARGUS e WOODRUFF, 2021). Os resultados com esta técnica também foram melhorados, com o nascimento de filhotes de camundongos, entretanto, não foi observada a mesma tendência quando se trata de folículos humanos (BUCKENMEYER et al., 2023), apesar de ovócitos competentes terem sido obtidos (SIMON et al., 2020). Outra dificuldade enfrentada pela técnica é a diferença entre a taxa de maturação dos ovócitos de mulheres adultas em relação às de adolescentes e jovens adultas, gerando gametas de baixa qualidade (TSUI et al., 2024). Até os dias atuais, ainda existem mecanismos moleculares envolvidos na foliculogênese que não são conhecidos, tampouco quais condições de meio de cultivo *in vitro* são ideais para mimetizar o processo natural (KIM et al., 2020). Até o momento, o principal obstáculo a ser superado nesta técnica é o desenvolvimento de um protocolo que permita o desenvolvimento folicular completo, uma vez que o crescimento *in vitro* é limitado por não fornecer aos folículos a mesma composição extracelular do tecido ovariano (ALMEIDA et al., 2023).

Assim, a concepção de um ovário artificial surge na expectativa de solucionar as limitações vistas no cultivo *in vitro* isolado de folículos. O intuito é combinar uma estrutura que permita o desenvolvimento folicular pleno e também retome as funções endócrinas e reprodutivas de um ovário após o transplante. Essa é uma alternativa

particularmente relevante e potencialmente segura para pacientes oncológicas que não podem se submeter ou esperar o tempo necessário para os tratamentos convencionais citados anteriormente.

## **2.2 Morfologia ovariana**

Todo órgão pode ser classificado com duas porções: o parênquima, que conta com as células e tecidos especializados do órgão, e o estroma, que serve como um tecido de amparo para o desenvolvimento do órgão (KINNEAR et al., 2020). A unidade funcional nos ovários é o folículo ovariano, compondo o parênquima, enquanto o estroma ovariano é entendido como todas as outras estruturas que o compõe, exceto os folículos (KINNEAR et al., 2020). É no estroma que encontramos nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, essenciais para a nutrição e manutenção da atividade ovariana ao longo do ciclo, além das células estromais, que compreende uma população celular vital para a foliculogênese (GARGUS e WOODRUFF, 2021). Nos ovários, encontra-se um tecido altamente complexo, que passa por processos cíclicos e grandes variações na sua estrutura e composição conforme os processos de foliculogênese e esteroidogênese acontecem (BERKHOLTZ et al., 2006).

O ovário é uma estrutura extremamente dinâmica, podendo ser dividido em duas partes, onde a porção externa do ovário é chamada de córtex, que é rica em colágeno e é mais rígida em relação a medula, que compõe a parte interna do ovário. Esse gradiente de rigidez ovariana parece ser crítico para o armazenamento e sobrevivência tanto do ovócito, quanto dos componentes foliculares, onde estudos com alginato demonstraram a necessidade de ambientes mais rígidos para a manutenção de folículos primordiais, e regiões menos rígidas para as etapas finais da foliculogênese (SHAH et al., 2018; GARGUS e WOODRUFF, 2021). Assim, esse gradiente atua tanto na limitação do crescimento folicular, quanto na ativação dessas estruturas e suas atividades endócrinas (SHAH et al., 2018; SHEN et al., 2023). Existem trabalhos que apontam que as populações de células estromais da região cortical podem secretar diferentes componentes da MEC em relação às células encontradas na região medular (KINNEAR et al., 2020), podendo explicar esse gradiente de rigidez ovariana, assim como as células estromais da região medular parecem apresentar maior capacidade esteroidogênica em relação à população encontrada no córtex (GARGUS e WOODRUFF, 2021). Os folículos são distribuídos de forma heterogênea ao longo do gradiente de colágeno na região cortical, onde se

observa a tendência dos folículos primordiais se encontrarem na parte mais externa (SCHIMIDT et al., 2003). Conforme a foliculogênese prossegue, os folículos pré-antrais migram para próximo da região medular, que é rica em vasos sanguíneos e apresenta poros maiores para acolher os folículos em crescimento. Além de ser mais permeável devido às fibras de fibronectina, a região medular provém oxigênio e nutrientes para o crescimento adequado e transição para o folículo antral (SHAH et al., 2018; HENNING et al., 2021).

### **2.2.1 Matriz extracelular ovariana**

A constituição molecular de uma MEC varia conforme o tecido, tanto em concentração quanto em composição, mas os componentes básicos consistem em glicoproteínas, colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (ALMEIDA et al., 2023). As glicoproteínas atuam na elasticidade do tecido, onde as mais abundantes são as lamininas, fibronectinas e elastinas. As lamininas são essenciais no processo de comunicação e adesão celular, e no tecido ovariano, aparecem envolvidas na delimitação entre a membrana basal folicular e o estroma, além de formar uma barreira entre o estroma e o epitélio ovariano na região cortical (BERKHOLTZ et al., 2006; LIU et al., 2022). As fibronectinas parecem estar envolvidas na sinalização entre as células e a MEC (BERKHOLTZ et al., 2006), enquanto as elastinas, como o nome sugere, atuam na manutenção da elasticidade do tecido (ISAEVA et al., 2022). O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos, onde pode ser classificada conforme sua disposição no estroma do tecido em fibras colágenas, compostas majoritariamente por colágeno tipo I, e fibras reticulares, que formam a associação entre colágeno tipo III e proteoglicanos e/ou glicoproteínas (USHIKI, 2002). Existem mais de 20 tipos de colágenos, mas no tecido ovariano, os tipos mais abundantes são os tipos I, IV e VI, o que confere plasticidade ao órgão que passa por modificações a cada ciclo folicular (ALMEIDA et al., 2023). Os glicosaminoglicanos aparecem em maiores quantidades no córtex ovariano, e além de atuarem como outra molécula de sustentação do estroma, estão envolvidos na retenção de água e fatores de crescimento pelo tecido, podendo também estar relacionada ao processo de diferenciação das células da granulosa em células da granulosa murais e células do *cumulus* (CHITI et al., 2022). Os proteoglicanos também atuam na hidratação do tecido, trazendo moléculas de água para o espaço intersticial (ISAEVA et al., 2022).

As glicoproteínas, os colágenos e os proteoglicanos são os componentes mais abundantes no tecido ovariano em todas as espécies, e junto com outras proteínas reguladoras, formam o matrissoma, que descreve as proteínas envolvidas na composição da MEC e seus fatores associados (OUNI et al., 2019). Entre o tecido bovino e humano, mais de 80% das proteínas do matrissoma são equivalentes, o que sugere a sua baixa imunogenicidade para transplantes (LEÓN-FÉLIX et al., 2025). Os colágenos, por exemplo, que são moléculas essenciais para a modulação da rigidez do ovário durante os ciclos, correspondem a 11% das proteínas da MEC, contando com 18 tipos no ovário bovino, onde 13 dessas mesmas moléculas também compõem o ovário humano (OUNI et al., 2019; LEÓN-FELIX et al., 2025). As glicoproteínas são mais numerosas no ovário da vaca (58) em relação ao humano (28), mas vale destacar a presença das lamininas (subunidades alfa, beta e gama), fibronectina (FN1) e os nidógenos (NID1 e NID2) em ambos os tecidos, indicando sua relevância na fronteira entre o folículo e o estroma (OUNI et al., 2019; OUNI et al., 2022; LEÓN-FELIX et al., 2025). Em menores quantidades, ainda é possível observar a similaridades dos proteoglicanos, onde 9 de 11 moléculas são iguais em humanos e bovinos, onde moléculas importantes na comunicação entre o folículo e o estroma aparecem conservadas, como a decorina (DCN) e versican (VCAN), e também alguns fatores como a cistatina B e fator de coagulação II, que são proteínas envolvidas tanto no processo de fibrose, quanto na manutenção das células pela prevenção de estresse oxidativo (MCARTHUR et al., 2000; RODGERS et al., 2003; OUNI et al., 2022; LEÓN-FELIX et al., 2025). A Tabela 1 traz algumas das moléculas encontradas tanto no ovário bovino quanto humano, e seus prováveis papéis na dinâmica ovariana (DUENSING e VAN PUTTEN, 1997; PALEY et al., 2000; SALGADO et al., 2011; WANG et al., 2015; KUJAWA et al., 2020).

**Tabela 1.** Exemplos de proteínas em comum entre o ovário humano e bovino e sua função

| Tipo de molécula | Nome                                     | Função           |
|------------------|------------------------------------------|------------------|
| Colágenos        | Collagen type I alpha 1 chain (COL1A1)   | Adesão celular   |
|                  | Collagen type I alpha 2 chain (COL1A2)   | Adesão celular   |
|                  | Collagen type III alpha 1 chain (COL3A1) | Adesão celular   |
|                  | Collagen type IV alpha 1 chain (COL4A1)  | Modulação da MEC |

|                |                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                | Collagen type IV alpha 2 chain (COL4A2)<br>Collagen type VI alpha 1 chain (COL6A1)<br>Collagen type VI alpha 2 chain (COL6A2)<br>Collagen type VI alpha 3 chain (COL6A3)                                              | Modulação da MEC<br>Adesão celular<br>Adesão celular<br>Adesão celular                                                                                                     |
| Glicoproteínas | Fibrillin 1 (FBN1)<br>Laminin subunit alpha 5 (LAMA5)<br>Laminin subunit beta 1 (LAMB1)<br>Laminin subunit gamma 1 (LAMC1)<br>Nidogen 1 (NID1)<br>Nidogen 2 (NID2)<br>Periostin (POSTN)<br>SPARC<br>Vitronectin (VTN) | Adesão celular<br>Modulação da MEC<br>Modulação da MEC<br>Modulação da MEC<br>Modulação da MEC<br>Modulação da MEC<br>Modulação da MEC<br>Adesão celular<br>Adesão celular |
| Proteoglicanos | Biglycan (BGN)<br>Decorin (DCN)<br>Heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2)<br>Versican (VCAN)                                                                                                                          | Adesão celular<br>Adesão celular<br>Comunicação com folículo<br>Comunicação com folículo                                                                                   |

Fonte: León-Félix et al., 2025 e Rodgers et al., 2003.

É importante ressaltar que os folículos contam com um ambiente perifolicular único denominado lâmina basal, composta principalmente por laminina e colágeno do tipo IV, responsável por delimitar a camada de células da granulosa e células da teca, onde estudos apontam que a síntese desses componentes vem majoritariamente das células da granulosa (KINNEAR et al., 2020). Por fim, a característica cíclica particular do tecido ovariano atua na modulação da MEC, onde os folículos e as células estromais secretam enzimas, como as metaloproteinases, responsáveis pelo afrouxamento da MEC, que por sua vez, libera citocinas e fatores de crescimento que permitem a expansão folicular (KINNEAR et al., 2020; SHEN et al., 2023).

### 2.2.2 Células estromais

O termo “células estromais” não se refere a uma população homogênea de células, mas sim, um conjunto contendo células intersticiais, células semelhantes a fibroblastos e outros tipos celulares ainda não totalmente caracterizados (KINNEAR et al., 2020). Em ovários de mulheres adultas, a população de células estromais conta com quase 20 tipos de células (HENNING et al., 2021). Como apresentam diferentes funções no tecido, essas células estromais são fundamentais para a composição da

MEC e para a interação com os folículos, que são estruturas complexas. Os folículos necessitam sinalizar para as células somáticas do ovário que estão se diferenciando, demandando moléculas e hormônios que são essenciais para o processo de foliculogênese, como citocinas e fatores de crescimento (GRUBLIAUSKAITĖ et al., 2024).

No estroma ovariano encontramos principalmente as células da teca, fibroblastos e macrófagos, essenciais para a manutenção hormonal e síntese de componentes da MEC (SIMON et al., 2020; ALMEIDA et al., 2023), onde pressupõe-se que a origem dessas células vem das células tronco mesenquimais (GARGUS e WOODRUFF, 2021). As células da teca são as células que circundam o folículo, podendo ser dividida em suas populações: células da teca interna e externa; são responsáveis essencialmente pela produção hormonal do tecido ovariano (TAGLER et al., 2011). Os fibroblastos são fundamentais na modelagem da MEC, e no contexto ovariano, são responsáveis pela produção de diferentes tipos de colágenos, glicoproteínas etc. que sinalizam a ovulação e influenciam a biomecânica ovariana (SUN e FU, 2019). Eles também atuam no processo de reparação tecidual (SUN e FU, 2019), e sua presença em co-cultivos com folículos de camundongos foi capaz de otimizar a sobrevivência desses folículos (SIMON et al., 2020). Existem células estromais classificadas como *fibroblast-like* que ainda não foram descritas, mas algumas populações foram identificadas no processo de esteroidogênese e também na biomecânica ao redor do folículo (SHEN et al., 2023). O papel exato dos macrófagos no tecido ovariano ainda não é totalmente compreendido, mas macrófagos do tipo M1 parecem estar envolvidos no crescimento folicular, esteroidogênese e angiogênese, além de participar do processo inflamatório e o colapso da MEC que ocorre no momento da ovulação (SHEN et al., 2023). Existem ainda células do sistema imune, que estão envolvidas na manutenção do tecido ovariano através da fagocitose, mas existem poucos estudos sobre este assunto (SHEN et al., 2023). Por fim, as células intersticiais, juntamente com as células da teca já diferenciadas, são capazes de produzir esteróides; estudos com células intersticiais bovinas apontaram a presença de receptores de estrógenos, além da produção de esteróides por essas células ter sido observado no começo do desenvolvimento fetal em humanos (KINNEAR et al., 2020).

### 2.2.3 Folículos ovarianos

Os folículos são a unidade funcional dos ovários, e podem ser classificados conforme seu estágio de desenvolvimento. Os folículos primordiais, primários e secundários são denominados folículos pré-antrais, pois são folículos que ainda não formaram o antro, uma cavidade preenchida com líquido, essencial para a foliculogênese. A partir do folículo secundário, temos o desenvolvimento do antro e a especialização das células foliculares, podendo classificá-lo como folículo antral (MORTON et al., 2023). O desenvolvimento folicular é um processo lento denominado foliculogênese, que será detalhado a seguir.

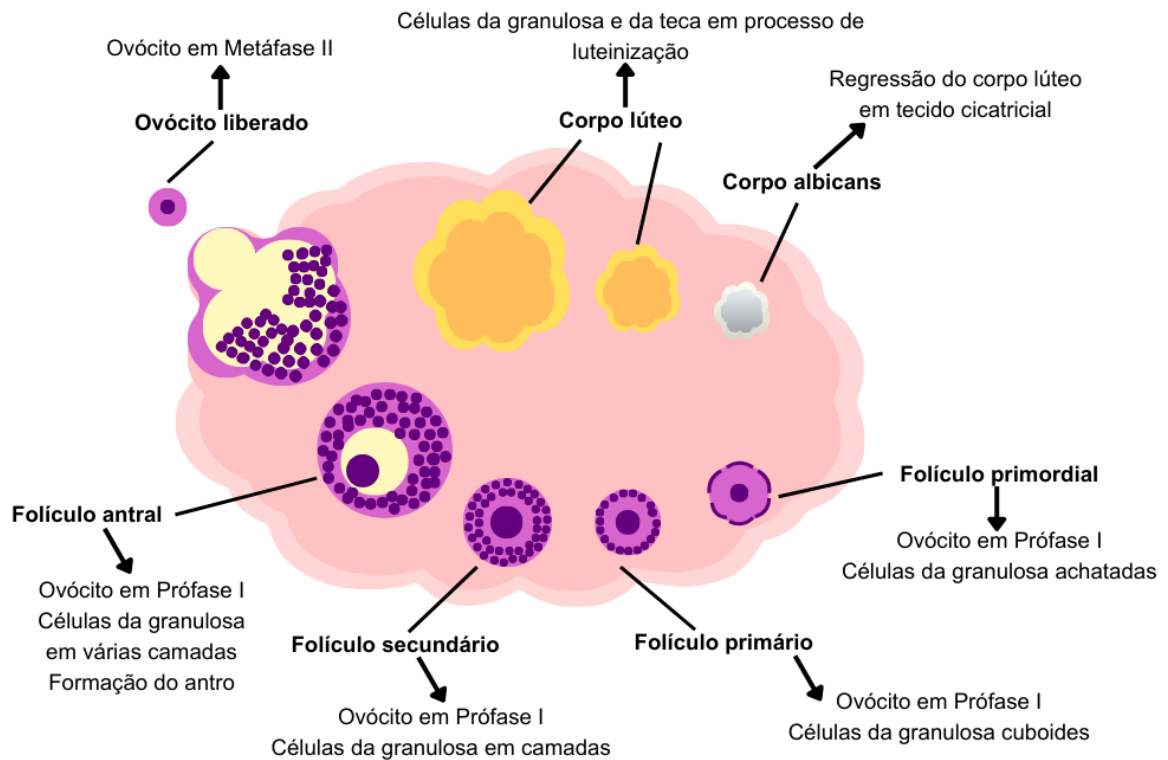
### 2.3. Foliculogênese

O processo de foliculogênese envolve sinalizações endócrinas, parácrinas, autócrinas e justácrinas, ainda existindo processos não compreendidos completamente (GARGUS e WOODRUFF, 2021). O desenvolvimento folicular começa ainda na vida fetal da fêmea, onde as células germinativas primordiais migram para a crista gonadal. Lá, passam por diversas divisões mitóticas, formando as ovogônias, que se tornarão ovócitos primários ao iniciarem a primeira divisão meiótica e estacionarem na Prófase I (BAERWALD et al., 2012), até que aconteça o pico de LH (*luteinizing hormone*) na puberdade e a meiose prossiga. Os ovócitos primários são então circundados por uma camada de células da pré-granulosa, formando os primeiros folículos, denominados folículos primordiais. Essa população de folículos primordiais forma a chamada reserva ovariana e representa cerca de 90% do total de folículos presentes no ovário (SAUMANDE, 1991).

É importante ressaltar a diferença entre dois processos que acontecem nos ovários: a ovogênese, que compreende o desenvolvimento do ovócito, e a foliculogênese, que é o desenvolvimento do folículo. Na ovogênese, ainda durante a vida fetal da fêmea todos os ovócitos são formados. Os ovócitos entram em meiose e permanecem em prófase I até momentos antes da ovulação. Após a puberdade, a cada ciclo, o ovócito do folículo que se tornar dominante e for exposto ao pico de LH retomará a meiose, progredindo de Prófase I até a Metáfase II (GARGUS e WOODRUFF, 2021). Aqui ocorre uma divisão desigual, onde a maior parte do citoplasma vai para o ovócito secundário, uma célula gigante, enquanto a outra célula é diminuta e inviável, formando o que chamamos de corpúsculo polar. O processo é

novamente interrompido, e a ovogênese só é completamente finalizada se houver fecundação, pois é o espermatozoide que estimula toda a maquinaria celular necessária para o ovócito chegar até o fim da meiose II (HAFEZ e HAFEZ, 2004; HU et al., 2023). Até o processo de ovulação, o que está notoriamente se desenvolvendo são as estruturas foliculares. Apesar do núcleo do ovócito não apresentar atividade, o seu citoplasma acumula nutrientes e suas organelas se multiplicam ao longo da foliculogênese, além de existirem moléculas secretadas exclusivamente pelo ovócito que são essenciais para o crescimento folicular (UYAR et al., 2013; MORTON et al., 2023), e já foi observado que defeitos nessa comunicação afetam consideravelmente a qualidade do ovócito (SHEN et al., 2023).

A foliculogênese inicia com a formação dos folículos primordiais quando os gametas são circundados por células somáticas. Cada folículo primordial conta com duas estruturas básicas: o ovócito primário envolto por poucas células da pré-granulosa, que nessa fase, são achatadas (TSUI et al., 2024) (Fig. 1). Conforme os folículos primordiais são ativados na foliculogênese, essas células da granulosa se tornam cubóides e marcam a diferença do folículo primordial para o folículo primário (RIMON-DAHARI et al., 2016). O folículo secundário, por sua vez, já apresenta modificações marcantes, como o crescimento evidente do citoplasma do ovócito, formação de mais camadas de células da granulosa, desenvolvimento de uma camada adicional de células externamente à membrana basal que circunda o folículo, denominadas células da teca, e o desenvolvimento inicial da zona pelúcida (ARAÚJO et al., 2014; MORTON et al., 2023). Conforme a zona pelúcida começa a se formar, as células da granulosa começam a se comunicar efetivamente com o ovócito por meio de projeções citoplasmáticas que atravessam a zona pelúcida, apresentando junções do tipo *gap* que permitem a troca de nutrientes (BIZARRO-SILVA et al., 2021). Até essa etapa da foliculogênese, o desenvolvimento desses folículos pré-antrais, que tem entre 0,02 e 0,2 mm de diâmetro no caso da mulher, ocorre independente de gonadotrofinas (BAERWALD, et al., 2012; TELFER e ZELINSKI, 2013; RIMON-DAHARI et al., 2016).



**Figura 1.** Esquema representativo do processo de foliculogênese.

Quando começa a formação do antro, uma cavidade dentro do folículo preenchido com líquido, os folículos passam a ser denominado antrais e já possuem uma zona pelúcida bem desenvolvida. Com o acúmulo cada vez maior deste líquido, as células da granulosa são divididas em duas populações sob a influência do FSH: as células do *cumulus*, e as células da granulosa murais. As células do *cumulus* se comunicam com o ovócito, secretando moléculas sinalizadoras e permitem trocas metabólicas (UYAR et al., 2013; GARGUS e WOODRUFF, 2021). Já as células da granulosa murais permanecem próximas à lâmina basal e vão produzir hormônios esteróides essenciais para a ovulação (RIMON-DAHARI et al., 2016). A partir dessa etapa, as gonadotrofinas se tornam importantes. O FSH vai ser essencial para a sobrevivência das células da granulosa, para que possam produzir estradiol o suficiente para desencadear o pico de LH para a ovulação. Isso também faz com que as células murais expressem mais receptores para LH e sinalizem para a diferenciação das células da teca. Elas, por sua vez, se diferenciam em duas populações: teca interna e

externa, onde a teca interna se torna vascularizada para prover nutrientes ao folículo, que permanece avascular (GARGUS e WOODRUFF, 2021; SHEN et al., 2023). Vale ressaltar que esse processo ocorre após a migração do folículo para um ambiente menos rígido fornecido pela medula, que permite o acúmulo desse líquido no antro, rico em água, íons e hormônios (BIZARRO-SILVA et al., 2021; VITALE e DOLMANS, 2024).

Antes pensava-se que os folículos eram continuamente recrutados ao longo do ciclo e que o folículo dominante se tornava o folículo pré-ovulatório ao acaso (ADAMS et al., 2012; BAERWALD et al., 2012), entretanto diversos estudos demonstraram a ocorrência do padrão de ondas foliculares ao longo do ciclo estral/menstrual (BAERWALD et al., 2012). Uma onda folicular tem sido definida como o crescimento sincronizado de um grupo de folículos estimulados por um pico de FSH. Inicialmente, um grupo de folículos antrais iniciais (cujo diâmetro varia entre 2 a 5 mm em humanos) é recrutado, onde apenas um folículo em cada onda é selecionado para ser o dominante, enquanto os outros (subordinados) entram em atresia (BAERWALD et al., 2012). Usando o modelo bovino, sabe-se que a diminuição do FSH circulante se deve ao feedback negativo feito pelos folículos emergentes, que produzem o hormônio inibina (ADAMS et al., 2012). A seleção do folículo dominante se dá pela sua maior quantidade de receptores de FSH, oferecendo-lhe uma vantagem em relação aos outros folículos recrutados (ADAMS et al., 2012). O recrutamento folicular pode ocorrer mesmo na fase lútea, podendo gerar outro folículo dominante ainda na fase lútea ou no início da fase folicular (MIHM et al., 2011), e por isso, o padrão de duas ou três ondas foliculares ao longo de um ciclo tem sido observado em diversas espécies, incluindo vacas e mulheres (BAERWALD et al., 2012). Entretanto, os folículos dominantes produzidos durante a fase lútea são anovulatórios, uma vez que a progesterona produzida pelo corpo lúteo inibe a secreção do LH, impedindo a sua ovulação efetiva (MALHI et al., 2005).

O processo final do desenvolvimento folicular que culminará na ovulação de um ovócito é um evento em cadeia: o pico de FSH leva ao crescimento de pequenos folículos antrais, que passam a produzir mais estrógenos. Essa maior produção de estrógenos engatilha a liberação de GnRH pelo hipotálamo, que por fim, libera um pico de LH necessário para que o ovócito seja liberado (RIMON-DAHARI et al., 2016). O LH sinaliza para o 1) ovócito continuar a meiose, 2) aumento no fluxo sanguíneo

próximo ao folículo dominante e 3) recrutamento de células macrófagos, o que caracteriza o processo ovulatório como um tipo de processo inflamatório, envolvendo citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$  e IFN-  $\gamma$  (MOLEY e SCHREIBER, 1995). Cerca de 12h após o pico de LH, o processo de remodelação da MEC começa, onde a região apical do folículo se torna mais frouxa devida a degradação de seus componentes por proteases. Quando o ovócito completa a meiose I e expulsa o primeiro corpúsculo polar, ocorre também a perda da comunicação entre o ovócito e as células da granulosa. Assim, no momento em que o folículo finalmente se rompe, o que é efetivamente liberado é o complexo cumulus-ovócito (MOLEY e SCHREIBER, 1995; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Esse ovócito, que vai envolto com as células do cumulus e a zona pelúcida, é captado pelas tubas uterinas, e caso ocorra a fecundação, a meiose II é completada e ocorre a expulsão de um secundo corpúsculo polar (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Já as células da teca e da granulosa que permanecem no tecido ovariano passam pelo processo de luteinização, também graças ao pico de LH. Devido à alta produção de progesterona, forma-se o corpo lúteo, uma estrutura temporária essencial para o estabelecimento e a manutenção de uma gestação (RIMON-DAHARI et al., 2016). Posteriormente, ele se torna um tecido cicatricial denominado corpo albicans, que é futuramente absorvido pelo corpo (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Ainda existem trabalhos que apontam o papel da MEC na disponibilidade de hormônios no tecido ovariano, atuando tanto no sequestro dessas moléculas, como na expressão de fatores importantes para a ovulação, como estrógenos e fatores de crescimento (HENNING et al., 2021).

Os modelos animais atualmente mais utilizados para compreender a fisiologia reprodutiva da mulher são os bovinos e os murinos. Apesar da grande distância filogenética, a fisiologia reprodutiva da vaca e da mulher são bem semelhantes, sendo ambas monovulares e policíclicas, além de contarem com padrões de ondas foliculares ao longo dos ciclos estrais/menstruais. Até mesmo as patologias reprodutivas bovinas são semelhantes com as observadas em mulheres, como encistamento de folículos, trazendo uma grande vantagem deste modelo animal (MALHI et al., 2005; ADAMS et al., 2012; CHITI et al., 2022).

Apesar das espécies domésticas e outros animais de grande porte apresentarem ciclo estral, e as espécies de primatas e pequenos mamíferos apresentarem ciclo

menstrual, os processos fisiológicos no trato reprodutivo ao longo dos ciclos, bem como a duração, são similares (ADAMS et al., 2012). Ambos podem ser divididos em fase folicular, que é o crescimento do folículo após a regressão do último corpo lúteo, e fase lútea, que vai desde a ovulação até a regressão do corpo lúteo. A diferença entre os dois ciclos é que o ciclo menstrual é dividido em fase folicular e fase lútea, enquanto o ciclo estral ainda pode ser dividido em proestro, estro, metaestro e diestro, onde as duas primeiras etapas compreendem a fase folicular, enquanto as outras duas ocorrem na fase lútea (MALHI et al., 2005). A diferença entre esses dois ciclos também se dá pelo evento que define o seu início, que no caso do ciclo menstrual é a menstruação, e no ciclo estral é o estro. O ciclo menstrual é temporalmente simétrico, com as fases folicular e lútea perdurando cerca de 14 dias cada, totalizando 28 dias o tempo de um ciclo médio completo, enquanto o ciclo estral em vacas dura cerca de 21 dias, com a fase folicular menor do que a fase lútea, e o estro (fase do ciclo que a fêmea está receptiva para a cópula) é curto (ADAMS et al., 2012). É importante ressaltar que a menstruação contendo perda de sangue é observada somente em poucas espécies de primatas e outros pequenos mamíferos, e também que a duração exata das fases folicular e lútea podem ser afetadas por fatores regionais, étnicos e socioeconômicos (MIHM et al., 2011).

#### **2.4 Ovário Artificial Transplantável (OAT)**

O desenvolvimento de um OAT busca recuperar as funções endócrinas e reprodutivas de mulheres inférteis ou que tiveram sua fertilidade afetada por tratamentos gonadotóxicos como a quimioterapia. Um OAT consiste em compor uma estrutura contendo uma matriz, folículos ovarianos pré-antrais e células estromais, podendo ser provenientes de diferentes origens para recompor um tecido ovariano. A necessidade de sua criação decorre do grande risco do transplante de tecido ovariano reintroduzir células malignas que possam ter sido preservadas no tecido ovariano criopreservado antes do início do tratamento. Graças a lâmina basal presente ao redor do folículo e sua característica avascular, essas estruturas ficam protegidas de células cancerígenas que possam chegar ao ovário através dos vasos sanguíneos e linfáticos (CHEN et al., 2022). Portanto, a realocação dessas estruturas intactas combinadas com células estromais ovarianas ou células-tronco em uma matriz (artificial ou natural), de modo que possibilite o desenvolvimento folicular pleno e seu posterior

transplante sem nenhuma ou pouquíssimas reações adversas é o principal objetivo de um OAT (MIRZAEIAN et al., 2023; WU et al., 2023). Para isso, os componentes foliculares devem ser isolados do tecido nativo (CHEN et al., 2022).

Quanto aos folículos, devido ao seu arranjo complexo e suas interações com o tecido, existem diversas técnicas para o seu isolamento. A metodologia deve ser empregada com base no estágio folicular desejado e de qual espécie será feito o procedimento, onde os métodos mecânico e enzimático, ou ainda a combinação destes, são os mais utilizados (SIMON et al., 2020). Já foi observado que métodos mecânicos (*tissue chopper* e microdissecção com agulhas de insulina) são eficientes e não causam efeitos na estrutura tridimensional dos folículos pré-antrais, pois não danificam sua membrana basal, o que é importante durante o cultivo *in vitro*, já que a membrana pode impedir que as células da granulosa se desagreguem (LUCCHI et al., 2002). Entretanto, para folículos mais desenvolvidos, a microdissecção é mais recomendada uma vez que preserva a camada de células da teca, importante para a produção hormonal adequada (ARAÚJO et al., 2014; HU et al., 2023). Por sua vez, os métodos enzimáticos contam com o uso de collagenases e DNases, mas análises já demonstraram que essas enzimas podem danificar os ovócitos, além de afetar as membranas celulares dos folículos pré-antrais (ARAÚJO et al., 2014) se os cuidados adequados não forem estritamente observados.

Alguns autores já demonstraram que os folículos pré-antrais, em especial os folículos primordiais e primários, não têm a habilidade de crescerem *in vitro* isoladamente, necessitando da sinalização de outras células (GARGUS e WOODRUFF, 2021). Estudos já demonstraram que o cultivo de folículos pré-antrais isolados com uma camada de células estromais foi capaz de melhorar a sobrevivência e crescimento *in vitro* de folículos murinos (GRUBLIAUSKAITĖ et al., 2024). Outro trabalho demonstrou que o cultivo de folículos pré-antrais com células da teca e macrófagos promoveu um maior crescimento folicular em comparação com os folículos cultivados isoladamente (SHEN et al., 2023). Em se tratando do isolamento das células ovarianas, existem diversas abordagens também envolvendo métodos enzimáticos e/ou mecânicos; as células do estroma são geralmente isoladas com *tissue choppers* seguida de um tratamento enzimático (SIMON et al., 2020).

A arquitetura do ovário é fundamental para a foliculogênese, permitindo que as interações entre as células que compõe o folículo, independentemente de seu estágio

de desenvolvimento, sejam efetivas. A foliculogênese se torna um fenômeno complexo não apenas pela sua integração com o tecido ovariano, mas também pelas suas ações em cadeia de sinalizações intra e extracelulares, que molda as fases desse evento tanto com os componentes da MEC, como com a sua própria estrutura tridimensional. Acredita-se que os sistemas de cultivo tridimensionais são mais precisos em simular os processos fisiológicos que acontecem *in vivo*, que ocorrem exclusivamente em três dimensões (ARAÚJO et al., 2014). Outro estudo complementa que o cultivo *in vitro* bidimensional afeta negativamente a morfologia folicular pela disposição das células da granulosa na superfície da placa e consequente perda da comunicação dessas células com o ovócito (VITALE e DOLMANS, 2024), levando a sua degeneração. Atualmente, a limitação para os sistemas de cultivo *in vitro* tridimensional é sua habilidade de permitir o crescimento folicular por longos períodos (KIM et al., 2020; GARGUS e WOODRUFF, 2021).

Diversas estratégias foram avaliadas como sistema tridimensional para o desenvolvimento de folículos ovarianos. O uso isolado ou combinado de diferentes materiais, biológicos ou sintéticos, já foram considerados. O material sintético mais pesquisado na construção de ovários artificiais é o PEG, um polímero linear que vem do petróleo. Seu uso para o encapsulamento de folículos pré-antrais foi demonstrado, permitindo a vascularização da região transplantada e crescimento folicular, entretanto a ausência de fatores essenciais para a proliferação celular faz com que seja necessária a adição dessas moléculas no material, como aminoácidos (DOLMANS e AMORIM, 2019). Outros pesquisadores trabalharam com gelatina de metacrilamida, onde foi observado que o material não promoveu a adesão celular necessária para o desenvolvimento folicular (WU et al., 2023). O uso de uma membrana de politetrafluoretileno também já foi avaliado, mas apesar de permitir a difusão de nutrientes entre a estrutura e o tecido nativo, é um material impermeável a células, dificultando a sua colonização (FISCH e ABIR, 2018). Uma vantagem dos materiais sintéticos em relação aos materiais naturais é a capacidade de produção em larga escala e sua durabilidade, entretanto, sua absorção no organismo ao longo do tempo pode levar a liberação de compostos tóxicos, gerando inflamação local (AMORIM e SHIKANOV, 2016). Apesar de existirem outros potenciais materiais sintéticos para o desenvolvimento de um OAT, o PEG foi o único desses materiais a ser transplantado até o momento (CANOSA et al., 2023).

Já os materiais naturais incluem polímeros de fibrina, alginato ou fibrina-alginato, além de colágeno e coágulos de plasma. O colágeno foi a primeira matriz de origem natural a ser utilizada para o encapsulamento de folículos de camundongos isolados, mas apesar da sua alta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, foi observado o processo de atresia dos folículos, permitindo apenas o crescimento de folículo primordial até o estágio de folículo secundário, sem haver a formação de antro (AMORIM e SHIKANOV, 2016; FISCH e ABIR, 2018; DOLMANS e AMORIM, 2019).

O alginato é o polímero natural mais utilizado em trabalhos, tanto para cultura tridimensional *in vitro*, quanto para o transplante *in vivo* (NIKIAZ et al., 2021), e sua compatibilidade provou-se com folículos de diferentes espécies (KIM et al., 2020). Derivado da parede celular de algas marinhas e algumas bactérias, a capacidade gelificante do alginato, combinada com sua biocompatibilidade, permite que este material seja utilizado como uma forma de encapsular folículos e formar um OAT (AMORIM e SHIKANOV, 2016). Entretanto, sua capacidade de vascularização e degradabilidade *in vivo* se mostrou muito lenta (CHITI et al., 2022), além do seu uso isolado não oferecer os componentes nativos do tecido e sua estrutura tridimensional, dificultando o surgimento da conformação natural do folículo (KIM et al., 2020). Outros trabalhos demonstraram que, apesar da sua capacidade de expansão e compatibilidade com o tecido *in vivo*, o alginato acaba se tornando uma certa barreira para o crescimento folicular a partir do estágio de folículo secundário, não permitindo a formação do antro em cultivos com maiores concentrações de alginato (SIMON et al., 2020). No geral, os estudos com alginato demonstra sua incapacidade de aderência celular e adsorção de proteína devido a sua propriedade hidrofílica (GARGUS e WOODRUFF, 2021).

Existe ainda a combinação do alginato com polímero de fibrina, também de origem natural, feito de fibrinogênio e trombina. Essa combinação resultou na preservação da estrutura folicular e também das junções comunicantes entre as células da granulosa e o ovócito (FISCH e ABIR, 2018). Uma vantagem desse polímero, que geralmente conta com maiores quantidades de fibrinogênio, é a sua capacidade angiogênica, e o uso isolado desse polímero também se mostrou viável para o crescimento folicular, ocorrendo a formação de antro e ovulação, levando a formação de corpo lúteo em ratas após três semanas do transplante (FISCH e ABIR, 2018; DOLMANS e AMORIM, 2019). Entretanto esse material apresenta uma rápida

degradabilidade por enzimas produzidas pelas células foliculares, além de trazer o risco de contaminação por patógenos (ALMEIDA et al., 2023; TSUI et al., 2024). Sendo assim, o uso de uma dMEC derivada de tecido ovariano aparece como uma alternativa vantajosa para a preservação e restauração da fertilidade dessas mulheres. A conservação da composição e estrutura tridimensional do tecido nativo possibilita a recolonização por células e o desenvolvimento folicular.

## **2.5. Matriz Extracelular Descelularizada (dMEC)**

Uma vez que a estrutura tridimensional do ovário é vital para o crescimento folicular adequado, um OAT deve ser desenvolvido com uma plasticidade semelhante à MEC ovariana nativa. Ele deve permitir a expansão ao longo do ciclo, ao mesmo tempo que deve conter uma rigidez ideal para modular e acompanhar a foliculogênese. Esse aspecto é consideravelmente importante em se tratando de ovários humanos, já que o processo de ovulação leva a formação de um folículo pré-ovulatório de cerca de 20 mm, que inicialmente contava com menos de 500  $\mu\text{m}$  (DADASHZADEH et al., 2021). Para tal, o uso de uma dMEC se mostra um recurso inovador e de relativo fácil acesso e preparo para a produção de um OAT.

A principal vantagem de uma dMEC é a preservação de sua composição e arquitetura, que modulam o crescimento de células nativas e possibilita a recolonização por novas células, além de sua biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. O processo de descclularização é dito bem sucedido quando 1) o tecido apresenta <50 ng de dsDNA, 2) a amostra apresentar <200 pares de bases de fragmentos de DNA, e 3) não for possível identificar núcleos celulares na microscopia de luz, seja por DAPI ou H&E (CRAPO et al., 2011). Os métodos para se obter um tecido descclularizado podem ser classificados em 1) químicos, que utilizam reagentes ácidos, básicos, detergentes, solventes etc., que vão atuar na desnaturação proteica e lise das membranas celulares; 2) biológicos, incluindo enzimas e agentes quelantes que também atuam na remoção dos componentes celulares; 3) físicos, que buscam degradar o material celular com variações de temperatura, agitação mecânica, liofilização etc. (ISAEVA et al., 2022). Dentre os métodos químicos, as substâncias mais investigadas no contexto da descclularização de tecido ovariano são os detergentes SDS, Triton X-100, desoxicolato e lauril éter sulfato de sódio (SLES)

(LARONDA et al, 2015; LIU et al., 2017; ALSHAIK et al., 2019; EIVAZKHANI et al., 2019; PORS et al., 2019; PENNAROSSA et al, 2021; NIKNIAZ et al., 2021). As nucleases (DNases e RNases) são as enzimas mais empregadas como método biológico para a descelularização, mas geralmente são utilizadas ao final de protocolos que combinam mais de um reagente no processo (LIU et al., 2017; HASSANPOUR et al., 2018; ALSHAIK et al., 2019; EIVAZKHANI et al., 2019; PORS et al., 2019; ALSHAIK et al., 2020; MIRZAEIAN et al., 2020; WU et al., 2022; FRANCÉS-HERRERO et al, 2023; SANGUANSOOK et al., 2024; YIN et al., 2025). Por fim, são escassos os trabalhos que utilizam métodos físicos para a descelularização, sendo os mais recentes o emprego do nitrogênio líquido em ovário suíno (LONG et al, 2024) e dióxido de carbono supercrítico em tecido ovariano humano (HOSSEINPOUR et al., 2025). No geral, os métodos físicos são aplicados antes de métodos químicos para a descelularização completa. A associação de métodos físicos, químicos e biológicos são também bastante comuns.

Trabalhos que desenvolveram dMEC a partir de tecido ovariano humano demonstraram a sua capacidade de recelularização, tanto por células estromais, quanto por folículos humanos e murinos (PORS et al., 2019). Também foi demonstrada a recelularização de uma dMEC humana com células ovarianas de ratas em ágar, o que permitiu a preservação de genes importantes para a função ovariana (SISTANI et al., 2024). Mas, apesar dos resultados promissores, diversas questões bioéticas ainda oferecem limitações para o uso desses materiais, como a sua disponibilidade e método de obtenção (ALMEIDA et al., 2023), por isso, a opção mais viável para o desenvolvimento de uma dMEC é o uso de ovários de outras espécies com características semelhantes ao humano. Os biomateriais mais investigados até o momento são ovários bovinos, suínos e murinos.

Existem diversos estudos que não somente exploraram diferentes reagentes para a descelularização do tecido ovariano, mas também formas de co-cultivo e recelularização distintas. O processo de recelularização ainda não é algo padronizado, e a maioria dos estudos não buscam avaliar de forma aprofundada como decorreu a distribuição e infiltração celular no interior da dMEC (THEVENOT et al., 2008). Dois trabalhos realizaram a descelularização de ovários inteiros de roedores e demonstraram a recelularização eficiente do tecido após injeção de células da medula óssea e cultivo por 14 dias (ALSHAIKH et al., 2019; 2020). Um outro grupo observou

o crescimento de folículos pré-antrais de camundongos na dMEC homóloga com uma taxa de maturação dos ovócitos significativamente maior em relação ao crescimento dos mesmos folículos em um sistema de cultivo bidimensional em óleo mineral (ALAE et al., 2021). Também foi realizada a descclularização de um ovário suíno completo, e sua recelularização com células ovarianas suínas também foi bem-sucedida, com as células sendo atraídas para a dMEC nas primeiras 24h e sua repopulação ocorrendo ao longo dos 7 dias de incubação (PENNAROSSA et al., 2021). Por fim, outro estudo mais recente realizou o xenotransplante de uma dMEC derivada de tecido humano, que foi previamente recelularizada com células ovarianas de camundongos, e demonstrou não apenas a biocompatibilidade do procedimento, mas sua capacidade em fornecer um ambiente propício a diferenciação celular, onde as células expressaram proteínas fundamentais como AMH (hormônio anti-Mulleriano), ZP3 (*Zona Pellucida sperm-binding protein 3*) e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (MIRZAEIAN et al., 2023).

Recentemente, nosso grupo elaborou um protocolo próprio para descclularização, baseado na combinação do detergente iônico SDS e a base inorgânica NaOH na menor concentração possível e pelo menor tempo de incubação. As avaliações indicaram sua ação eficiente em remover as células e seu DNA enquanto preserva moléculas importantes tanto estrutural, quanto fisiologicamente na MEC (LÉON-FÉLIX et al., 2024; 2025). Enquanto o SDS age na solubilização das membranas celulares, levando à sua lise, o hidróxido de sódio atua na quebra da dupla fita de DNA pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as bases de DNA (EIVAZKHANI et al., 2019). Assim, conforme outros trabalhos na área, o objetivo deste trabalho é validar essa dMEC derivada de ovário bovino como uma possível estrutura para desenvolver um OAT, a partir da avaliação de sua repopulação com células.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de recelularização da matriz extracelular descelularizada (dMEC) obtida a partir de tecido ovariano bovino desenvolvido por LÉON-FÉLIX et al. (2024).

#### 3.2 Objetivos específicos

- I. Recelularizar a dMEC com células de linhagem fibroblástica humana (L-132)
- II. Avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento das células inseridas na dMEC após 7 e 14 dias de co-cultivo *in vitro*
- III. Caracterizar a dMEC após o cultivo com as células L-132

## IV. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção da matriz extracelular descelularizada

Ovários bovinos (N=2) obtidos em abatedouro local foram utilizados para obtenção da dMEC. O protocolo adotado para descelularização foi estabelecido pelo próprio grupo do laboratório (LEÓN-FÉLIX et al., 2024). Brevemente, os ovários bovinos tiveram a cápsula e a região medular removidas. Logo, os córtex ovarianos remanescentes foram cortados manualmente, com o tamanho aproximado de 10 mm x 5 mm x 1 mm. Após o corte, as amostras foram alocadas em tubos cônicos contendo 10 ml da solução com 0,1% de SDS (p/v) e 0,02 M de NaOH.

As amostras ficaram 12 horas sob agitação constante (100 rpm), em temperatura ambiente. Após o tratamento, cada amostra foi lavada com 50 ml de água destilada por 6 horas, trocando a água a cada 30 minutos. Por fim, as amostras foram armazenadas a -20 °C, até o uso para o cultivo *in vitro*.

### 4.2 Cultivo celular

Células fibrobásticas humanas, da linhagem L-132 (BCRJ 0139), foram cultivadas em estufa climatizada a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em ar em garrafas para cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (modelo K11-1250, Kasvi) contendo meio DMEM suplementado com 1% antibiótico e 10% de soro fetal bovino por cerca de 10 dias, até atingirem uma confluência de 90%. Após estabelecimento da cultura, as garrafas foram tripsinizadas (solução estéril tripsina-EDTA 0,25%) para desaderência das células. As células foram então avaliadas quanto à viabilidade com Azul de Trypan (concentração de 1:1 com células em suspensão) e contadas em câmara de Neubauer.

Todas as dMECs utilizadas para o co-cultivo foram previamente esterilizadas em solução salina contendo 1% de antibiótico-antimicótico por 30 minutos, em temperatura ambiente. O co-cultivo das amostras de dMEC com as células (1 x10<sup>6</sup> células) foi feito em tubos com fundo redondo, contendo 5 ml de meio DMEM/F-12, suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico-antimicótico, em banho-maria à 37°C sob agitação de 20 rpm. A cada 2 dias, 50% do meio de cultura foi substituído por meio novo. As matrizes foram retiradas do cultivo após 7 e 14 dias para avaliação da possível recelularização.

### 4.3 Análises microscópicas

As características avaliadas em cada análise serão comparadas entre os 3 grupos: 1) dMEC cultivadas com células L-132, 2) dMEC não cultivadas e 3) tecido ovariano bovino nativo.

Após o co-cultivo, as amostras foram avaliadas por microscopia de luz (N=4), microscopia eletrônica de transmissão (MET, N=3) e microscopia eletrônica de varredura (MEV, N=3). Para os controles, dois ovários frescos (N=2) e uma dMEC (N=1) foram analisados por Hematoxilina e Eosina (H&E) enquanto duas dMECs (N=2) foram avaliadas por MEV e MET.

Para microscopia de luz as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4%, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol, embebidas em parafina, cortadas na espessura de 5 µm e coradas com H&E para avaliação ao microscópio de luz (campo claro). Na microscopia óptica, a relação célula-dMEC foi avaliada, bem como a disposição e organização das células na matriz.

Para a MET, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) em ferricianeto de potássio (0,8%), contrastadas *in bloc* com acetato de uranila (0,5%). Em seguida, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina Spurr. Cortes semifinos (2 µm) foram corados com azul de toluidina para mapeamento da região a ser avaliada. Cortes ultrafinos (90 nm) foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, Tóquio, Japão). Foi avaliado a estrutura e organização da matriz, a disposição e afinidade das células com a matriz, a integridade e características ultraestruturais das células e da matriz.

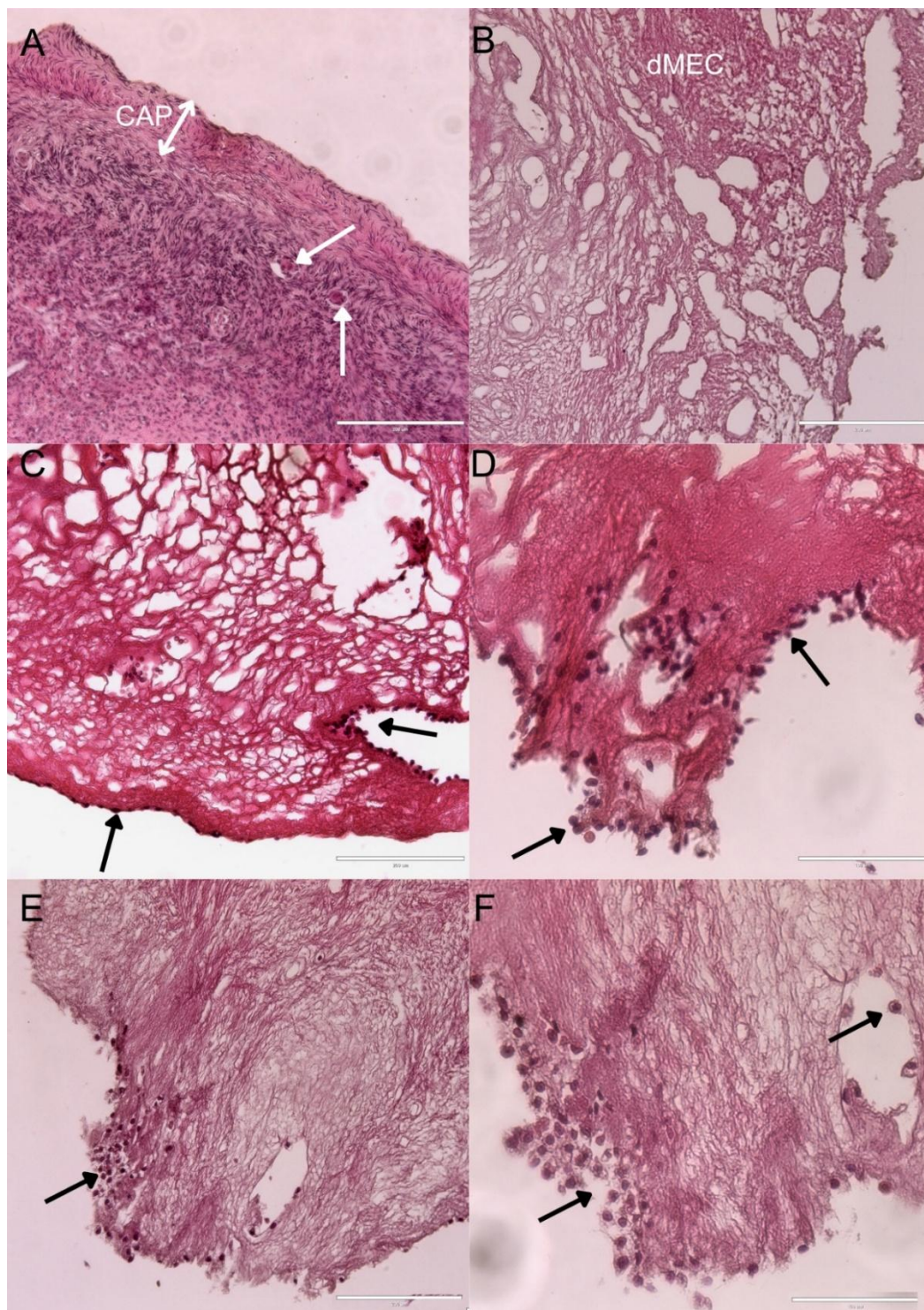
Por fim, para a MEV, as amostras também foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) e desidratadas em concentrações crescentes de acetona. As amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Balzers, modelo CPD 030), e após a montagem nos *stubs*, foi feita a metalização com ouro (Leica EM SCD500) para análise em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-7001F (Jeol, Tóquio, Japão). Foi avaliado a superfície e sua

colonização pelas células, bem como a interação célula-dMEC e a organização tridimensional da matriz ao longo do cultivo.

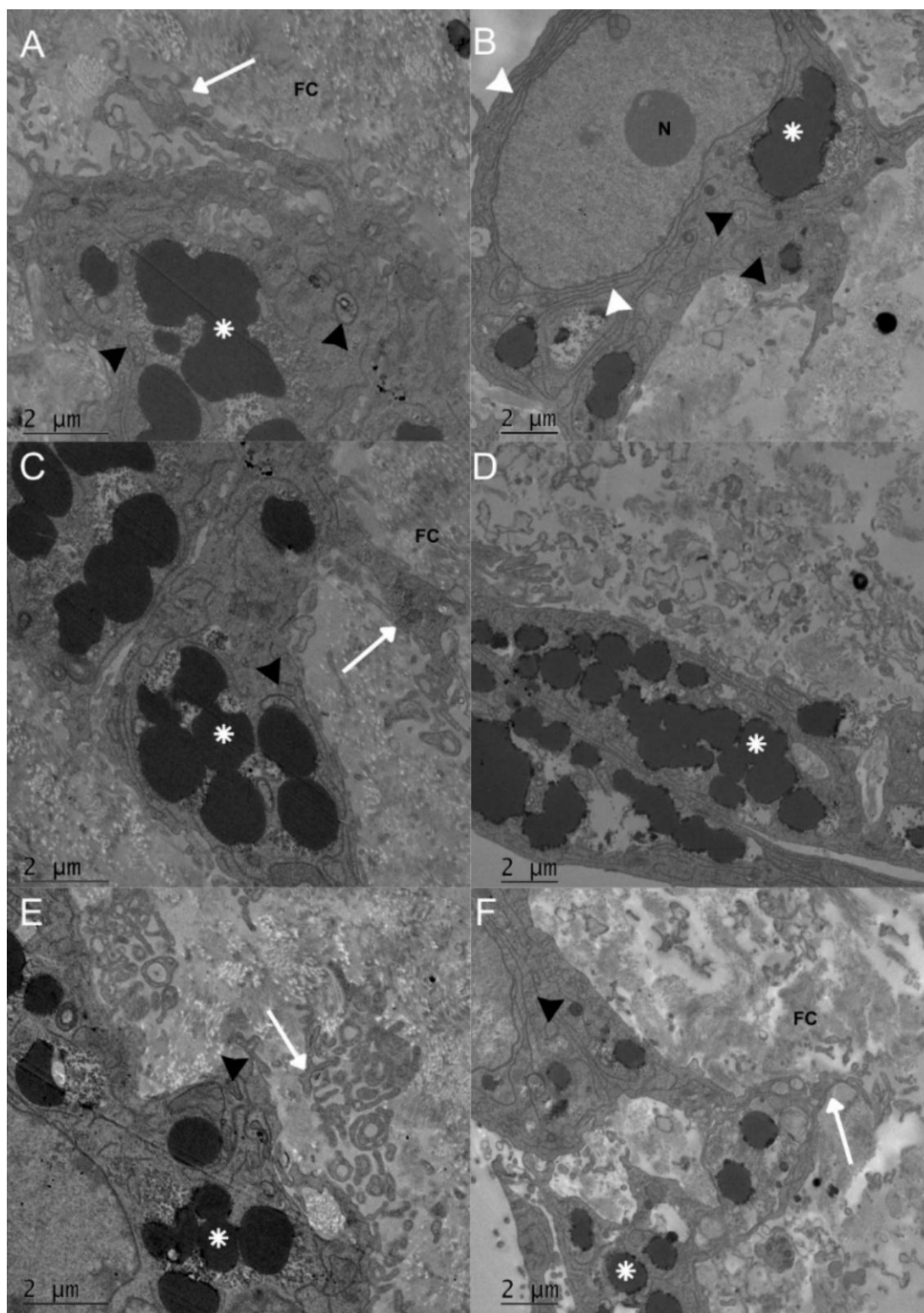
## V. RESULTADOS

O cultivo *in vitro* em tubos de ensaio sob agitação se mostrou eficiente em viabilizar a aderência das células à dMEC presente no sistema. Na microscopia de luz, quando comparada ao tecido ovariano nativo (Fig. 2A), a dMEC (Fig. 2B) mostra-se completamente descelularizada, apresentando apenas a estrutura das fibras do tecido conjuntivo. Aos 7 dias de cultivo (Fig. 2C e 2D) já é possível visualizar células colonizando a periferia da dMEC, podendo até formar camadas. A microscopia de luz apontou núcleos bem definidos e células de formato arredondado. Já aos 14 dias de cultivo (Fig. 2E e 2F), a colonização se mostra ainda mais pronunciada nas extremidades da matriz, onde é possível visualizar infiltrações de células dentro da dMEC devido à sua porosidade nativa. No geral, as regiões mais densas da matriz não apresentaram uma grande aderência celular, enquanto regiões mais porosas favoreceram a adesão, o que corrobora com a hipótese de que a microarquitetura da MEC é um fator essencial para a infiltração e distribuição celular.

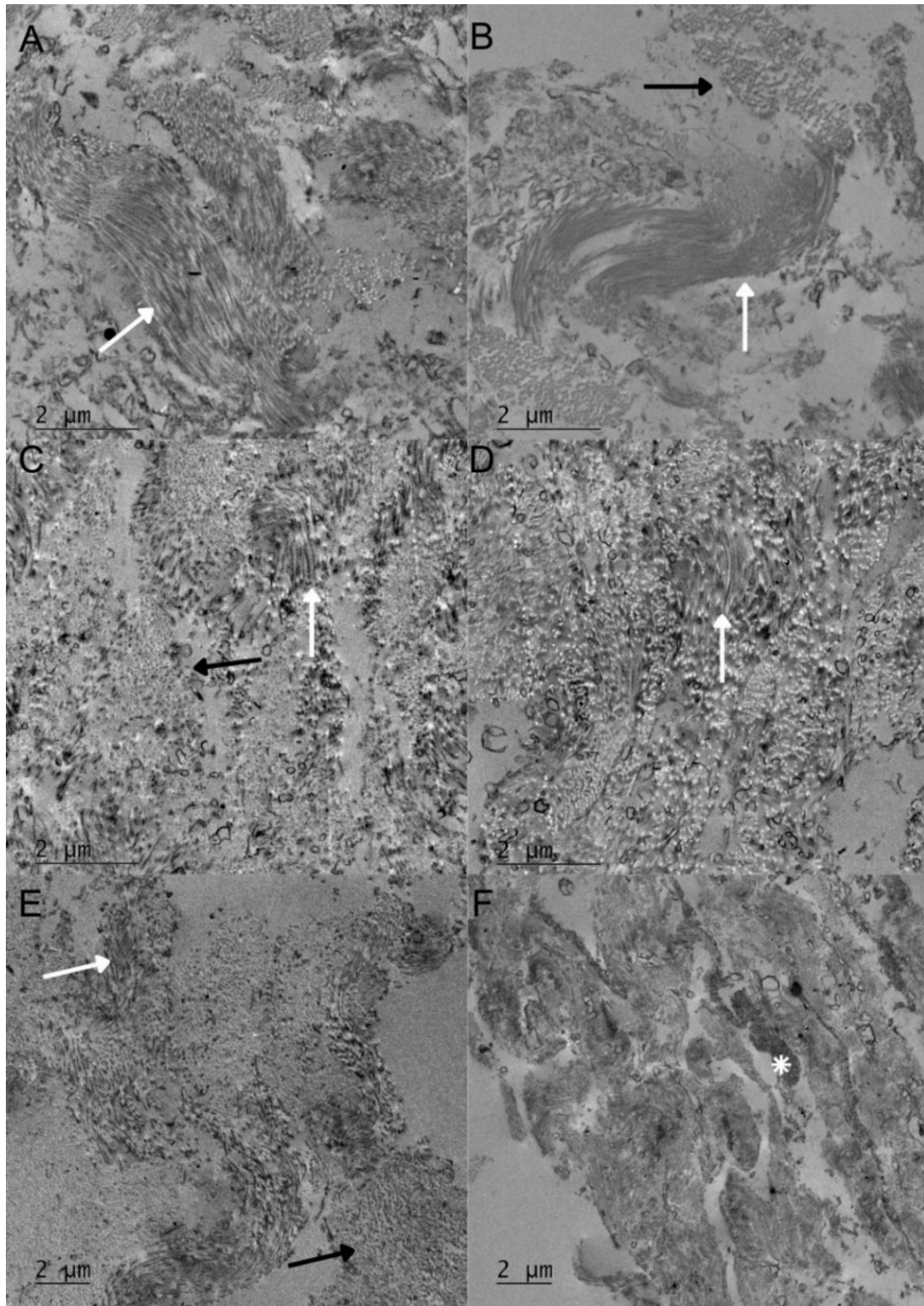
Já as análises de ultraestrutura demonstraram a interação efetiva entre as células e a matriz. Aos 7 (Fig. 3A, 3C, 3E) e 14 dias (Fig. 3B, 3D, 3F) de co-cultivo, a MET revelou células saudáveis ao longo do cultivo, com mitocôndrias preservadas, retículo endoplasmático liso e rugoso, membranas celular e nuclear e nucléolo íntegros, além da presença de várias gotas lipídicas, indicando seu metabolismo ativo na presença da dMEC ovariana. Analisando a ultraestrutura da dMEC nativa (Fig. 4A, 4B) em relação à dMEC co-cultivada, foi possível observar a mudança na disposição de fibras colágenas e outros componentes (Fig. 4C, 4D), com o tecido se tornando mais frouxo ao final do 14<sup>o</sup> dia (Fig. 4E, 4F). Isso sugere que a composição dessa matriz foi influenciada por fatores secretados pelas células, ou ainda, por fatores mecânicos derivados do crescimento celular, onde a matriz se readequou para promover um espaço celular adequado ao tipo celular.



**Figura 2.** Recelularização da matriz extracelular descelularizada (dMEC) após cultivo *in vitro*. **A:** Córtex do tecido ovariano bovino contendo a região da cápsula (CAP) bem preservada e folículos primordiais (setas brancas); **B:** dMEC derivada do tecido ovariano bovino, demonstrando a ausência completa de células e preservação do seu conteúdo extracelular (MEC); **C, D:** dMEC cultivada com células L-132 por 7 dias, indicando a aderência inicial celular à matriz; **E, F:** dMEC cultivada com células L-132 por 14 dias, evidenciando proliferação e infiltração celular progressiva. Coloração feita com H&E. Setas pretas: células L-132.

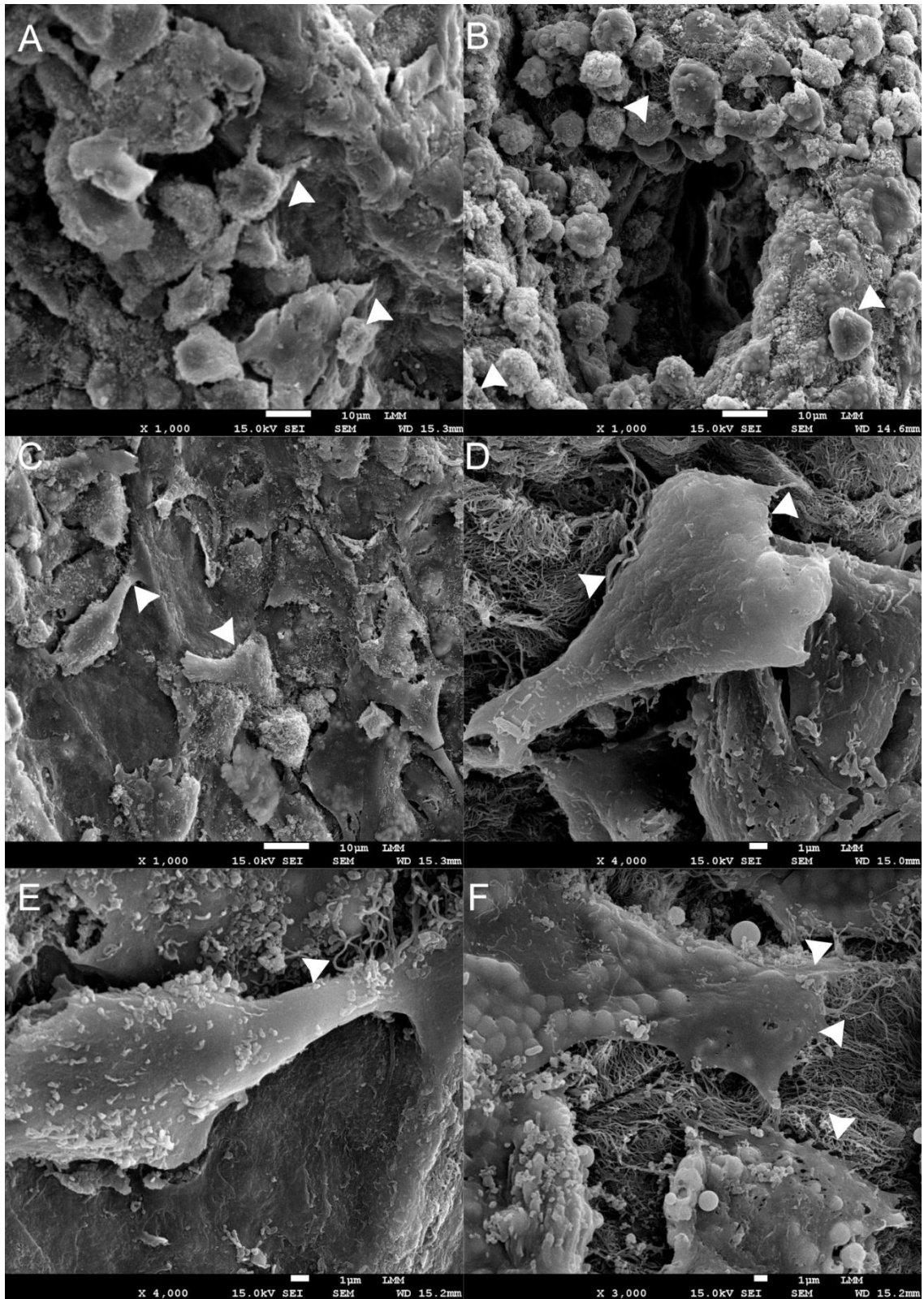


**Figura 3.** Micrografia eletrônica de transmissão de células L-132 após cultivo com dMEC derivada de tecido ovariano bovino. **A, C, E:** Ultraestrutura das células com 7 dias de cultivo, contendo organelas e membranas celular e nuclear bem definidas. **B, D, F:** Ultraestrutura das células com 14 dias de cultivo, demonstrando projeções celulares bem associadas à matriz. Asterisco branco: gotas lipídicas; cabeça de seta branca: retículo endoplasmático; seta branca: projeções celulares; cabeça de seta preta: mitocôndria; FC: fibras de colágeno; N: nucléolo.

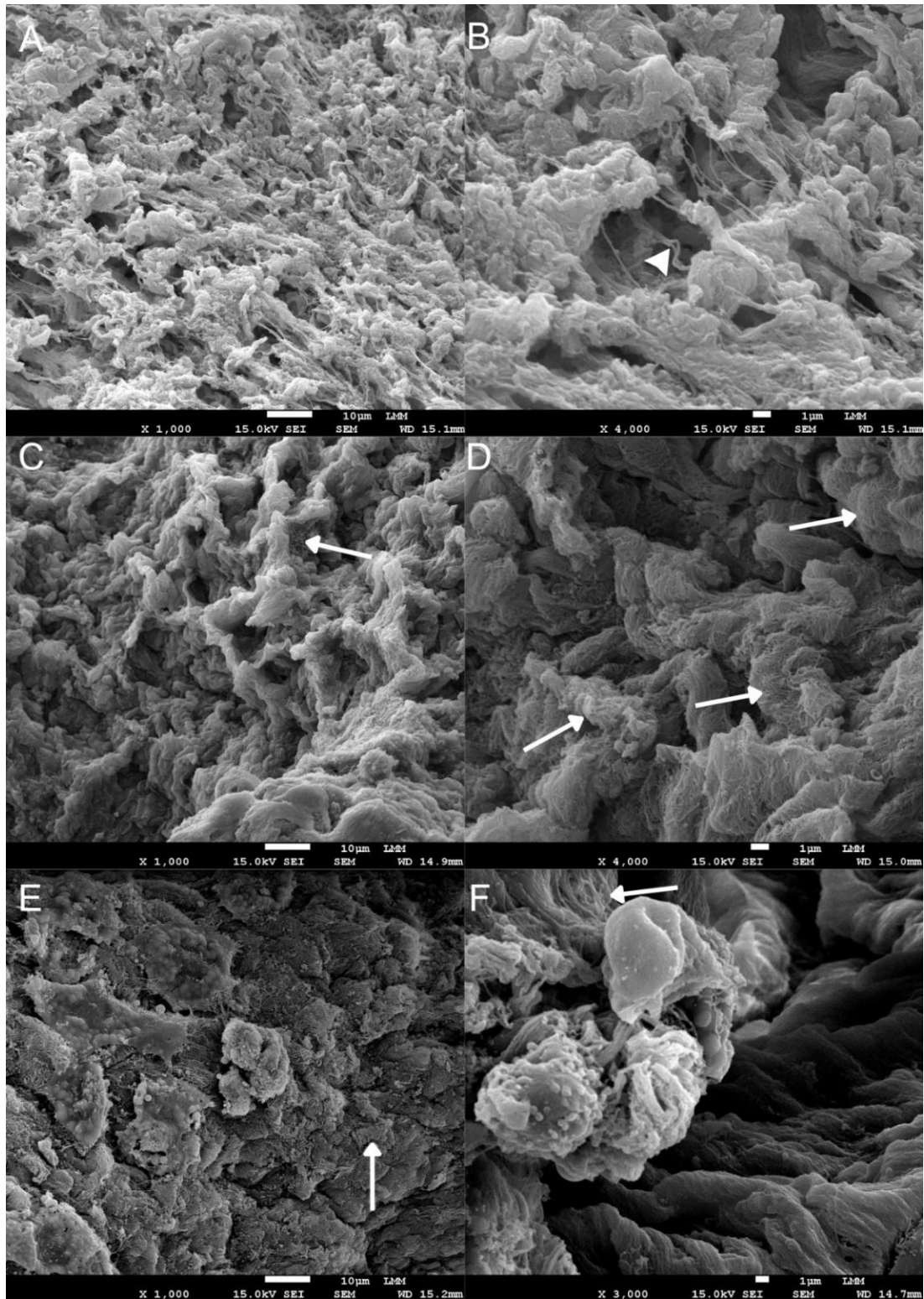


**Figura 4.** Ultraestrutura da matriz da dMEC derivada de tecido ovariano bovino ao longo do cultivo. **A, B:** dMEC controle não cultivada; **C, D:** dMEC após 7 dias de co-cultivo com células L132; **E, F:** dMEC após 14 dias de co-cultivo com células L-132. Setas pretas: fibras colágenas em corte transversal; setas brancas: fibras colágenas em corte longitudinal; asterisco branco: fibra elástica.

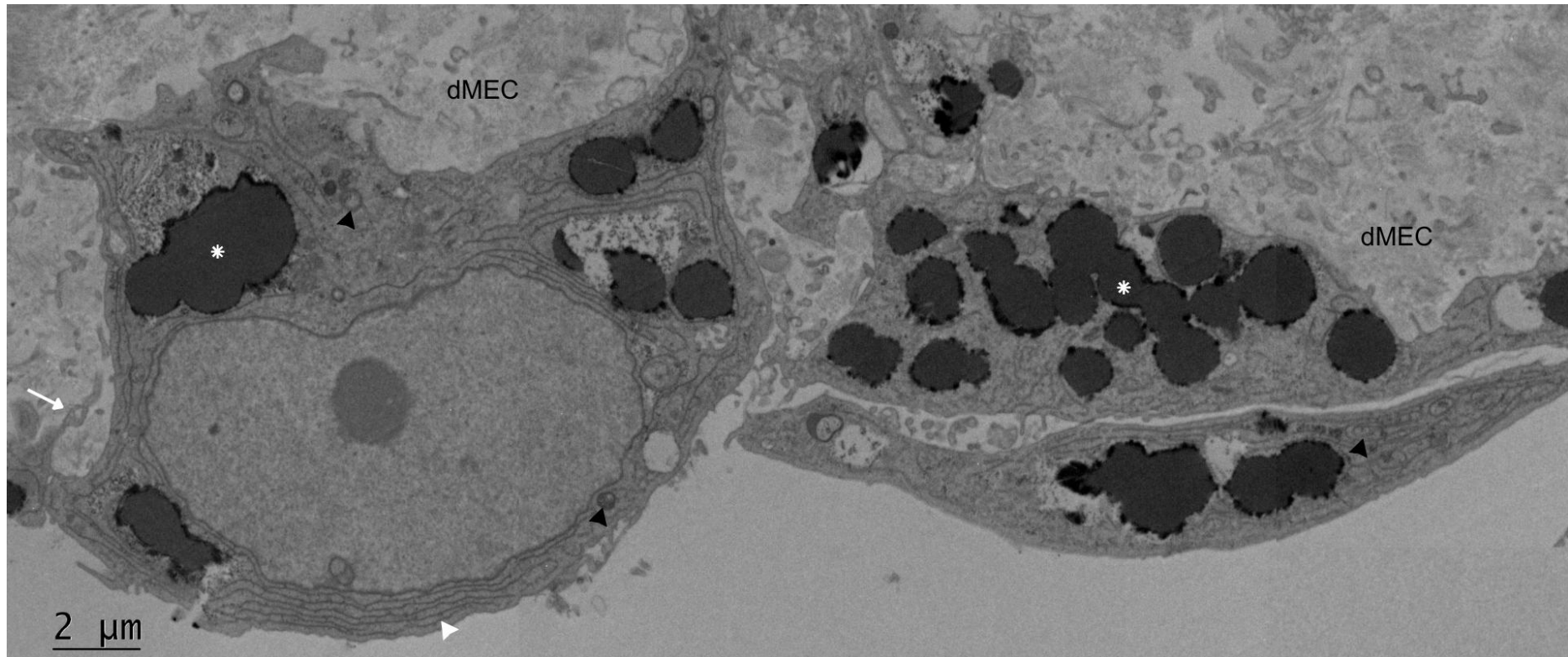
A MEV também revelou a interação célula-matriz nos primeiros 7 dias de cultivo (Fig. 5A, 5C, 5E), onde foi possível observar numerosas células aderidas à dMEC contendo prolongamentos celulares sugestivos da ancoragem ativa das células ao longo dos 14 dias (Fig. 5B, 5D, 5F), favorecendo o reconhecimento da matriz pelas células. Não somente na superfície, foi possível encontrar células em poros profundos e entrelaçadas em fibras, indicando a penetração celular ativa. As células demonstraram fenótipo adequado e compatível com as análises histológicas e imagens de MET, com formato semelhante a fibroblastos e projeções celulares. Quanto à microarquitetura da dMEC, a MEV também demonstrou a preservação (Fig. 6A, 6B) e remodelagem das fibras de colágeno e fibras elásticas ao longo dos 7 dias (Fig. 6C, 6D) e 14 dias (Fig. 6E, 6F), assim como observado na MET. Por fim, a Figura 7 traz uma montagem panorâmica da conexão de células com a dMEC ao longo dos 14 dias de cultivo.



**Figura 5.** Micrografia eletrônica de varredura da interação célula-dMEC. **A, C, E:** Células aderidas à dMEC aos 7 dias de cultivo, contendo numerosas projeções citoplasmáticas e apresentando contato direto das células com a dMEC. **B, D, F:** Células aderidas à dMEC aos 14 dias de cultivo, demonstrando adesão à matriz e colonização em regiões profundas. Cabeça de seta branca: interação célula-dMEC.



**Figura 6.** Micrografia eletrônica de varredura com ênfase na composição das fibras da dMEC ao longo do cultivo. **A, B:** dMEC controle; **C, D:** dMEC após 7 dias de co-cultivo com células L-132; **E, F:** dMEC após 14 dias de co-cultivo com células L-132. Setas brancas: fibras reticulares de colágeno; cabeça de seta branca: fibras elásticas



**Figura 7.** Montagem panorâmica demonstrando a interação célula-dMEC aos 14 dias de cultivo. Asterisco branco: gotas lipídicas; cabeça de seta branca: retículo endoplasmático; seta branca: projeções celulares; cabeça de seta preta: mitocôndria; dMEC: dMEC derivada de tecido ovariano bovino.

## VI. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho apontam que a recelularização de uma dMEC de origem ovariana é possível pelo método de agitação. Esses achados ampliam a compreensão sobre a colonização de biomateriais por células e demonstram sua biocompatibilidade, em especial com células humanas. Nos últimos anos, a engenharia de tecidos buscou o desenvolvimento de matrizes naturais derivadas de tecidos ou órgãos pelo método de descclularização, onde vários autores avaliaram diferentes combinações de reagentes, tempos de incubação e protocolos de esterilização, avaliando os impactos do processo na composição e estrutura da MEC remanescente. O detergente SDS é o método mais utilizado para o processo de descclularização, e foi o primeiro a conseguir descclularizar o ovário bovino completamente após 24h de incubação, além de preservar sua composição proteica e microarquitetura (LARONDA et al., 2015). A base NaOH também se mostrou eficiente na descclularização de tecido ovariano humano, com a preservação das estruturas porosas nativas do tecido (MIRZAEIAN et al., 2020). O protocolo aplicado nesse trabalho foi desenvolvido utilizando a combinação desses dois reagentes com o menor tempo de incubação possível (LÉON-FÉLIX et al., 2024), e no presente trabalho foi comprovado não somente a preservação morfológica da MEC ovariana, como sua biocompatibilidade, não oferecendo toxicidade celular ao longo do cultivo *in vitro* por 14 dias.

A recelularização é uma etapa que ainda não é padronizada, onde é necessário adaptar o processo de acordo com o tipo celular utilizado e as características do tecido acclular produzido. O método de inoculação estático (*static seeding*) é o mais avaliado, onde geralmente é feita uma ou várias injeções das células na matriz, entretanto, as células acabam se aglomerando e não conseguem se distribuir uniformemente ao longo das paredes densas da matriz, provavelmente pela baixa disponibilidade de nutrientes em locais mais profundos da dMEC, se tornando uma limitação e diminuindo significativamente a sua eficiência (FU et al., 2014; AHMED et al., 2021). Neste estudo, foram feitas tentativas preliminares com o método estático para recelularização dessa dMEC ovariana em combinação com outras substâncias, como ágar e gelatina, mas a adesão celular se mostrou mais lenta e bem mais limitada à periferia da matriz, com baixa ou nenhuma infiltração celular (resultados não mostrados). Assim, a técnica de agitação (*rotational seeding*) foi aplicada como uma

forma de biorreator capaz não somente de otimizar a distribuição de nutrientes e oxigênio no sistema de cultivo, mas também de potencializar a distribuição celular, evitando agregação (MARTIN et al., 2004; FU et al., 2014). Essas características são particularmente importantes em se tratando da recelularização do tecido ovariano, que naturalmente conta com um gradiente de rigidez na sua estrutura. Logo, o método de agitação contribui para uma maior viabilidade celular, especialmente durante os primeiros dias de cultivo. Mesmo sendo mais vantajoso que o método estático, existem desvantagens no método por agitação. A natureza do tecido acelular a ser recolonizado também pode oferecer uma barreira ao crescimento celular e à difusão de nutrientes, seja pela densidade e disposição de fibras de colágeno e de GAGs, além da microarquitetura porosa que pode ter sido preservada ou perdida no processo de descelularização. Pensando no tecido ovariano, onde as regiões mais densas da MEC estão próximas ao folículo e as estruturas porosas estão mais concentradas no estroma, esse método se mostra uma estratégia interessante para aperfeiçoar a aderência e sobrevivência celular, favorecendo até mesmo a aderência de células que não tenha uma afinidade inicial pela MEC ovariana (AHMED et al., 2021), como foi observado aqui com as células de linhagem L-132 e dMEC ovariana bovina. Não obstante, é um método simples, de baixo custo, e que se torna ideal para pequenas amostras descelularizadas, uma vez que a rotação permite que todo o tecido acelular seja embebido pela suspensão de células

No presente trabalho, foi observado pela microscopia de luz que, já nos primeiros 7 dias de cultivo, as células não somente se aderiram a periferia da dMEC, como também iniciaram o processo de colonização de parte do tecido, se infiltrando efetivamente e sendo capaz também de colonizar regiões internas mais porosas ao longo de 14 dias. Esse resultado corrobora mais uma vez a eficiência do *rotational seeding*, conforme já observado em outros estudos com células-tronco mesenquimais (MIRZAEIAN et al., 2020; AHMED et al., 2021). Esse método permite a interação efetiva ao longo de todo o cultivo entre as células e o tecido que será recolonizado, já que uma das grandes limitações do método estático é que, dependendo da porosidade nativa do tecido, as células podem acabar vazando da dMEC quando injetadas. Não somente isso, as células tendem a se aderir ao fundo da placa onde estão sendo cultivadas. Já no método por agitação, o que se observa é a homogeneização dos nutrientes e da quantidade de células ao redor da dMEC

(MIRZAEIAN et al., 2020). Esses achados mais uma vez corroboram que, aliado a uma suplementação adequada do meio, uma baixa velocidade de rotação é uma alternativa que aprimora o processo de recelularização da dMEC.

Em conjunto, as avaliações feitas neste trabalho revelaram que a dMEC favoreceu a manutenção da viabilidade e da morfologia celular das células L-132. As análises histológicas apontaram núcleos bem definidos e preservados, além de células com morfologia arredondada preservada (KASPER et al., 1999), sugerindo uma boa integração célula-dMEC, com a conservação de fatores de crescimento na dMEC importantes para o desenvolvimento celular. Apesar de serem mais utilizadas como modelos para avaliação de citotoxicidade, as células L-132 são uma linhagem celular de fibroblastos, conhecida por sua facilidade de propagação (KASPER et al., 2000), logo, se tornam uma estratégia interessante para avaliar o potencial de recelularização. Deste modo, independentemente dessas células não serem especificamente adaptadas ao microambiente ovariano, os resultados aqui obtidos demonstraram que a dMEC é biocompatível e não citotóxica para células, permitindo sua sobrevivência e proliferação, com a manutenção do fenótipo.

As análises de ultraestrutura também revelaram uma clara aderência das células à dMEC ao longo do cultivo *in vitro*. Pela MET, é possível observar células íntegras, com suas organelas bem preservadas e núcleo bem delimitado nos primeiros 7 dias de cultivo, indicando sua viabilidade metabólica, além de numerosas projeções celulares compatíveis com a morfologia nativa das células L-132 (KASPER et al., 2000) e também com o processo de adesão celular, o que sugere um processo de integração progressiva à matriz. As imagens também apontaram uma íntima conexão entre as células e a matriz, sendo possível observar a interação dos prolongamentos citoplasmáticos das células L-132 com componentes preservados da MEC ovariana nativa, como fibras de colágeno, fibras reticulares e fibras elásticas (USHIKI et al., 2002), o que reforça a biocompatibilidade do tecido ovariano descelularizado como um potencial material para a engenharia de tecidos.

As imagens de MET também apontaram um grande acúmulo de gotas lipídicas pelas células L-132, o que normalmente não é observado no seu fenótipo normal. Esse fenômeno pode ser explicado pela concentração de 15% de soro fetal bovino utilizado no meio de cultivo. Já está bem documentado na literatura que a presença

de gotas lipídicas é comum quando a célula se encontra diante de uma grande oferta de lipídios exógenos, e no caso do soro fetal bovino, ele atua também como um modulador metabólico, onde no contexto reprodutivo, essas reservas lipídicas podem influenciar o metabolismo das mitocôndrias em embriões bovino (ABE et al., 2002; DEL COLLADO et al., 2016). Embora essas gotas lipídicas possam afetar negativamente o crescimento de alguns tipos celulares, a presença delas nas células L-132 inserida na dMEC ovariana indica uma adaptação celular à oferta lipídica, com metabolismo ativo dessas moléculas no retículo endoplasmático. Isso vai de acordo com a ideia de que as gotas lipídicas não são apenas um agrupamento molecular passivo, mas sim, pode atuar de forma ativa em conjunto com as mitocôndrias e o retículo endoplasmático (SCHRADER et al., 2015).

A MEV também corrobora esses achados demonstrando que, inicialmente, as células se distribuíram na superfície da dMEC e, progressivamente, se acoplaram às fibras e aos poros da matriz, o que aponta a importância da organização estrutural da matriz como componente essencial para o reconhecimento celular (ISAEVA et al., 2022; LIU et al., 2022), ainda que a dMEC não dispusesse de sinais específicos de afinidade com esse tipo celular. Não somente o processo de infiltração celular foi evidenciado pelas microscopias eletrônicas e de luz, como também foi possível observar o remodelamento progressivo da dMEC ao longo do cultivo. Os resultados indicam que a interação célula-matriz foi capaz de reorganizar certos componentes da matriz em regiões vizinhas às células, o que demonstra a capacidade celular de modelar o microambiente em que está se desenvolvendo graças às forças mecânicas e sinalizações bioquímicas, ajustando a microarquitetura da matriz afim de favorecer seu processo de adesão e migração (MARTIN et al., 2004). Todas essas descobertas apontam que a dMEC aqui utilizada não foi apenas uma estrutura passiva à proliferação celular, mas sim, foi capaz de interagir de forma dinâmica com as células ao longo do tempo, reforçando o potencial desse biomaterial na medicina regenerativa. Assim, mesmo que não haja uma afinidade inicial entre esse tipo celular e a matriz nativa, a combinação do método por agitação e a preservação da microarquitetura da MEC ovariana possibilitou a proliferação das células L-132 e remodelagem da dMEC ao longo do cultivo.

Ainda com os resultados promissores, é importante que estudos adicionais sejam feitos para caracterizar efetivamente essa interação células-matriz. Células ovarianas

nativas, ou ainda células-tronco, podem ser usadas para avaliar efetivamente os componentes preservados na dMEC que interagem de maneira específica com as células ovarianas e, para além, com as estruturas foliculares. Ademais, cultivos mais longos, para avaliar a foliculogênese como um todo, devem ser feitos a fim de avaliar se o desenvolvimento folicular acontece de maneira semelhante ao que ocorre *in vivo*. A padronização do método de recelularização, assim como análises biomoleculares complementares a fim de avaliar a presença de possíveis marcadores inflamatórios também formam uma etapa importante antes de iniciar os estudos *in vivo*.

## VII. CONCLUSÃO

Em conclusão, no presente trabalho foi possível recolonizar amostras de dMEC provenientes de tecido ovariano bovino com células humanas de linhagem fibroblástica (L-132) pelo método rotacional. Apesar da recelularização ter ocorrido lentamente e não ter sido completa até os 14 dias, as células L-132 sobreviveram e proliferaram durante o cultivo, mostrando nítida interação com a matriz, inclusive com aparente remodelação da estrutura da matriz.

## VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o biomaterial derivado do tecido ovariano bovino foi avaliado como um potencial candidato no desenvolvimento de um OAT. Os resultados demonstraram uma colonização celular eficiente graças à natureza da dMEC ovariana, com sua microarquitetura e biomoléculas preservadas que permitiram o crescimento celular adequado. O método de *rotational seeding* foi uma estratégia que se mostrou eficiente em promover uma distribuição celular mais uniforme e favorecer o contato célula-dMEC, mesmo que as células aqui utilizadas não tivessem uma afinidade inicial com a matriz ovariana. Ainda assim, as análises morfológicas indicaram que as células foram capazes de se aderir e se proliferar adequadamente na matriz, demonstrando fenótipo preservado. A morfologia da matriz ovariana também se mostrou preservada, mas as análises ultraestruturais indicaram que a dMEC se modificou após a recelularização, sugerindo que as células podem ter secretado fatores e outras moléculas que atuaram na remodelagem da matriz ao longo do cultivo.

Todavia, o uso de uma célula não derivada do tecido ovariano pode ser uma limitação aos achados. Uma vez que o potencial de recelularização foi o principal aspecto a ser analisado neste trabalho, para o desenvolvimento de um OAT, a recelularização com células ovarianas é o cenário ideal. As análises morfológicas são de grande valor para atestar a recolonização da dMEC, mas outras análises, em especial biomoleculares, são etapas fundamentais para acompanhar a expressão de genes essenciais no contexto ovariano. Não obstante, é seguro dizer que um tecido acelular derivado do ovário bovino é uma alternativa viável para o desenvolvimento de um OAT. Esses resultados reforçam o potencial da dMEC como um biomaterial funcional, de fácil obtenção e produção, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias regenerativas na reprodução feminina.

## IX. REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57–66, 2002
- ADAMS, G. P. et al. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1733-1748, 2012.
- AHMED, E. et al. Recellularization of Native Tissue Derived Acellular Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, Basel, v. 10, n. 7, art. 1787, 2021.
- ALAEI, S. et al. The decellularized ovary as a potential scaffold for maturation of preantral ovarian follicles of prepubertal mice. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 67, n. 6, p. 413-427, 2021.
- ALMEIDA, G. H. D. R. et al. Current Trends on Bioengineering Approaches for Ovarian Microenvironment Reconstruction. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 29, n. 3, p. 260-298, 2023
- ALSHAIKH, A. B. et al. Decellularization of the mouse ovary: comparison of different scaffold generation protocols for future ovarian bioengineering. **Journal of ovarian research**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2019.
- ALSHAIKH, A. B. et al. Decellularization and recellularization of the ovary for bioengineering applications; studies in the mouse. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 18, p. 1-10, 2020.
- AMORIM, C. A.; SHIKANOV, A. The artificial ovary: current status and future perspectives. **Future oncology**, v. 12, n. 19, p. 2323-2332, 2016.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 12, p. 1-14, 2014.
- BAERWALD, A. R. et al. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human reproduction update**, v. 18, n. 1, p. 73-91, 2012.
- BERKHOLTZ, C. B. et al. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. **Histochemistry and cell biology**, v. 126, p. 583-592, 2006
- BIZARRO-SILVA et al. Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 45, n. 3, p. 131-147, 2021
- BÖTTCHER, B.; WINKLER-CREPAZ, K. Future perspectives of fertility preservation in women. **memo-Magazine of European Medical Oncology**, v. 13, n. 4, p. 416-420, 2020.

BUCKENMEYER, M. J. et al. A bioengineered in situ ovary (ISO) supports follicle engraftment and live-births post-chemotherapy. **Journal of Tissue Engineering**, v. 14, p. 20417314231197282, 2023

CAKMAK, H., ROSEN, M. P. Ovarian stimulation in cancer patients. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 6, p. 1476–1484, 2013.

CANOSA, S. et al. Innovative Strategies for Fertility Preservation in Female Cancer Survivors: New Hope from Artificial Ovary Construction and Stem Cell-Derived Neo-Folliculogenesis. **Healthcare**. MDPI, 2023. p. 2748

CHEMAITILLY, W. et al. Premature ovarian insufficiency in childhood cancer survivors: A report from the St. Jude Lifetime Cohort. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 7, p. 2242-2250, 2017.

CHEN, J. et al. Artificial ovary for young female breast cancer patients. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 837022, 2022.

CHITI 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.

COBO, A. et al. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. **Fertil Steril**, v. 105, n. 3, p. 755-764, 2016.

CRAPO, P. M. et al. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

DADASHZADEH, AREZOO et al. A review on biomaterials for ovarian tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 135, p. 48-63, 2021.

DEL COLLADO, M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction Fertility and Development**, v. 28, p. 1721–1732, 2016.

DOLMANS, M. M. et al. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. **Blood**, v. 116, n. 16, p. 2908–2914, 2010.

DOLMANS, M. M.; AMORIM, C. A. Fertility preservation: construction and use of artificial ovaries. **Reproduction**, v. 158, n. 5, p. F15-F25, 2019.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M. Fertility preservation in women. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 17, p. 1657-1665, 2017.

DUENSING, T. D., VAN PUTTEN, J. P. Vitronectin mediates internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by Chinese hamster ovary cells. **Infection and immunity**, v. 65, n. 3, p. 964–970, 1997

EIVAZKHANI, F. et al. Evaluating two ovarian decellularization methods in three species. **Materials Science and Engineering: C**, v. 102, p. 670-682, 2019.

FISCH, B.; ABIR, R. Female fertility preservation: past, present and future. **Reproduction**, v. 156, n. 1, p. F11-F27, 2018.

FRANCÉS-HERRERO, E. et al. Advances of xenogeneic ovarian extracellular matrix hydrogels for in vitro follicle development and oocyte maturation. **Biomaterials advances**, v. 151, p. 213480, 2023.

FU, R. H. et al. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. **Cell Transplantation**, v. 23, p. 621-630, 2014.

GANDOLFI, F. et al. Bioengineering the ovary to preserve and reestablish female fertility. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 45, 2019.

GARGUS, E. S.; WOODRUFF, T. K. Contributions of Ovarian Cells to Follicle Culture Stromal. **Fertility Preservation: Principles and Practice**, 2<sup>o</sup> ed, p. 341-354, 2021.

GRUBLIAUSKAITĖ, M. et al. Influence of ovarian stromal cells on human ovarian follicle growth in a 3D environment. **Human reproduction open**, v. 2024, n. 1, p. hoad052, 2024.

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004

HASSANPOUR, A. et al. Decellularized human ovarian scaffold based on a sodium lauryl ester sulfate (SLES)-treated protocol, as a natural three-dimensional scaffold for construction of bioengineered ovaries. **Stem cell research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.

HENNING, N. F. C. et al. Building Organs Using Tissue-Specific Microenvironments: Perspectives from a Bioprosthetic Ovary. **Trends in biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 824-837, 2021.

HOSSEINPOUR, F. et al. Preparation and characterization of human decellularized ovarian scaffold based on supercritical carbon dioxide protocol. **BioMedical Engineering Online**, v. 24, n. 1, art. 59, 2025

HU, B. et al. Prospects for fertility preservation: the ovarian organ function reconstruction techniques for oogenesis, growth and maturation in vitro. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1177443, 2023.

ISAEVA, E. V. et al. Decellularized extracellular matrix for tissue engineering (review). **Sovremennye tehnologii v medicine**, v. 14, n. 3, 2022

KASPER, M. et al. Experimental induction of AGEs in fetal L132 lung cells changes the level of intracellular cathepsin D. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 261, n. 1, p. 175-182, 1999.

KASPER, M. et al. Induction of Apoptosis by Glyoxal in Human Embryonic Lung Epithelial Cell Line L132. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 23, p. 485-491, 2000.

KHALEGHI, S. et al. Follicular reconstruction and neo-oogenesis in xenotransplantation of human ovarian isolated cells derived from chemotherapy-induced POF patients. **Journal of Biological Engineering**, v. 17, n. 1, p. 70, 2023.

KIM, E. J. et al. The new biocompatible material for mouse ovarian follicle development in three-dimensional in vitro culture systems. **Theriogenology**, v. 144, p. 33-40, 2020

KINNEAR, H. M. et al. A The ovarian stroma as a new frontier. **Reproduction**, v. 160, n. 3, p. R25-R39, 2020

KUJAWA, K. A. et al. Fibronectin and Periostin as Prognostic Markers in Ovarian Cancer. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 149, 2020

LARONDA, M. M. et al. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. **Biomaterials**, v. 50, p. 20-29, 2015.

LAVAFIAN, A. et al. Investigation of the female infertility risk associated with anti-cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, v. 25, p. 1893-1905, 2023.

LEÓN-FÉLIX, C. M. et al. Optimizing decellularization of bovine ovarian tissue: toward a Transplantable Artificial Ovary Scaffold with minimized residual toxicity and preserved extracellular Matrix morphology. **Cells Tissues Organs**, v. 213, n. 5, p. 413-423, 2024.

LEÓN-FÉLIX, C. M. et al. Decellularized extracellular matrix from bovine ovarian tissue maintains the protein composition of the native matrisome. **Journal of Proteomics**, v. 311, p. 105347, 2025.

LIU, W.Y. et al. Xenogeneic decellularized scaffold: a novel platform for ovary regeneration. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 23, n. 2, p. 61-71, 2017.

LIU, C. et al. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 16, n. 1, p. 56-82, 2022.

LONG, M. L. et al. Liquid nitrogen improves the decellularization of ovarian tissue. **CryoLetters**, v. 45, n. 3, p. 177-184, 2024.

LUCCI, C. M. et al. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1467-1483, 2002.

MAHAJAN N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. **Journal of human reproductive sciences**, v. 8, n. 1, p. 3-13, 2015.

MALHI, P. S. et al. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 1, p. 45-53, 2005

MALHOTRA, J. et al. Fertility after cancer. **International Journal of Gynaecology & Obstetrics**, v. 169, n. 3, p. 883-890, 2025.

MARTIN, I. et al. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 80-86, 2004.

MCARTHUR, M. E. et al. Identification and Immunolocalization of Decorin, Versican, Perlecan, Nidogen, and Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Bovine Small-Antral Ovarian Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 913–924, 2000.

MEHNERT, J. M. Fertility preservation for cancer patients: a review. **Journal of Reproductive Medicine**, v. 54, n. 9–10, p. 487–496, 2015.

MIHM, M. et al. The normal menstrual cycle in women. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 229-236, 2011.

MIRZAEIAN, L. et al. Optimizing the Cell Seeding Protocol to Human Decellularized Ovarian Scaffold: Application of Dynamic System for Bio-Engineering. **Cell Journal**, v. 22, n. 2, p. 227-235, 2020

MIRZAEIAN, L. et al. In-vivo oogenesis of oogonial and mesenchymal stem cells seeded in transplanted ovarian extracellular matrix. **Journal of Ovarian Research**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2023

MORTON, A. J. et al. Roles of follicle-stimulating hormone in preantral folliculogenesis of domestic animals: what can we learn from model species and where do we go from here?. **Animal**, v. 17, p. 100743, 2023

NIKniaz, H. et al. Comparing various protocols of human and bovine ovarian tissue decellularization to prepare extracellular matrix-alginate scaffold for better follicle development in vitro. **BMC biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2021.

OKTAY, K. et al. Fertility preservation in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 19, p. 1994-2001, 2018.

OUNI, E. et al. A draft map of the human ovarian proteome for tissue engineering and clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, p. S159-S173, 2019.

OUNI, E. et al. Proteome-wide and matrisome-specific atlas of the human ovary computes fertility biomarker candidates and open the way for precision oncofertility. **Matrix Biology**, v. 109, p. 91-120, 2022.

PALEY, P. J. et al. Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. **Gynecologic oncology**, v. 78, n. 3, p. 336–341, 2000.

PENNAROSSA, G. et al. Creation of a bioengineered ovary: isolation of female germline stem cells for the repopulation of a decellularized ovarian bioscaffold. **Next Generation Culture Platforms for Reliable In Vitro Models: Methods and Protocols**, p. 139-149, 2021.

PENNAROSSA, G. et al. Ovarian decellularized bioscaffolds provide an optimal microenvironment for cell growth and differentiation in vitro. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 2126, 2021.

PORS, S. E. et al. Initial steps in reconstruction of the human ovary: survival of pre-antral stage follicles in a decellularized human ovarian scaffold. **Human Reproduction**, v. 34, n. 8, p. 1523-1535, 2019.

RIMON-DAHARI, N. et al Ovarian folliculogenesis. **Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development**, p. 167-190, 2016.

RODGERS, R. J. et al. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 126, n. 4, p. 415–424, 2003.

SALGADO, R. M. et al. Modulation of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) expression in the mouse uterus by estradiol and progesterone. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 9, n. 22, 2011

SANGUANSOOK, P. et al. Development of decellularization protocols for female cat reproductive organs. **Research in veterinary science**, v. 173, p. 105257, 2024.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Rec. Med. Vet.**, v.167, p.205-218, 1991.

SCHMIDT, K. L. T. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. **Human Reproduction**, v. 18, n. 6, p. 1158–1164, 2003.

SCHRADER, M. et al. The different facets of organelle interplay – an overview of organelle interactions. **Front Cell Dev. Bio**, v. 3, art. 56, 2015.

SHAH, J. S. et al. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 35, p. 1135-1148, 2018

SHEN, L. et al. The stromal microenvironment and ovarian aging: mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of Ovarian Research**, v. 16, n. 1, p. 237, 2023.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021

SIMON, L.E. et al. In vitro ovarian follicle growth: a comprehensive analysis of key protocol variables. **Biology of Reproduction**, v. 103, n. 3, p. 455-470, 2020.

SISTANI, M. N. et al. Reconstruction of ovarian follicular-like structure by recellularization of a cell-free human ovarian scaffold with mouse fetal ovarian cells. **Cytotechnology**, v. 76, n. 1, p. 27–38, 2024

SUN, W.; FU, S. Role of cancer-associated fibroblasts in tumor structure, composition and the microenvironment in ovarian cancer. **Oncology Letters**, v. 18, n. 3, p. 2173-2178, 2019.

TAGLER, D. J. et al. Contributions of ovarian stromal cells to follicle culture. **Principles and Practice of Fertility Preservation**. Cambridge University Press, 2011, p. 409-420.

THEVENOT, P. et al. Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 14, n. 4, p. 319–331, 2008.

THUWANUT, P. et al. Human ovarian tissue xenotransplantation: advancements, challenges, and future perspectives. **Human reproduction**, v. 40, n. 3, p. 410-419, 2025

TSUI, E. L. et al. Restoring ovarian fertility and hormone function: Recent advancements, ongoing efforts and future applications. **Journal of the Endocrine Society**, v. 8, n. 6, p. bvae073, 2024.

USHIKI T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of histology and cytology**, v. 65, n. 2, p. 109–126, 2002.

UYAR, A. et al. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 4, p. 979-997, 2013.

VALSAMAKIS, G. et al. GnRH Analogues as a Co-Treatment to Therapy in Women of Reproductive Age with Cancer and Fertility Preservation. **Int. J. Mol. Sci**, v. 23, p. 2287, 2022.

VITALE, F.; DOLMANS, M. M. Comprehensive Review of In Vitro Human Follicle Development for Fertility Restoration: Recent Achievements, Current Challenges, and Future Optimization Strategies. **Journal of clinical medicine**, v. 13, n. 6, 1791, 2024

WANG, Z. et al. Fibrillin-1, induced by Aurora-A but inhibited by BRCA2, promotes ovarian cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 6670-83, 2015

WORLD CANCER RESEARCH FUND. **Worldwide cancer data**. Disponível em: <https://www.wcrf.org/preventing-cancer/cancer-statistics/worldwide-cancer-data/>. Acesso em: 30 dez. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services, 1 fev. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. Acesso em: 30 dez. 2025.

WU, T. et al. Construction of Artificial Ovaries with Decellularized Porcine Scaffold and Its Elicited Immune Response after Xenotransplantation in Mice. **J. Funct. Biomater**, v. 13, n. 4, p. 165, 2022.

WU, T., et al. Extracellular matrix-derived scaffolds in constructing artificial ovaries for ovarian failure: a systematic methodological review. **Human Reproduction Open**, v. 2023, n. 2, p. hoad014, 2023

YIN, L. et al. MACS and acellular autologous non-ovarian tissue scaffolds: a promising strategy for safe and efficient follicle transplantation in hematologic cancer. **J Ovarian Res**, v. 18, p. 126, 2025.