

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Análises comparativas entre vitrificação em recipiente metálico e congelamento lento para criopreservação de tecido ovariano humano: aspectos morfológicos e resposta ao choque térmico

Sérgio Galbinski

Porto Alegre, 2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Sérgio Galbinski

Análises comparativas entre vitrificação em recipiente metálico e congelamento lento para criopreservação de tecido ovariano humano: aspectos morfológicos e resposta ao choque térmico

Orientadora: Prof. Dra. Mirela Foresti Jimenez

Co-orientadora: Prof. Dra. Adriana Bös-Mikich

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Galbinski, Sérgio

Análises comparativas entre vitrificação em recipiente metálico e congelamento lento para criopreservação de tecido ovariano humano: aspectos morfológicos e resposta ao choque térmico / Sérgio Galbinski. -- 2020.

104 f.

Orientadora: Mirela Jimenez.

Coorientadora: Adriana Bös-Mikich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. criopreservação ovariana. 2. vitrificação. 3. congelamento lento. 4. proteínas de choque térmico. 5. histologia. I. Jimenez, Mirela, orient. II. Bös-Mikich, Adriana, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sérgio Galbinski

Análises comparativas entre vitrificação em recipiente metálico e congelamento lento para criopreservação de tecido ovariano humano: aspectos morfológicos e resposta ao choque térmico

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 15 de maio de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Helena Von Eye Cortela - Ppggo -
UFRGS

Prof^a Dra. Jaqueline Neves Lubianca - Ppggo -
UFRGS

Prof^a. Dra. Mila de Moura Behar Pontremoli
Saucedo - Ppggo – UFRGS

Prof^a. Dra. Patrícia El Beitune - Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde-
UFCSPA

É uma formação importante para a minha história, mas há muitas outras formas de alcançar o conhecimento para melhor servir à sociedade. Mais importante do que o quanto você sabe, é como você emprega o que sabe.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a minha esposa, Dra. Patrícia Ioschpe Gus, pelo amor e estímulo, e aos meus filhos Fabrício, Martina e Luciano, pelo carinho e paciência.

Dedico essa tese ao Professor David Wittingham, que iniciou tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Edison Capp, pelo acolhimento e estímulo desde o primeiro momento.

À minha orientadora, Professora Mirela Foresti Jiménez, fundamental para execução dessa tese.

À minha co-orientadora, Professora Adriana Bös-Mikich, fundamental para a concepção, viabilização de uma linha de pesquisa e em especial de minha dissertação de mestrado assim como dessa tese.

Ao Professor Maurício Krause, Lucas Stahlhofer Kowalewski, Gisele Bettu Grígolo e demais colegas do Laboratório de Fisiologia do ICBS/UFRGS, por sua colaboração na elaboração e execução desse projeto.

À acadêmica de biomedicina Larissa Ramos da Silva, pela sua dedicação na fase de execução e coleta de dados, assim como na fase de formatação do trabalho científico e da tese.

Ao Maikel Oliveira, do Laboratório de Histologia do ICBS/UFRGS, que preparou todas as lâminas e colorações.

À Andrea Nácul e colegas da Unidade de Reprodução Assistida do Hospital Fêmina.

Ao Dr. Nilo Frantz, Gerta Frantz, Norma Pagnocelli Oliveira e Marcos Iuri Kulmann da Clínica Nilo Frantz pelo apoio inestimável para a realização dos experimentos.

À equipe de enfermagem do Centro Cirúrgico do Hospital Fêmina.

Às pacientes que se disponibilizaram a participar desse estudo.

Ao Grupo Hospitalar Conceição e em especial ao Hospital Fêmina, instituições que me formaram como especialista e que me ensinaram a ser médico.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição que me acolheu para mestrado e doutorado, professores, colegas, servidores e amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS DO CORPO DA TESE.....	12
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO.....	12
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	20
REVISÃO DA LITERATURA.....	24
1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	24
2. Mapa conceitual	26
3. Anatomia e histologia do ovário humano.....	27
3.1. Anatomia do ovário.....	27
3.2. Histologia do ovário.....	27
3.2.1. Folículos ovarianos.....	28
3.2.1.1. Folículo primordial.....	29
3.2.1.2. Folículo em crescimento.....	29
3.2.1.2.1. Folículo primário.....	29
3.2.1.2.2. Folículo secundário.....	30
3.2.1.2.3. Folículo maduro ou de Graaf.....	30
4. Criopreservação de tecido ovariano.....	31
4.1. Princípios de criobiologia.....	35
4.2. Congelamento lento.....	37

4.3. Vitrificação.....	38
4.4. Vitrificação com cápsula metálica.....	40
5. Proteínas de choque térmico - HSP70.....	42
JUSTIFICATIVA.....	45
HIPÓTESES.....	47
OBJETIVOS.....	48
1. Principal.....	48
2. Secundários.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ARTIGO EM INGLÊS.....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
PERSPECTIVAS.....	102
ANEXOS.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

GHC - Grupo Hospitalar Conceição

HSP - *Heat Shock Proteins* / Proteína de Choque Térmico

HSP70 - proteína de choque térmico 70 kDa

eHSP70 - HSP70 extracelular

iHSP70 - HSP70 intracelular

HSR - *Heat Schock Response*

ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

SciELO - *Scientific Electronic Library Online*

PubMed - *U.S. National Library of Medicine, U.S. National Institutes of Health*

NL₂ - nitrogênio líquido

LH - Hormônio Luteinizante

CONSORT - *Consolidated Standarts of Reporting Trials*

ASRM - *American Society for Reproductive Medicine*

PROH - 1-2 propanodiol

CO₂ - dióxido de carbono

PBS - *phosphate buffered saline*

ES - solução de equilíbrio

EG - etileno-glicol

DMSO - dimetilssulfóxido

VS - solução de vitrificação

PVP - polivinil-pirrolidona

PEG - polietileno-glicol

HTF - *human tubal fluid*

RT - *room temperature*, temperatura ambiente

SDS-PAGE - gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio para eletroforese

SPSS 22 - *Statistical Package for Social Sciences*

GEE - *Bonferroni Correlation Model of Generalized Equation Model*

CNS - *Conselho Nacional de Saúde*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PPGO - Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia

CEP-GHC - Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Grupo Hospitalar Conceição

LISTA DE FIGURAS DO CORPO DA TESE

Figura 1: Revisão Sistemática da Literatura

Figura 2: Mapa Conceitual Esquemático

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: fresh primordial follicles

Figure 2: slow freezing primary follicle

Figure 3: vitrification follicles

Figure 4: graph of the comparison of the Delta between the groups

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1: Descriptive table of sample characteristics

Table 2: Comparative table of the number of follicles in ovarian tissue in the Fresh, Slow Freezing and Vitrification states.

Table 3: Descriptive table of follicle frequencies in the Fresh, Slow freezing and Vitrification states.

Table 4: Comparative table of HSP between states and temperatures

Table 5: Correlation table of HSP at 37 °C and 42 °C with histology

RESUMO

Introdução: A preservação da fertilidade feminina pré-tratamento oncológico visando possibilitar gestações futuras e a preservação da função ovariana é uma realidade. A criopreservação de embriões ou de oócitos é uma opção, mas posterga o tratamento oncológico por requerer estimulação ovariana e coleta de oócitos. Então, uma alternativa é a criopreservação de tecido ovariano por congelamento lento ou por vitrificação. A vitrificação apresenta como vantagens em relação ao congelamento lento a rapidez e não necessitar equipamento específico. Nosso grupo desenvolveu uma cápsula metálica para vitrificação que permite um resfriamento rápido do material biológico e elimina a possibilidade de contato do tecido nela armazenado com o nitrogênio líquido (NL₂) (Bos-Mikich et al., 2012; Aquino et al., 2014), uma potencial fonte de contaminação biológica. No entanto, independentemente da técnica de criopreservação utilizada, ela pode ser nociva aos tecidos e suas células, podendo afetar o seu funcionamento normal após o retorno à temperatura fisiológica. Uma das estratégias desenvolvidas pelas células, ao longo da evolução, para se protegerem dos efeitos deletérios de diversos tipos de estresse não letais (como estresse térmico, químico, metabólico, entre outros) é o aumento da expressão das proteínas de choque térmico, particularmente, as de 70 kDa (HSP70). As HSP70 são utilizadas como marcadores universais da resposta celular ao estresse e já foram avaliadas em tecido ovariano de mamíferos pós criopreservação. Nosso laboratório desenvolveu uma técnica que possibilita avaliar a resposta ao choque térmico em diferentes células e tecidos (HSR, capacidade de aumentar a expressão de HSP70 frente ao desafio térmico) (Krause et al., 2015a). Esta técnica foi empregada no presente trabalho, para testar como o tecido criopreservado responde a condições adversas após seu retorno a temperatura fisiológica. **Objetivo:** Comparar a efetividade

da criopreservação de tecido ovariano humano pela técnica de vitrificação em recipiente metálico com a técnica de congelamento lento avaliando aspectos morfológicos e a resposta fisiológica ao choque térmico em termos de expressão das HSP70.

Métodos: Laboratório de Fisiologia Celular e Laboratório de Embriologia e Histologia Comparadas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Estudo experimental prospectivo pareado controlado com doze pacientes submetidas a videolaparoscopia ginecológica no Hospital Fêmeina, no período de março a dezembro de 2018. Foi realizada biópsia superficial de tecido cortical ovariano e seccionada em vários fragmentos menores medindo 2mm x 3mm x 1-2mm. Os fragmentos de cada paciente foram alocados em 3 condições: i) tecido ovariano fresco (tecido imediatamente avaliado), ii) tecido ovariano submetido a congelamento lento e iii) tecido ovariano submetido a vitrificação. Após reaquecimento ou descongelamento, todos os grupos foram avaliados morfológicamente. A avaliação fisiológica pela resposta ao choque térmico (HSR), foi realizada através da quantificação do imunoconteúdo de HSP70 a 37°C e após elevação da temperatura para 42°C por 2h. A quantificação de HSP70 foi realizada após 8 horas do choque térmico, por *western blotting*. O tamanho da amostra foi calculado utilizando-se o programa WINPEPI, com poder de 80% e nível de significância de 5% e considerando a diferença esperada entre as proporções de 93% de folículos primordiais para vitrificação e 68% para congelamento lento. **Resultados:** O tecido ovariano fresco apresentou maior quantidade de folículos totais intactos quando comparado ao total de folículos nos grupos de tecido ovariano submetidos a congelamento lento e vitrificação ($p=0,007$). Quando comparadas as frequências de folículos intactos entre os grupos, houve diferença apenas para os folículos primordiais ($p<0,001$). A diferença foi encontrada entre o grupo fresco e os grupos de congelamento lento e vitrificação, que apresentaram

menor porcentagem de folículos primordiais intactos, embora com números absolutos maiores no grupo de vitrificação. A HSR, avaliada pela expressão de HSP70, foi mais elevada no tecido ovariano fresco ($p=0,001$) e negativa após criopreservação. Não houve diferença da mediana de HSP70 entre as temperaturas nos grupos de congelamento lento e vitrificação ($p=0,937$). **Conclusão:** A criopreservação de tecido ovariano, induzida por congelamento lento ou vitrificação, resulta, pelo menos nos tempos avaliados, na incapacidade das células/tecido ovariano de responder ao estresse térmico, embora tenha ocorrido uma melhor resposta fisiológica para o congelamento lento. A avaliação morfológica constatou que as duas técnicas apresentam comprometimento similar após a criopreservação, com vantagem para a vitrificação quando avaliada a quantidade de folículos primordiais intactos.

Palavras-chave: criopreservação ovariana, vitrificação, congelamento lento, proteínas de choque térmico, resposta ao choque térmico, histologia

ABSTRACT

Introduction: The preservation of female fertility prior to oncological treatment has been receiving more attention from health professionals aiming not only to guarantee the possibility of procreation but also to restore ovarian physiological functions. Current alternatives are the cryopreservation of embryos or oocytes, but they may delay the oncological treatment. The alternative may be cryopreservation of ovarian tissue by slow freezing or by vitrification, that is a more attractive possibility in relation to the slow freezing because it is faster and does not require specific equipment. Our group developed a metal capsule for vitrification which allows extremely rapid cooling of the biological material and eliminates the possibility of contact of the stored tissue with liquid nitrogen (LN₂) (Bos-Mikich et al., 2012; Aquino et al., 2014), a potential source of biological contamination. Regardless of the cryopreservation technique used, it imposes a potentially harmful challenge on tissues and their cells, which may affect their normal functioning after returning to physiological temperature, compromising their subsequent use. One of the strategies developed by cells, throughout evolution, to protect themselves from the harmful effects of several types of non-lethal stress (such as thermal, chemical, metabolic stress, among others) is the increase in the expression of heat shock proteins, particularly, those of 70 kDa (HSP70). Heat shock proteins (HSP) are used as universal markers of the physiological response to stress and have already been evaluated in mammalian ovarian tissue after cryopreservation. Our laboratory has developed a technique that makes it possible to evaluate the response to thermal shock in different cells and tissues (HSR, ability to increase the expression of HSP70 in the face of the thermal challenge) (Krause et al., 2015a). This technique was used in the present work, to test how the cryopreserved tissue responds to adverse conditions after its return to physiological temperature. **Objec-**

Objective: To compare the effectiveness of cryopreservation of human ovarian tissue using the metal capsule vitrification technique with the slow freezing technique, evaluating morphological aspects and the physiological response to thermal shock in terms of HSP70 expression.

Methods: Laboratory of Cellular Physiology and Laboratory of Embriology and Histology of the Institute of Basic Health Sciences (ICBS), UFRGS. Prospective controlled experimental study with twelve patients submitted to gynecological videolaparoscopy at the Femina Hospital, from March to December, 2018. A superficial biopsy of ovarian cortical tissue was performed and sectioned into several smaller fragments measuring 1mm x 3mm x 1mm. The fragments of each patient were allocated in 3 conditions: i) fresh ovarian tissue, ii) ovarian tissue submitted to slow freezing and iii) ovarian tissue submitted to vitrification. All groups were evaluated morphologically and histologically. The physiological evaluation by the response to thermal shock (HSR), was carried out by quantifying the HSP70 immunocontent at 37°C and after raising the temperature to 42°C for 2h. HSP70 was quantified after 8 hours, by western blotting. The sample size was calculated using the WINPEPI program, with a power of 80% and significance level of 5% and considering the expected difference between the proportions of primordial follicles for vitrification and 68% for slow freezing. **Results:** Fresh ovarian tissue showed a higher amount of good total follicles compared to total follicles in the ovarian tissue groups submitted to slow freezing and vitrification ($p=0.007$). When comparing the frequencies of intact follicles between groups, there was a difference only for primordial follicles ($p<0.001$). The difference was found between the fresh group and the slow freezing and vitrification groups, which had lower percentage of intact primordial follicles, with higher absolute numbers in the vitrification group. The HSR, assessed by the expression of HSP70, was

higher in fresh ovarian tissue ($p=0.001$) and negative after cryopreservation. When comparing the two techniques, a higher HSP70 content was found after slow freezing than after vitrification, which may indicate, despite the low number of follicles, a better cytoprotection in the group submitted to slow freezing. There was no difference in the median of HSP70 between temperatures in the slow freezing and vitrification groups ($p=0.937$). **Conclusion:** Ovarian tissue cryopreservation, induced by slow freezing or vitrification, results, at least in the evaluated times, in the inability of ovarian cells / tissue to respond to thermal stress, although with better cytoprotection for slow freezing. The morphological evaluation found that both techniques present similar impairment due to cryopreservation, with advantage for vitrification when the amount of intact primordial follicles was evaluated.

Key words: ovarian cryopreservation, vitrification, slow freezing, heat shock proteins, heat shock response, histology

INTRODUÇÃO

A incidência global de câncer segue em crescimento (GBDCC, 2018), assim como sua incidência na infância (Steliarova-Foucher et al., 2017). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência anual de 230 mil casos novos de câncer entre mulheres (INCA, 2016). Os tratamentos antineoplásicos estão proporcionando taxas cada vez maiores de sobrevivência na infância, na adolescência assim como na idade reprodutiva (Wallace et al., 2014). Infelizmente, uma em cada 10 pacientes apresenta infertilidade como consequência do tratamento oncológico por quimioterapia, especialmente por agentes alquilantes como a ciclofosfamida, assim como por radioterapia (Poorvu et al., 2019). Conseqüentemente, deve-se hoje levar em consideração o futuro reprodutivo e a restauração das funções hormonais destas pacientes antes de iniciar o tratamento antineoplásico. Atualmente, as opções mais utilizadas mundialmente para preservar a fertilidade de pacientes oncológicas são a criopreservação de embriões e/ou de oócitos (Oktay et al., 2018). Ambas opções apresentam dificuldades no momento de sua realização, a principal delas é a necessidade do uso de hormônios estimulantes do crescimento folicular para a captação de oócitos e, se for o caso, a geração de embriões para criopreservação. Este processo de indução hormonal pode retardar o início do tratamento antineoplásico e também pode piorar sua condição clínica, dependendo do tipo de malignidade que ela sofre (von Wolff et al., 2018).

A criopreservação de tecido ovariano vem recebendo cada vez mais atenção pelos profissionais das áreas de infertilidade e oncologia, visto que ela representa um enorme benefício para as mulheres jovens diante um tratamento oncológico por quimioterapia ou radioterapia, com risco de tornarem-se estéreis e de entrarem em menopausa precocemente (Demeestere et al., 2007; von Wolff et al., 2019). Esta

tecnologia, não apenas permite à paciente gerar seu filho biológico como também restabelecer suas funções fisiológicas ovarianas pós-retransplante (Donnez et al., 2004; Donnez et al., 2010).

A grande maioria dos relatos de criopreservação de tecido ovariano provém da técnica de congelamento lento (Donnez et al., 2013; Jensen et al., 2015), mas a vitrificação tem levantado o interesse dos pesquisadores e muitos relatos já podem ser obtidos na literatura (Sanfilippo et al., 2015; Fabbri et al., 2016; Sanada et al., 2019). Entretanto, não está estabelecido ainda, qual técnica de criopreservação, se o congelamento lento ou a vitrificação resulta em índices superiores, em termos de sobrevivência folicular e do estroma ovariano, assim como de nascidos vivos pós-retransplante.

O congelamento lento, por ser uma metodologia mais clássica, já possui vários relatos de sucesso pós-retransplante do tecido à paciente livre da condição oncológica (Donnez et al., 2004; Meirou et al., 2005; Andersen et al., 2008; von Wolff et al., 2009; Rosendahl et al., 2011). Para sua execução, entretanto, é necessário equipamento apropriado, em geral de custo bastante elevado. Além, disto, por sua natureza lenta, o congelamento pode induzir a formação de cristais de gelo no interior dos oócitos, das células foliculares e do estroma, o que levaria a sua morte ou disfunção, quando do retorno a condições fisiológicas, prejudicando o tecido como um todo (Klocke et al., 2015).

A vitrificação por outro lado, é uma alternativa atraente ao congelamento lento por sua rapidez na execução e por não necessitar equipamento específico para a criopreservação (Sanfilippo et al., 2015). Estudos recentes, comparando a técnica de congelamento lento com vitrificação de tecido ovariano mostraram resultados muito

aproximados em termos de preservação folicular e funcionalidade do tecido (Sheikhi et al., 2011; Klocke et al., 2015; Sanfilippo et al., 2015; Fabbri et al., 2016). Entretanto, os próprios autores admitem que o recipiente plástico utilizado na vitrificação e para o armazenamento em nitrogênio líquido (NL₂) pode ter sido responsável pelos resultados eventualmente inferiores com a técnica da vitrificação já que o plástico não é um bom condutor de calor (Sheikhi et al., 2011; Bos-Mikich et al., 2012; Aquino et al., 2014; Fabbri et al., 2016).

Nosso grupo desenvolveu uma cápsula metálica (BR 20 2013 019 739-0) destinada a criopreservação de tecido ovariano humano por vitrificação (Bos-Mikich et al., 2012; Aquino et al., 2014) que permite um resfriamento rápido do material biológico e elimina a possibilidade de contato do tecido nela armazenado com o nitrogênio líquido, uma possível fonte de patógenos. Esta metodologia demonstrou viabilidade morfológica e fisiológica pós desvitrificação em estudos com animais (Aquino et al., 2014; Massignam et al., 2018).

As HSP são consideradas parte de uma família de proteínas conhecidas como “proteínas de estresse” (Krause, et al., 2007). Sua expressão já foi avaliada em tecido ovariano submetido a criopreservação (Maffei et al., 2014), e são consideradas como adequadas para avaliação fisiológica do córtex ovariano pós vitrificação (Nikishin et al., 2018). Assim, é possível testar a resposta de uma célula ou tecido, ao estresse, pela avaliação da expressão de HSP. A comparação da quantidade de imunoconteúdo de HSP em condições de repouso comparado com o obtido após a indução de estresse, pode demonstrar a capacidade de resposta fisiológica das células a estímulos desafiadores, ou seja, de forma indireta, podem demonstrar o estado da função celular após o estresse.

O presente estudo visa comparar a efetividade da vitrificação utilizando cápsula metálica em face ao congelamento lento para a criopreservação de tecido ovariano humano em termos morfológicos, com análises histológicas e em termos fisiológicos, com avaliação da expressão de HSP a 37°C e após indução de estresse por calor a 42°C.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Estratégia usada para localizar e selecionar as informações

A revisão sistemática da literatura foi realizada a partir das bases de dados on-line LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (*Scientific Electronic Library Online*) e PubMed (*U.S. National Library of Medicine, U.S. National Institutes of Health*), e foram utilizadas as seguintes palavras-chave em inglês: “*vitrification, slow freezing, human ovary, heat shock response*”, sendo adicionados os filtros de seleção de língua de publicação (inglês e português).

A revisão foi ampliada por meio da busca a referências bibliográficas de revisões sistemáticas anteriores e de estudos relevantes, solicitação de estudos publicados ou não a especialistas e busca em outras fontes. O total de artigos resultantes da busca, conforme as palavras-chave utilizadas, para cada base de dados pode ser observado na figura 1.

Os estudos foram selecionados em um processo de duas etapas. Em primeiro lugar, os títulos e resumos de pesquisas eletrônicas foram analisados por um revisor e foram obtidos os artigos completos de todas as citações que eram susceptíveis de satisfazer os seguintes critérios de seleção: serem artigos de pesquisa originais, ensaios clínicos randomizados, revisões, revisões sistemáticas ou metanálises; e possuírem como desfechos primários a morfologia tecidual e resposta fisiológica. Posteriormente, a inclusão ou a exclusão dos artigos foi realizada após leitura dos artigos.

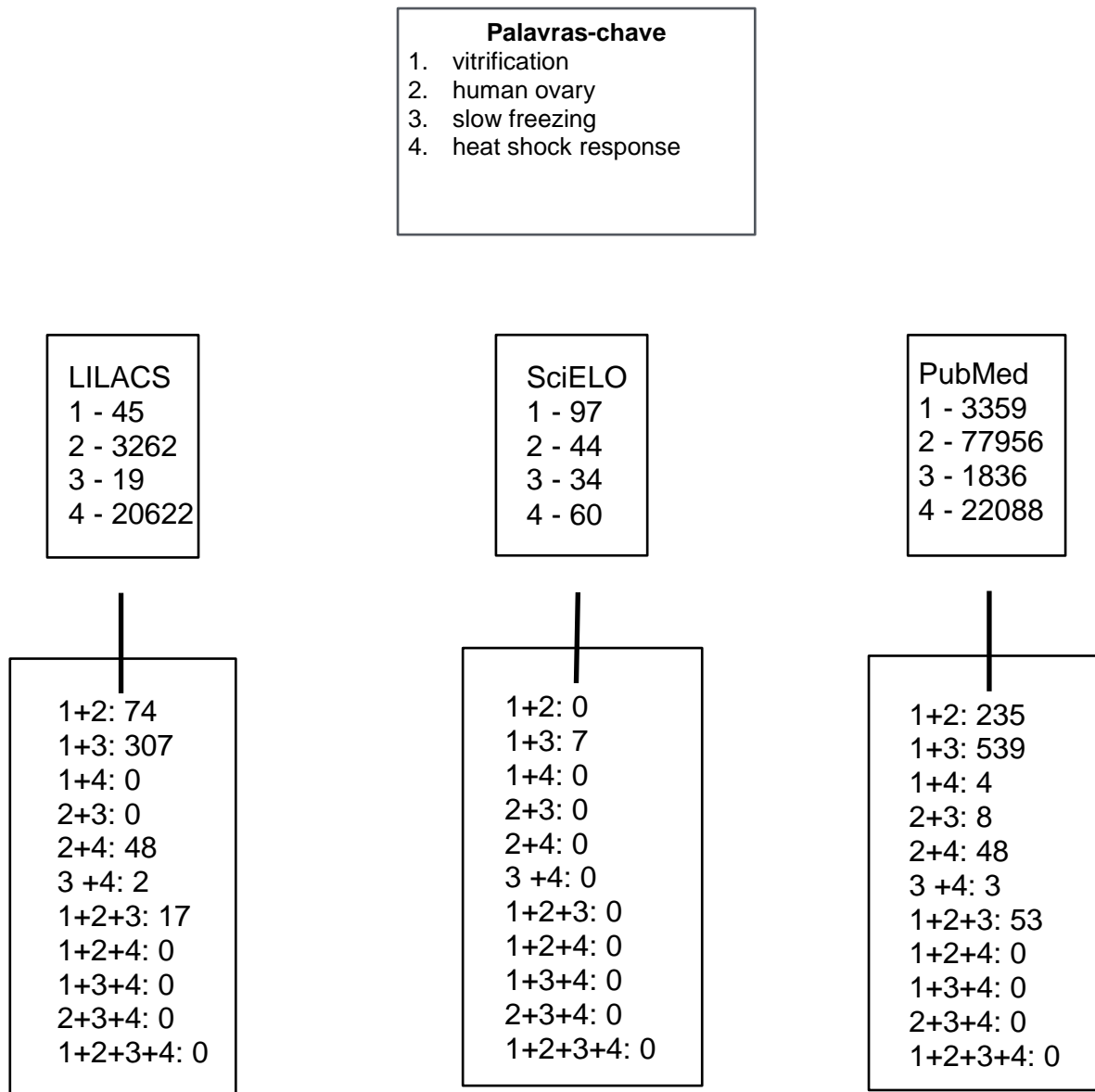


Figura 1: Revisão Sistemática da Literatura

2. Mapa conceitual

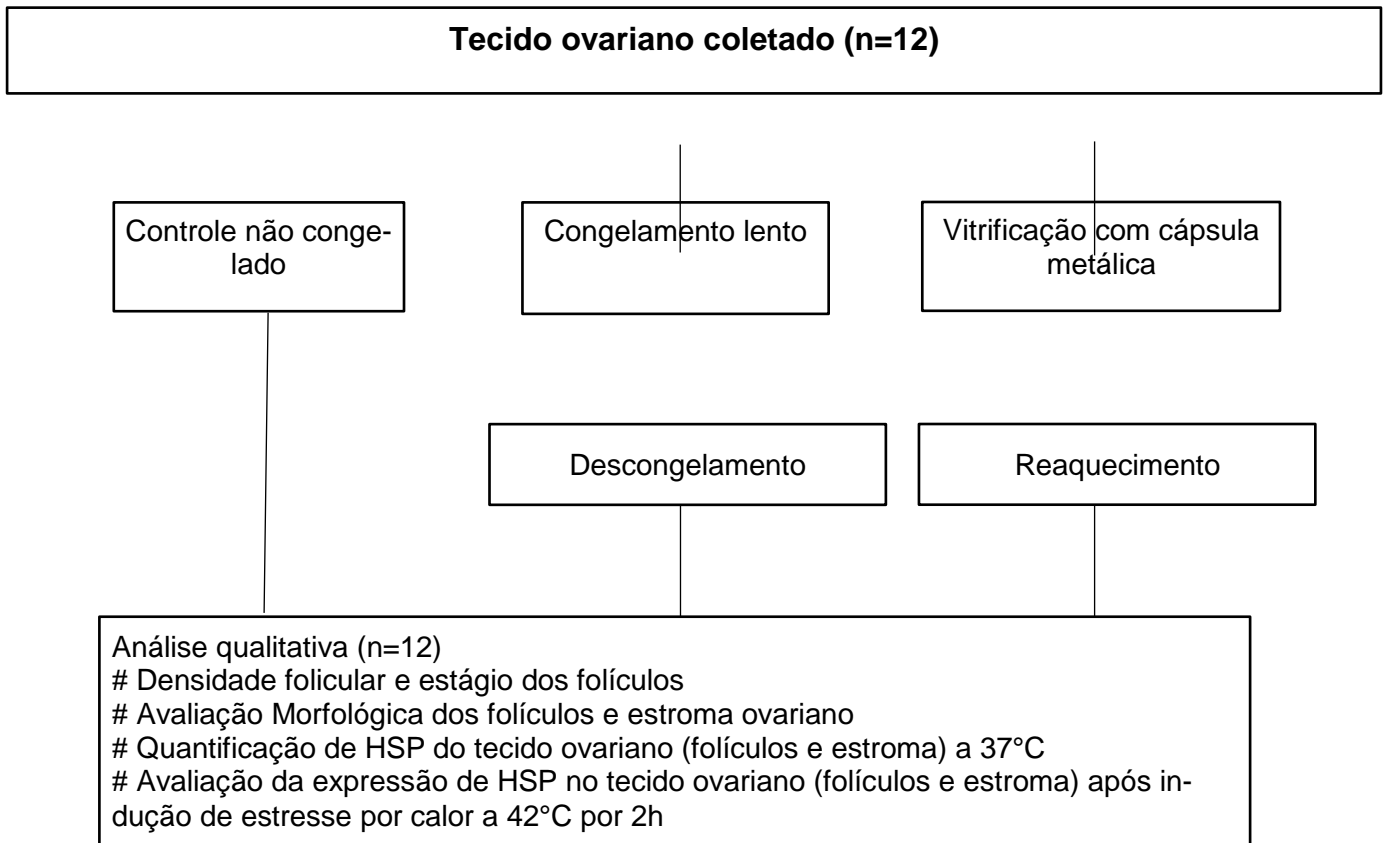


Figura 2. Mapa conceitual esquemático

3. Anatomia e histologia do ovário humano

3.1 Anatomia do ovário

Os ovários são as gônadas femininas, em forma de amêndoas, medindo de 3 a 4 cm de comprimento, por 2cm de largura e 1cm de espessura, inseridos no ligamento largo do útero através de sua porção mesovárica. O ovário mantém-se suspenso entre duas fixações: (1) lateralmente à parede pélvica através do ligamento suspensor do ovário (contém os vasos ovarianos, linfáticos e fibras nervosas autônomas) e (2) medialmente ao utero através do ligamento útero-ovárico (Hansen, 2015).

3.2 Histologia do ovário

Conforme o Tratado de Histologia (Gartner e Hiatt, 2007), a região central do ovário, a medula, é constituída por fibroblastos frouxamente situados em uma matriz rica em colágeno contendo fibras elásticas. A medula também contém vasos sangüíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas. A sua porção periférica, ou córtex, contém os folículos ovarianos, incluídos em um tecido compacto e altamente celular. No estroma que circunda os folículos estão presentes fibras musculares lisas. O limite entre a medula e o córtex não é muito nítido. No hilo, o córtex é interrompido e o mesovário se continua com a medula. A superfície do ovário é revestida por uma única camada de células cúbicas ou pavimentosas. Este epitélio de revestimento é contínuo com o mesotélio que recobre o ovário. Atualmente sabe-se que as células germinativas primordiais (ovogônias) têm origem no endoderma do saco vitelino logo após o primeiro mês de gestação. Elas sofrem várias divisões mitóticas e, durante a 6ª semana após a fertilização, migram para as cristas gonadais para povoar o córtex dos ovários em desenvolvimento. Nas cristas, elas continuam a sofrer divisões mitó-

tivas até próximo ao final do 5º mês fetal, Neste período, cada ovário contém cerca de 5 a 7 milhões de ovogônias. Cerca de 1 milhão de ovogônias tornam-se envolvidas por células foliculares e sobrevivem até a época do nascimento.

As ovogônias que sobrevivem entram na fase de prófase da meiose 1 e são chamadas de oócito primários, que permanecem nesta fase até pouco antes da ovulação, quando eles são estimulados pela substância indutora da meiose, e em resposta a uma elevação do hormônio luteinizante (LH), a completar sua primeira divisão meiótica, formando o oócito secundário e o primeiro corpúsculo polar.

3.2.1 Folículos ovarianos

Do milhão de ovogônias que sobrevivem formando folículos primordiais, cerca de 600.000 tornam-se atresicas durante a primeira década de vida e na menarca, uma mulher jovem possui apenas cerca de 400.000 folículos (Speroff et al., 1995). Geralmente a ovulação ocorrerá a cada 28 dias durante 30 a 40 anos, com um oócito sendo liberado a cada ciclo, contabilizando um total de cerca de 450 oócitos liberados durante o período reprodutivo. Os folículos restantes degeneram e morrem durante este mesmo período de tempo (Wallace e Kelsey, 2010).

Os folículos ovarianos estão envolvidos pelo estroma e são constituídos por um oócito primário e por células foliculares associadas a ele, dispostas em um arranjo de uma única camada esférica, ou várias camadas concêntricas, em torno do ovócito primário. As células foliculares, semelhantes ao epitélio germinativo, são derivadas do epitélio mesotelial. Podem ser identificados três tipos de folículos ovarianos: folículo primordial, folículo em crescimento (primários e secundários) e folículo maduro ou de Graaf (Speroff et al., 1995).

3.2.1.1 Folículo primordial

Os folículos primordiais, os mais primitivos, são abundantes antes do nascimento e depois tornam-se menos numerosos. São encontrados no estroma do córtex ovariano, logo abaixo da túnica albugínea, a cerca de 0,5mm de profundidade (Haino et al., 2018). O conjunto de folículos primordiais representa a reserva ovariana, qual seja, o potencial reprodutivo da mulher. O oócito é circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas, separadas do estroma conjuntivo por uma lâmina basal. Nesse estágio, as membranas plasmáticas do oócitos e das células foliculares circundantes estão em íntima aposição. O oócito primário mede cerca de 24 μ de diâmetro e contém um núcleo grande e excêntrico contendo um único nucléolo. As organelas incluem numerosas mitocôndrias, abundantes aparelhos de Golgi, retículo endoplasmático granular (REG) contendo poucos ribossomas, e ocasionais lamelas anulares (Speroff, 1995).

3.2.1.2 Folículo em crescimento

3.2.1.2.1 Folículo primário

A medida que crescem, os folículos primordiais se transformam em folículos primários, que são identificados pelas mudanças que ocorrem no oócito primário, nas células foliculares e no estroma adjacente. O oócito primário cresce até cerca de 100 μ de diâmetro e contém um núcleo grande. As células foliculares tornam-se cubóides. Enquanto uma única camada de células foliculares cubóides circunda o oócito, o folículo é denominado unilaminar, quando se estratificam, é chamado multilaminar (camada granulosa). À medida que estas últimas proliferam, as células do

estroma que circundam diretamente o folículo formam uma bainha celular, a teca folicular, externamente aderida à membrana basal. A teca folicular diferencia-se depois em duas camadas: a teca interna, que é uma camada interna e altamente vascularizada, e a teca externa de células de tecido conjuntivo. Os limites entre as duas camadas não são distintos (Speroff, 1995).

3.2.1.2.2 Folículo secundário

O folículo primário inicialmente se aprofunda no estroma cortical à medida que aumenta de tamanho, pela proliferação das células da camada granulosa. Quando a camada granulosa atinge a espessura de 6 a 12 camadas celulares, aparecem cavidades com líquido entre as células da camada granulosa. O líquido folicular vai se acumulando entre as células da granulosa e as cavidades se fundem em uma única cavidade chamada antro folicular. Nesse momento, o folículo é identificado como folículo secundário, ou antral. O oócito é excêntrico e atinge 124 μ m e não cresce mais. O folículo secundário atinge até 10mm ou mais. À medida que aumenta, o antro folicular também aumenta. A camada da granulosa é uniforme, com exceção da região do oócito, onde as células da granulosa formam um espessamento chamado *cumulus oophorus*, que se projeta para o antro e circunda o oócito (Speroff, 1995).

3.2.1.2.3 Folículo maduro ou de Graaf

A continuação da proliferação das células da camada granulosa e da formação do líquido folicular resulta na formação do folículo maduro ou folículo de Graaf, cujo diâmetro pode alcançar 2,5 cm na época da ovulação e ficar saliente na superfície do ovário. Ao se aproximar do tamanho máximo, a camada da granulosa parece ficar mais delgada, à medida que o tamanho do antro folicular aumenta. En-

quanto que o espaço entre as células da granulosa vai aumentando, o oócito e as células do *cumulus oophorus* vão se soltando das demais células da granulosa como preparação para a ovulação. As células do *cumulus oophorus*, que circundam diretamente o oócito, formam uma camada celular única, a *corona radiata*, que permanece associada ao oócito na ovulação (Speroff, 1995).

4. Criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação de tecido ovariano é proposta pelos profissionais das áreas de infertilidade e oncologia, para preservação da fertilidade ou da produção hormonal futura (Demeestere et al., 2007). O procedimento permite o congelamento de centenas de oócitos imaturos sem a necessidade de estimulação ovariana (que adiará o início do tratamento oncológico), o que é uma vantagem em relação a criopreservação de oócitos (Gosden et al., 2011). Os critérios de Edimburgo para indicação de criopreservação ovariana foram estabelecidos em 2005 e seguem atuais: pacientes com menos de 30 anos, sem história prévia de quimioterapia ou radioterapia (pacientes menores de 15 anos, com quimioterapia de baixo risco podem ser consideradas), chance real de sobrevivência a longo prazo e tratamento programado com alto risco de induzir a falência ovariana (Wallace et al., 2005; Poirot et al., 2007; Donnez et al., 2010; Oktay et al., 2016). Desde 1996, quando a criopreservação de tecido ovariano humano foi comprovada em 19 mulheres entre 19 e 44 anos e ofertada como novo método para preservação da fertilidade (Hovatta et al., 1996), vários grupos de pesquisadores vêm procurando aprimorar a tecnologia de criopreservação de fragmentos de córtex ovariano, onde encontra-se grande parte da reserva ovariana. Esta tecnologia, não apenas permite à paciente gerar seu filho biológico (Donnez et al., 2004) como também restabelecer suas funções fisiológicas ovarianas pós-retransplante (Oktay e Karlikaya, 2000). O banco de tecido ovariano criopreservado

da Dinamarca acumulou material de mais de 800 pacientes nos 10 primeiros anos de funcionamento e neste período realizou 53 transplantes em 41 pacientes (Jensen et al., 2015). O FertiPROTEKT, banco de tecido ovariano multinacional já registrou mais de 1000 criopreservações (von Wolf et al., 2015). Atualmente já surgem relatos de autotransplantes de tecido ovariano criopreservado e nascimentos vivos fora dos centros mais tradicionais (Tammiste et al., 2019).

Estudos anteriores já demonstraram que a criopreservação de tecido ovariano humano é possível e pode resultar em gestações e nascimentos vivos após o auto-transplante (Donnez et al., 2004; Meiorow et al., 2005; Andersen et al., 2008; von Wolff et al., 2009). Atualmente já foram relatados mais de 130 bebês saudáveis (Donnez et al., 2017; Xiao et al., 2017; Andersen et al., 2018 e Tammiste et al., 2019), nascidos a partir da fertilização de oócitos oriundos de tecido ovariano previamente criopreservado. A técnica mais utilizada para criopreservação de tecido ovariano é o congelamento lento (Donnez et al., 2015 e Jensen et al., 2015), mas muitos relatos de criopreservação de tecido ovariano por vitrificação podem ser obtidos na literatura (Kagawa et al., 2009; Sanfilippo et al., 2015; Suzuki et al., 2015; Fabbri et al., 2016; Silber, 2016). A vitrificação é a técnica utilizada por 93% dos centros que realizam criopreservação de tecido ovariano no Japão (Sanada et al., 2019). Silber, um dos pioneiros da criopreservação de tecido ovariano, utiliza desde 2008 apenas a vitrificação, após 11 anos de procedimentos por congelamento lento (Silber, 2016).

A preservação da fertilidade por criopreservação de tecido ovariano é reconhecida nos Estados Unidos como técnica a ser utilizada em situações específicas (*Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine*, 2014). Já existem redes nacionais na Dinamarca (Jensen et al., 2015), Bélgica (Donnez et al., 2017) e até uma rede internacional para congelamento de tecido ovariano envolven-

do Alemanha, Austria e Suíça, a Fertiprotekt (Muller et al., 2012). Entretanto, não está estabelecido ainda, qual técnica de criopreservação, se o congelamento lento ou a vitrificação resultam em índices superiores, em termos de sobrevivência folicular e do estroma ovariano, assim como de nascidos vivos pós-retransplante (Chibelean et al., 2020).

Os folículos primordiais da córtex ovariana, diferentemente de folículos em crescimento, toleram a criopreservação muito bem. O pequeno tamanho do oócito e das células de suporte, seu metabolismo baixo, a ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais periféricos e a pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis ao frio, fazem com que eles sejam menos vulneráveis à criopreservação. Os oócitos imaturos estão em prófase e carregam baixo risco de erros citogenéticos. Os folículos primordiais têm tempo para reparar danos não letais das organelas e de outras estruturas durante a sua prolongada fase de crescimento (Oktay et al., 1998; Shaw et al., 2000).

A maturação *in vitro* e o crescimento de folículos primordiais seguidos de fertilização *in vitro* é uma opção atrativa e viável (Kim et al., 2001). Também a maturação *in vitro* a partir da combinação de auto-transplante e cultura *in vitro*, em duas etapas, é viável. O tecido ovariano pode ser auto-transplantado tanto ortotopicamente (no sítio ovariano, na fossa ovárica ou no ligamento largo), como heterotopicamente (em outro sítio). A vantagem teórica dos enxertos ortotópicos é a restauração da função reprodutiva normal e a concepção natural ou a inseminação intra-uterina (Donnez et al., 2004). Entretanto, necessita grande capacidade cirúrgica laparoscópica (von Wolff et al., 2018). No transplante heterotópico, a restauração de fertilidade está necessariamente associada à captura dos oócidos e fertilização *in vitro* e, quando seleciona-se um local para enxerto, deve-se considerar o suprimento

vascular e o fácil acesso (Falcone et al., 2004). Geralmente se realiza o transplante ortotópico devido ao maior relato de nascidos-vivos com essa técnica (Takae e Suzuki, 2019). Os médicos do maior programa de criopreservação de tecido ovariano, localizado na Dinamarca, realizam o auto-transplante de forma ortotópica assim como heterotópico em bolsa peritoneal, no subcutâneo ou na parede abdominal (Jensen et al., 2015). A quantidade de tecido ovariano criopreservado que deve ser transplantado em cada procedimento ainda não está estabelecida (Takae e Suzuki, 2019).

Uma característica em comum entre as técnicas de criopreservação é que os fragmentos de tecido ovariano são cortados com espessura entre 1 e 2mm. Em tecidos mais espessos, pode não ocorrer a penetração adequada do crioprotetor e, conseqüentemente, não haver proteção suficiente aos danos celulares e teciduais causados pelo congelamento (Oktay et al., 2001).

Existe uma preocupação legítima com a recidiva de células cancerígenas devido ao re-transplante de tecido ovariano, principalmente em leucemia, que não deve ser ignorado ou exagerado (Loren et al., 2013; Bastings et al., 2013; Dolmans et al., 2013). As chances de transmissão do câncer no transplante de tecido ovariano dependem do seu tipo, enquanto muitos nunca originam metástases ovarianas, outros, devido à sua natureza sistêmica, representam algum risco (von Wolff et al., 2018). A córtex ovariana criopreservada é pouco vascularizada e sofre várias lavagens no seu preparo, o que reduz a probabilidade de recidiva do câncer (Oktay e Sonmeezer, 2004). Na Dinamarca, o programa nacional de criopreservação de tecido ovariano analisou 10 anos de auto-transplantes em pacientes oncológicas e as recidivas não puderam ser relacionadas com o auto-transplante (Jensen et al., 2015).

4.1.Princípios de criobiologia

Desde os primórdios da fertilização *in vitro* (FIV), a criopreservação de embriões humanos tem sido um aspecto fundamental da tecnologia de reprodução assistida, impedindo o desperdício de material valioso e melhorando as taxas cumulativas de gravidez (Friedler et al., 1988). A primeira criopreservação embrionária bem-sucedida foi relatada por Trounson e Mohr em 1983 (Trounson e Mohr, 1983), mas modificações subsequentes da técnica permitiram uma maior taxa de sucesso e a padronização dessa valiosa técnica, com uma alta taxa de sobrevivência e implantação embrionária após a transferência (Kader et al., 2009). A criopreservação de oócitos pode ser usada em mulheres que são filosoficamente desconfortáveis com o congelamento de embriões, bem como por mulheres que estão conscientes do declínio da reserva ovariana com o avanço da idade materna, mas não estão prontas para tentar a gravidez (Tucker et al., 2004; Fahy et al., 2007; Stoop et al., 2011). Ainda, a criopreservação de oócitos humanos tem sido procurada por mulheres jovens em tratamento oncológico como método de preservação da fertilidade (Chilbean et al., 2020). À medida que as taxas de sobrevivência em pacientes oncológicos em idade reprodutiva melhoram, a questão da preservação da fertilidade por criopreservação de tecido ovariano está se tornando mais importante (Matthews et al., 2012).

O princípio da criopreservação implica colocar as células em animação suspenso por períodos indefinidos de tempo em baixas temperaturas (Wittingham et al., 1977). Durante o processo, certas situações como choque osmótico, formação de

cristais e concentração aumentada de soluto devem ser evitadas (Mazur, 1984). Atualmente, existem duas técnicas disponíveis. Ambas usam crioprotetores para evitar danos às células. As taxas de resfriamento devem ser controladas para permitir a desidratação, evitando o congelamento intracelular e devem ser rápidas o suficiente para evitar os efeitos tóxicos dos crioprotetores (Garcia e Vila, 1984).

A primeira técnica utilizada é o congelamento lento. Requer uma baixa concentração de crioprotetores. A diminuição da temperatura é lenta (2 °C / minuto) até que a temperatura de *seeding* ou nucleação de -7 a -9 °C seja atingida. Os oócitos permanecem nessa temperatura por 10 a 30 minutos e depois a temperatura é reduzida para -32 °C a uma taxa de resfriamento lenta antes do armazenamento em NL₂. Durante esse período de tempo, as células irão se desidratar em resposta à elevada concentração de eletrólitos causada pela remoção de água na forma de cristais de gelo. Com uma velocidade de congelamento adequada, a célula se desidratará e se concentrará intracelularmente antes de atingir a temperatura de cristalização, de forma que a possibilidade de congelamento intracelular e o dano celular serão minimizados (Mazur, 1984).

A segunda técnica é a vitrificação, que utiliza quantidades maiores de crioprotetores, geralmente combinações de propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO) e etileno-glicol (EG), resultando em encolhimento por desidratação controlada da célula. Para evitar toxicidade, o tempo de exposição deve ser reduzido e as taxas de congelamento devem atingir -1500 °C / minuto até que armazenamento em NL₂ a -196°C. O processo de descongelamento implica em reidratação. É chamado de reaquecimento no caso de vitrificação e envolve transferência seriada via soluções de sacarose (Glujovsky et al., 2014). A vitrificação pode ter vantagens sobre o congelamento lento, especialmente aspectos técnicos, como a transição ultrar-

rápida do estado líquido para o sólido, evitando assim a formação de cristais que, acredita-se, causam danos às estruturas celulares ou choque osmótico (Sansinena et al., 2011). Usando a vitrificação, pode-se esperar que as taxas de sobrevivência celular sejam maiores, à medida que se evita o dano estrutural no nível celular (Gook, 2007). Além disso, nenhuma evidência de alterações nas estruturas do fuso meiótico ou dos cromossomos foi descrita nos procedimentos de vitrificação (Chen et al., 2003; Cobo et al., 2010; Martinez e Burgos, 2011). No entanto, as taxas de sucesso ainda são altamente dependentes do operador (Glujovsky et al., 2014).

Teoricamente, as células podem sobreviver indefinidamente criopreservadas em temperaturas em que não existe atividade biológica, como ocorre no NL₂. Os únicos tipos de reações que ocorrem nessa temperatura são os fotofisiológicos como a radiação ionizante. O nível natural de radiação ambiente é baixo e, uma vez que menos de 1% das mutações espontâneas são atribuíveis à radiação ambiente a temperaturas fisiológicas, seria necessário armazenamento por 200 a 1000 anos para reduzir significativamente a sobrevivência celular (Wittingham et al., 1977). Assim, parece não existir barreira óbvia ao armazenamento prolongado do tecido ovariano.

4.2. Congelamento lento

O congelamento lento foi desenvolvido inicialmente para embriões murinos, levando em consideração fatores criobiológicos como o meio, a velocidade de congelamento, a temperatura final e a velocidade de descongelamento, que poderiam influenciar na sua sobrevivência (Wittingham et al., 1977). O sucesso da técnica deveu-se às velocidades lentas de resfriamento, que permitiu a saída de toda a água congelável da célula, evitando-se a formação de gelo e também ao reaquecimento

lento durante todo o descongelamento (Mazur, 1984). A técnica foi muito utilizada para criopreservação de gametas humanos e embriões, até ser suplantada mais recentemente pela vitrificação. O congelamento lento utiliza equipamento específico, programável para as velocidades desejadas para congelamento, de acordo com o tecido ou a célula a ser criopreservada. O procedimento consome cerca de 150 min, até a temperatura adequada para imersão do material em NL_2 e armazenamento a $-196^\circ C$. Também o descongelamento envolve protocolo lento, com 3 etapas de 10 min (Rosendahl et al., 2011). Por ser uma metodologia mais clássica, já possui vários relatos de sucesso pós-retransplante do tecido ovariano à paciente livre da condição oncológica (Donnez et al., 2004; Meirou et al., 2005; Andersen et al. 2008; von Wolff et al., 2009; Rosendahl et al., 2011). O congelamento lento é a técnica mais utilizada em processos de preservação de tecido ovariano e conta com bancos de amostras teciduais em três grandes centros localizados na Dinamarca, na Bélgica e também na Alemanha, Austria e Suíça em conjunto (Muller et al., 2012; Jensen et al., 2015; Donnez et al., 2015). Além, disto, por sua natureza lenta, o congelamento pode induzir a formação de cristais de gelo no interior das células e do estroma, o que levaria a sua morte ou disfunção, quando do retorno a condições fisiológicas, prejudicando o fragmento como um todo. Entretanto, até hoje, segue como primeira opção de técnica para criopreservação de tecido ovariano humano na europa (Dalman et al., 2017).

4.3 Vitrificação

A vitrificação foi inicialmente proposta como alternativa a outros métodos de criopreservação para embriões mamíferos, uma vez que evita os danos potenciais causados pela formação de gelo intracelular nos procedimentos de congelamento lento (Mazur, 1884; Bös-Mikich et al., 1995; Galbinski et al., 2003), com a vantagem

de reduzir o tempo do procedimento e eliminar a necessidade de equipamento específico para congelamento lento programável. A técnica baseia-se na capacidade de soluções líquidas altamente concentradas de crioprotetores tornarem-se tão viscosas a temperaturas suficientemente baixas, que elas solidificam sem a formação de gelo (Rall et al., 1987). As células e os tecidos capazes de vitrificação escapam dos danos causados pelo efeito da solução ou pela formação de gelo intracelular. Os crioprotetores geralmente utilizados incluem DMSO, propanodiol, polietilenoglicol, dextrose e acetamida. O DMSO é o crioprotetor preferido devido a sua maior capacidade de formação de vidro e a sua baixa toxicidade, mas em concentrações muito elevadas ele pode ser de difícil manuseio (Friedler et al., 1988). A vitrificação foi posteriormente extrapolada para oócitos de murinos e grandes mamíferos (Bös-Mikich et al., 1985; Galbinski et al., 2003). Atualmente, a vitrificação já é utilizada como técnica predominante para criopreservação de oócitos e blastocistos humanos e vem sendo proposta e utilizada para criopreservação de tecido ovariano humano por representar uma metodologia simples e de baixo custo (Almodin et al., 2004; Sanfilippo et al., 2015; Fabbri et al., 2016; Sanada et al., 2019). As altas concentrações de crioprotetores empregadas para a vitrificação e o contato direto da amostra biológica ao NL_2 entretanto, são fatores importantes que merecem atenção na execução da técnica pelo risco de dano celular (Bielanski et al., 2000). Por ser um método que classicamente expõe o tecido diretamente ao NL_2 , e ter uma característica muito rápida, ela evita a formação de cristais de gelo intracitoplasmáticos e no estroma. Sendo assim, diferentes tipos de recipientes foram desenvolvidos para evitar o contato direto com o NL_2 (Bös-Mikich et al., 2012; Aquino et al., 2014; Xiao et al., 2017; Sugishita et al., 2018). A velocidade de resfriamento varia de acordo com o material do recipiente de criopreservação utilizado para evitar o contato direto do NL_2 com o

tecido ovariano (Gosden et al., 2011). Vários autores admitem que o recipiente plástico amplamente utilizado para as metodologias de criopreservação de material biológico, em que as amostras de tecido vitrificadas são armazenadas pode ser responsável pelos resultados ruins com a técnica da vitrificação já que o plástico não é um bom condutor de calor (Zhou et al., 2010; Amorim et al., 2011; Sheikhi et al., 2011; Fabbri et al., 2016; Xiao et al., 2017; Sugishita et al., 2018). A velocidade de resfriamento varia de acordo com o material do recipiente utilizado para evitar o contato direto da solução de criopreservação com o tecido ovariano (Gosden et al., 2011).

Para criopreservação de tecido ovariano, a vitrificação é uma alternativa atraente ao congelamento lento (Sanfilippo et al., 2015). Resultados promissores em termos de integridade folicular e do estroma ovariano pós-vitrificação, foram reportados nas últimas décadas, inicialmente em animais experimentais e posteriormente em humanos (Sugimoto et al., 2000; Tokieda et al., 2002; Migishima et al., 2003; Almodin et al., 2004 a,b; Chen et al., 2006; Isachenko et al., 2009; Keros et al., 2009; Sheikhi et al., 2011; Bos-Mikich et al., 2012; Maffei et al., 2013 e Aquino et al., 2014; Sanfilippo et al., 2015; Suzuki et al., 2015; Sugishita et al., 2018). Um estudo recente, comparando as duas técnicas em tecido ovariano humano, mostrou resultados superiores do congelamento lento em termos de preservação folicular e funcionalidade do tecido (Dalman et al., 2017). Atualmente já é a técnica predominante para criopreservação de tecido ovariano no Japão e por outros centros tradicionais de criopreservação (Silber et al., 2016; Sanada et al., 2019).

4.4 Vitrificação com cápsula metálica

A cápsula metálica destinada à criopreservação de tecido ovariano humano pela vitrificação, foi desenvolvida a partir de experimentos de vitrificação em pequenas peças de papel alumínio (Bös-Mikich et al., 2012) e posteriormente confeccionada em aço (Patente: BR 20 2013 019739 0) (Bös-Mikich et al., 2013; Aquino et al., 2014). Este sistema hermético condiz com especificações de “grau clínico”, visto que a cápsula permite um resfriamento rápido do material biológico e elimina a possibilidade de contato do tecido nela armazenado com o NL_2 , uma possível fonte de patógenos. A cápsula metálica já foi testada quanto a sua vedação utilizando-se um corante seco em pó vermelho (Sudão), que mudaria de cor, do avermelhado para preto, caso houvesse a entrada de NL_2 no recipiente após a vedação com a tampa em rosca (Aquino et al., 2014). O recipiente metálico e a técnica de vitrificação empregada utilizando o modelo experimental bovino apresentaram resultados positivos em termos morfológicos (Aquino et al., 2014) e bioquímicos (Massignam et al., 2018) após reaquecimento. Os folículos primários e primordiais, representantes da reserva ovariana feminina e o estroma do órgão não mostraram alterações significativas quanto a seu aspecto histológico após reaquecimento e cultivo *in vitro*. As análises bioquímicas desenvolvidas especificamente para tecido ovariano, com avaliação de marcadores de agentes anti-oxidantes, como a glutathiona comprovaram a viabilidade fisiológica do tecido pós-reaquecimento (Massignam et al., 2018). Através desta metodologia, pode ser constatado com amostras ovarianas bovinas utilizadas como material experimental, que o tecido ovariano não apresentou alteração significativa de suas defesas anti-oxidantes pós vitrificação, reaquecimento e cultivo *in vitro*, demonstrando assim, que a vitrificação mantém não apenas a sua integridade morfoló-

gica mas também fisiológica das amostras teciduais criopreservadas (Massignam et al., 2018). Outros metais têm sido propostos, como o titânio, ainda em estágio de estudo em animais (Sugishita et al., 2018) e com recipiente de prata, este último já com estudo em ovários humanos constatando melhores resultados morfológicos e de viabilidade quando comparado com recipiente plástico (Xiao et al., 2017).

5. Proteínas de choque térmico - HSP70

A resposta ao choque térmico (HSR) é um programa transcricional altamente conservador que é obrigatório para todas as células responderem eficientemente a uma ampla gama de estressores (Krause et al., 2015a). Além disso, o HSR é um componente chave da resposta fisiológica para resolver a inflamação (Newsholme e de Bittencourt, 2014). A ativação do HSR leva ao aumento da expressão de um grupo de proteínas chamadas de proteínas de choque térmico (HSP). As HSP são consideradas parte de uma família de proteínas conhecidas como “proteínas de estresse” uma vez que são induzidas por uma variedade de agentes estressores tais como estresse oxidativo (Krause, et al., 2007), estresse térmico (Yang, 1996), isquemia (Richard, 1996), exercício físico (Krause, et al., 2007), estresse metabólico (Beckmann, 1992) e muitos outros. Entre eles, o membro de 72 kDa da família de proteínas de choque térmico (HSP70), codificado pelo gene HSPA1A em humanos, que é o mais abundante de todas as HSP, representando 1–2% da proteína celular, e sendo abundante em muitos tecidos (Noble et al., 2008).

As funções da HSP70 incluem proteger as proteínas danificadas termicamente da agregação, desdobrando as proteínas agregadas, redobrando as proteí-

nas danificadas ou direcionando-as para uma degradação eficiente, assim agindo como uma chaperona molecular (Madden et al., 2008). Outras funções incluem a translocação de proteínas, anti-apoptose, anti-inflamatória e, mais recentemente, os papéis de HSP foram expandidos para incorporar o controle de sinalização celular e respostas imunes (Krause et al., 2015a). A HSP70 é conhecida por ser expressa e liberada no espaço extracelular, tendo uma grande variedade de efeitos em outras células (Tytell, 2005). Por exemplo, a HSP70 afeta e modula a fisiologia das células imunes (ativação/inativação) e está envolvida na indução da proteção de células neurais sob condições de estresse (Krause e Rodrigues-Krause, 2011). Curiosamente, a HSP70 pode induzir ações antagônicas, dependendo de sua localização. Por exemplo, intra-celularmente (iHSP70) exerce um poderoso efeito antiinflamatório, enquanto que extra-celularmente (eHSP70) pode ativar vias pró-inflamatórias (Krause et al., 2014). A eHSP70 aumentada está associada a condições de estresse inflamatório e oxidativo, enquanto os níveis de iHSP70 diminuídos estão relacionados à resistência à insulina no músculo esquelético (Henstridge et al., 2014). Além disso, é possível que a eHSP70 também possa contribuir para a homeostase metabólica, restaurando ativamente o conteúdo de HSP70 em tecidos resistentes à insulina, contendo baixos níveis endógenos de HSP (Archer et al., 2017).

Em células saudáveis, a HSR engloba a capacidade, quando sob estresse, de aumentar a expressão de iHSP70 e sua posterior exportação como eHSP70, por células que podem sistematicamente liberar essa proteína, como as células mononucleares do sangue. Essa resposta é essencial para proteostase e resolução da inflamação, sendo assim, uma HSR dificultada pode levar a várias doenças crônicas relacionadas à inflamação, como Alzheimer, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e outras doenças crônicas degenerativas relacionadas à idade (Krause et al.,

2015a; Archer et al., 2017; Hooper et al., 2014). Conseqüentemente, a manutenção de uma HSR normal é crucial para evitar essas condições e, por esse motivo, intervenções como a terapia de calor (Krause et al., 2015b; Faulkner et al., 2017) e o treinamento físico (Krause et al., 2015a), conhecidos indutores do HSR, podem ser utilizados como ferramentas não farmacológicas para melhorar a saúde geral do indivíduo (Muller et al., 2018).

A expressão da HSP70, por ser a mais abundante e a mais altamente conservada HSP, já foi avaliada como marcador da resposta ao estresse em tecidos ovarianos submetidos a diferentes técnicas de criopreservação (Maffei et al., 2014) e é um dos 3 grupos de proteínas propostas para avaliação fisiológica de tecidos ovarianos pós vitrificação (Nikishin et al., 2018). Portanto, a análise da expressão de HSP70 pode também ser utilizada como um marcador de estresse celular, onde células ou tecidos submetidos a estresse não letal, irão expressar esta proteína de forma proporcional a intensidade do dano. Nesse caso, a comparação da capacidade de expressar HSP70 em condições de repouso versus em condições de estresse, nos remete a idéia da capacidade das células de responderem normalmente frente a estímulos fisiológicos desafiadores, ou seja, de forma indireta, da função celular.

JUSTIFICATIVA

Considerando-se que os tratamentos antineoplásicos estão proporcionando taxas cada vez maiores de sobrevivência aos cânceres de infância e de adolescência, é de suma importância a preocupação com a qualidade de vida destas jovens, quando terminado o tratamento e livres da doença (Wallace et al., 2014). A perda da função ovariana causa esterilidade e carência hormonal, representando uma carga emocional muito grande, além dos efeitos físicos decorrentes (Frederick et al., 2016). A preservação da fertilidade destas pacientes pode ser realizada por criopreservação de oócitos ou de embriões, tecnologia amplamente difundida. No entanto, ambos tratamentos requerem indução hormonal e postergam o início do tratamento oncológico, o que pode agravar o quadro da paciente e aumentar o estresse emocional (Takae et al., 2019).

A preservação da fertilidade por criopreservação de tecido ovariano já é disponibilizada em vários países, notadamente na Europa (Jensen et al., 2015; Donnez et al., 2015). É reconhecida como técnica de preservação de fertilidade desde 2014 nos Estados Unidos (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2014) assim como na Europa (ESHRE Working Group on Oocyte Cryopreservation in Europe, 2017) e na Ásia (Takae et al., 2019), com indicações em caso de urgência do tratamento oncológico, crianças pré-púberes, mulheres com tumores hormônio-dependentes, transplante de medula óssea e em condições genéticas com risco de falência ovariana (Poirot et al., 2007; Oktay et al., 2016; von Wolff et al., 2019). Devido ao risco de reintrodução de células malignas, o procedimento é contraindicado em leucemia (Loren et al., 2013; Bastings et al., 2013; Dolmans et al., 2013). Embora sendo a técnica mais utilizada, o congelamento lento requer equipamento de alto custo. A vitrificação, técnica consagrada para criopreservação de ga-

metas e, principalmente, de embriões humanos, vem sendo proposta como alternativa rápida, simples e de baixo custo (Chibelean et al., 2020).

A maioria dos estudos de vitrificação utiliza recipiente plástico para armazenar o material sem contato direto com o NL_2 , o que pode justificar o comprometimento dos resultados por não ser um bom condutor de calor. O metal é um condutor de calor muito mais rápido que o plástico. O recipiente metálico desenvolvido pelo nosso grupo e a técnica de vitrificação empregada utilizando o modelo experimental bovino apresentou resultados positivos em termos morfológicos (Aquino et al., 2014) e bioquímicos pós-desvitrificação (Massignam et al., 2018).

Sendo assim, acreditamos ter elementos suficientes para justificar a extrapolação do método de vitrificação em cápsula metálica para tecido ovariano humano e comparar os resultados com tecido criopreservado pelo método congelamento lento. Os resultados poderão contribuir para a criação de um Banco de Tecido Ovariano para pacientes oncológicas em nosso meio. A implementação e efetividade de um sistema de coleta e armazenamento de tecido ovariano em nossa sociedade trará alento e qualidade de vida para mulheres jovens, em idade reprodutiva, acometidas por alguma forma de câncer ou outra condição clínica, cujo tratamento possa prejudicar sua função ovariana.

HIPÓTESES

1. Hipótese nula (H0)

Não existe diferença significativa na análise morfológica e na análise do imunocnteúdo de HSP70 após estímulo térmico do tecido ovariano humano submetido a criopreservação por vitrificação em cápsula metálica ou por congelamento lento.

2. Hipótese alternativa (H1)

Existe diferença significativa na análise morfológica e na análise do imunocnteúdo de HSP70 após estímulo térmico do tecido ovariano humano submetido a criopreservação por vitrificação em cápsula metálica ou por congelamento lento.

OBJETIVOS

1. Objetivo principal

Comparar a efetividade da criopreservação de tecido ovariano humano pela técnica de vitrificação em cápsula metálica com a técnica de congelamento lento.

2. Objetivos secundários

Comparar a morfologia do tecido ovariano vitrificado em cápsula metálica ou submetido a congelamento lento, após reaquecimento ou descongelamento de amostras teciduais.

Comparar a resposta fisiológica do tecido ovariano vitrificado em cápsula metálica ou submetido a congelamento lento, após reaquecimento ou descongelamento de amostras teciduais através da quantificação do imunocnteúdo de HSP70 a 37°C e após indução de estresse por aquecimento a 42°C.

REFERÊNCIAS

Almodin, CG, Minguetti-Câmara, VC, Meister, H, et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod* 2004;**19**:1287-93.

Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**:160–186.

Andersen, CY, Rosendahl, M, Byskov, AG et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2008;**23**: 2266–2272.

Andersen, CY, Bollerup, AC, Kristensen, SG. Defining quality assurance and quality control measures in connection with ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a call to action. *Hum Reprod* 2018;**33**(7):1201–4.

Aquino, D, Danielli, L, Rigon, P, et al. Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. *JBRA Assisted Reproduction* 2014;**18**(1):12-15.

Archer, AE, Von Schulze, AT, Geiger, PC. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol Sci* 2017;**373** (1738).

Bastings, L, Beerendonk, CC, Westphal, JR et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: A systematic review. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:483–506.

Beckmann, RP, Lovett, M and Welch J. Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress. *J Cell Biol* 1992; **117**(6):1137-50.

Bös-Mikich A, Wood MJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 1995;**53**:780-5.

Bös-Mikich, A, Marques, L, Rodrigues, JL, et al. The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation after different times and temperatures of transport. *J assist Reprod Genet* 2012;**29**:1267-71.

Bös-Mikich, A, Aquino, D, Danielli, L, Rigon, PSL, Lothhammer, N, Frantz, N. Metal cryovial: a new, promising system for clinical grade vitrification of ovarian tissue. *Human Reproduction* 2013;**28**(1):112–115.

Bradford, MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-54.

Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing - a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003;**202**(1-2):101-7.

Chen, SU, Chien, CL, Wu, MY, et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 2006;**21**:2794-800.

Chibeleian, CB, Petca, R-V, Radu DC, Petca, A. State of the Art in Fertility Preservation for Female Patients Prior to Oncologic Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2020; **56**(2):89.

Cobo, A, Meseguer, M, Remohi, J, Pellicer, A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction* 2010;**25**(9):2239-46.

Dalman, A, Deheshkar Gooneh Farahani, NS, Totonchi, M, Pirjani, R, Ebrahimi, B, Rezazadeh Valojerdi, M. Slow freezing versus vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation: An evaluation of histological changes, WNT signaling pathway and apoptotic genes expression. *Cryobiology* 2017;**79**:29–36.

Demeestere, I, Simon, P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist*. 2007;**12**:1437–1442.

Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013; **99**: 1514–1522.

Donnez, J, Dolmans, MM, Demylle, D et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;**364**:1405–1410.

Donnez, J, Dolmans, MM. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. *Clin Obstet Gynecol* 2010;**53**:787–796.

Donnez, J, Dolmans, MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol* 2013;**9**:735–749.

Donnez, J, Dolmans, MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:1167-1170.

Donnez J, Dolmans MM. The ovary: from conception to death. *Fertil Steril* 2017;**108**(4):594–5.

ESHRE Working Group on Oocyte Cryopreservation in Europe - Shenfield, F, deMouzon ,J, Scaravelli, G, Kupka, M, Ferrretti, AP, Prados, FJ, et al. Oocyte and ovarian tissue cryopreservation in European countries: statutory background, practice, storage and use. *Hum Reprod Open* 2017. <https://doi.org/10.1093/hropen/hox003>

Fabbri, R, Vicenti, R, Macciocca, NA et al. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Human Reproduction* 2016;**31**(8)1838-49.

Fahy, GM. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. *Reproductive Biomedicine Online* 2007;**14**(6):709-14.

Falcone, T, Attaran, M, Bedaiwy, M, Goldberg J. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril* 2004;**81**:243-57.

Faulkner, SH, Jackson, S, Fatania, G, & Leicht, CA. The effect of passive heating on heat shock protein 70 and interleukin-6: A possible treatment tool for metabolic diseases? *Temperature* 2017;**4**(3):292–304.

Ferreira, MO, Bos-Mikich, A, Frantz, N et al. The effects of sample size on the outcome of ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2010; **45**: 99-102.

Ferreira, M, Massignam, E, Sanginet, E et al. Medições de glutathiona em tecido ovariano após a criopreservação. In: V Symposium on oxidative stress and cardiovascular disease, 2016, Porto alegre. Proceedings V Symposium on oxidative stress and cardiovascular disease. Porto Alegre: UFRGS, 2016. p.87.

Friedler, S, Shen, E, Lamb, EJ et al. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification: methodologic studies. *Fertil Steril* 1988;**48**:306-14.

Galbinski, S, Bös-Mikich, A, Ferrari, AN. Viabilidade e fertilização in vitro de oócitos bovinos após Vitricificação. *RBGO*. 2003;**25**(8):553-9.

Gartner, LP, Hiatt, JL. **Tratado de histologia**. 3ª Edição. São Paulo: Elsevier, 2007. 470-480 p.

Global Burden of Disease Cancer - Fitzmaurice, C, Akinyemiju, TF, Al Lami, FH, Alam, T, Alizadeh-Navaei, R, et al. Global, Regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2018;**4**:1553–68.

Glujovsky, D, Riestra, B, Sueldo, G, Repping, S, Nodar, F, Papier, S, Ciapponi, A. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;**5**(9):CD010047.

Gook, DA. History of oocyte cryopreservation. *Reproductive Biomedicine Online* 2011;**23**(3):281-9.

Gosden, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation *Fertil Steril* 2011;**96**:264-8.

Gougeon, A, Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. *Endocr Rev* 1996;**7**:121-55.

Haino, T, Tarumi, W, Kawamura, K, Harada, T, Sugimoto, K, Okamoto, A, Ikegami, M, Suzuki, N. Determination of Follicular Localization in Human Ovarian Cortex for Vitrification. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2018;**7**(1):46-53.

Hansen, JT, **Netter Anatomia Clínica**. 3ª Edição. São Paulo: Elsevier, 2015. 226 p.

Henstridge, D C, Bruce, CR, Drew, BG, Tory, K, Kolonics, A, Estevez, E, Febbraio, MA. Activating HSP72 in Rodent Skeletal Muscle Increases Mitochondrial Number and Oxidative Capacity and Decreases Insulin Resistance. *Diabetes* 2014;**63**(6):1881–1894.

Hooper, PL. Induction of Heat Shock Proteins in the Therapy of Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. *EBioMedicine* 2014;**1**(1):14–15.

Hovatta, O, Silye, R, Krausz, T, Abir, R, Margara, R, Trew, G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996;**11**:1268–1272.

INCA. Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. In: inca.gov.br/estimativa2016.

Isachenko, V, Lapidus, I, Isachenko, E, et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological and molecular biological evaluation. *Reproduction* 2009;**138**:319-27.

Jensen, AK, Kristensen, SG, Macklon, JV, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Human Reproduction* 2015; **30**(12):2838-45.

Kader, AA, Choi, A, Orief, Y, Agarwal, A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009;**7**:99.

Keros, V, Xella, S, Hultenby, K, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;**24**:1670-83.

Kim, S, Battaglia, D, Soules, M, The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril* 2001;**76**:1059-56.

Klocke, S, Bundgen, N, Koster, F, Eichenlaub-Ritter, U, Griesinger, G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 2015;**291**2:419–426.

Krause, MS, et al., MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct* 2007;**25**(1):23-32.

Krause, M, & Rodrigues-Krause, J da C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. *Medical Hypotheses* 2011;**76**(2):286–290.

Krause, M, et al. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic beta-cell dysfunction and death in vitro. *Clin Sci (Lond.)* 2014;**126**(10):739–752.

Krause, M, et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediat Inflamm* 2015a; 249205.

Krause, M, et al. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015b;**18**(4):374–380.

Laemmli, UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**(5259):680-5.

Loren, AW, Mangu, PB, Beck, LN, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;**31**:2500–2510.

Madden, LA, Sandström, ME, Lovell, RJ, & McNaughton, L. Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. *Amino Acids* 2007;**34**(4):511–516.

Maffei, S, Pennarossa, G, Brevini, TAL, et al. Beneficial effect of directional freezing on in vitro viability of cryopreserved sheep whole ovaries and ovarian cortical slices. *Human Reprod* 2014;**29**(1):114–24.

Martinez-Burgos, M, Herrero, L, Megias, D, Salvanes, R, Montoya, MC, Cobo, AC, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertility and Sterility* 2011;**95**(1):374-7.

Massignam, ET, Ferreira, M, Sanguinet, E, Dupont, A, Klamt, F, Frantz, N, Bos-Mikich, A. Antioxidant defence capacity of ovarian tissue after vitrification in a metal closed system. *JBRA Assist Reprod* 2018;**22**(3):199–204.

Matthews ML, Hurst BS, Marshburn PB, Usadi RS, Papadakis MA, Sarantou T. Cancer, fertility preservation, and future pregnancy: a comprehensive review. *Obstetrics and Gynecology International* 2012;953937.

Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; **247**:125-42.

Meirow, D., Levron, J., Eldar-Geva, T, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005;**353**:318–321.

Migishima, F, Suzuki-Migishima, R. Song, SY, et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 2003;**68**:881-7.

Müller, A, Keller, K, Wacker, J, Dittrich, R, Keck ,G, Montag, M, et al. Retransplantation of cryopreserved ovarian tissue: the first live birth in Germany. *Dtsch Ärzteblatt Int* 2012;**109**(1–2):8–13.

Muller, CHL, et al. Heat-induced extracellular HSP72 release is blunted in elderly diabetic people compared with healthy middle-aged and older adults, but it is partially restored by resistance training . *Experimental Gerontology* 2018;**111**:180-7.

Newsholme, P and de Bittencourt, PIH. The fat cell senescence hypothesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2014;**17**(4):295–305.

Nikishin, DA, Filatov, MA, Kiseleva, MV, Bagaeva, TS, Konduktorova, VV, Khramova YV, Malinova, IV, Komarova, EV, Semenova, ML. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**(10):1851-1860.

Noble, EG, Milne, KJ, Melling, CW. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;**33**(5):050–1065.

Oktay, K, Newton, H, Aubart, Y, Salha, O, Gosden, RG. Cryopreservation of immature human oocyte and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998;**69**:1-7.

Oktay, K and Karlikaya, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;**342**(25):1919.

Oktay, K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications. *Hum Reprod Update* 2001;**7**:526-34.

Oktay, K, Sonmezer, M. Ovarian tissue banking for cancer patients. *Hum Reprod* 2004;**19**:477-80.

Oktay, K, Bedoschi, G, Pacheco, F, Turan, V, & Emirdar, V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *Am J Obstet Gynecol* 2016;**214**(1):94.e1-94.e9.

Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, et al. . Fertility preservation in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;**36**:1994–2001.

Poirot, CJ, Martelli, H, Genestie, C, Golmard, JL, Valteau-Couanet, D, Helardot, P, Brugieres, L. Feasibility of ovarian tissue cryopreservation for prepubertal females with cancer. *Pediatric Blood & Cancer* 2007;49(1):74–78.

Poorvu, PD, Frazier, AL, Feraco, AM, Manley, PE, Ginsburg, ES, Laufer, MR, et al. . Cancer treatment-related infertility: a critical review of the evidence. *JNCI Cancer Spectr* 2019;3:1–14.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil. Steril* 2014;101:1237–43.

Rall, WF. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. *Cryobiology* 1987;24:387-402.

Richard, V, Kaeffer, N, and Thuillez, CS. Delayed protection of the ischemic heart--from pathophysiology to therapeutic applications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996; 10(5):409-15.

Rosendahl, M, Schmidt, KT, Ernst, E, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. *RBMOnline* 2011;22(2):162-171.

Sanada, Y, Harada, M, Kunitomi, C, Kanatani, M, Izumi, G, Hirata, T, et al., A Japanese nationwide survey on the cryopreservation of embryos, oocytes and ovarian tissue for cancer patients. *J Obstet Gynaecol Res* 2019;45(10):2021-2028.

Sanfilippo, S, Canis, M, Smitz, J, et al. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:67.

Sansinena, M, Santos, MV, Zaritzky, N, Chirife, J. Comparison of cooling rates in oocyte vitrification systems using a numerical simulation. *Reproduction, Fertility and Development* 2011;**24**(1):133-4.

Shaw, J, Oranratnachai, A, Trounson, A. Fundamental cryobiology of mammalian oocyte and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000;**53**:59-72.

Sheikhi, M, Hultenby, K, Niklasson, B, et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reprod* 2011;**26**:594-603.

Speroff, L, Glass, RN, and Kase, MG: O ovário - embriologia e desenvolvimento. In: Speroff, L, Glass, RN, and Kase, MG (eds.), Camargo Jr, MAS. (trad.). *Endocrinologia Ginecológica e Infertilidade*, 5ªed., português, cap. 3, p. 85-109. São Paulo, Manole, 1995.

Steliarova-Foucher, E, Colombet, M, Ries, LAG, Moreno, F, Dolya ,A, Bray, F, et al. . International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* 2017;**18**:719–31.

Stoop, D, Nekkebroeck, J, Devroey, P. A survey on the intentions and attitudes towards oocyte cryopreservation for non-medical reasons among women of reproductive age. *Human Reproduction* 2011;**26**(3):655-61.

Sugimoto, M, Maeda, S, Manabe, N, Miuamoto, H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogeneology*.2000;**53**:1093-103.

Sugishita, Y, Okamoto, N, Uekawa, A, Yamochi, T, Nakajima, M, et al. Oocyte retrieval after heterotopic transplantation of ovarian tissue cryopreserved by closed vitrification protocol. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**(11):2037–2048.

Suzuki, N, Yoshioka, N, Takae, S, Sugishita, Y, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency *Human Reproduction* 2015;**30**(3):608–615.

Takae, S, Lee, JR, Mahajan, N, Wiweko, B, et al., Fertility Preservation for Child and Adolescent Cancer Patients in Asian Countries *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:655.

Takae, S and Suzuki, N. Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reprod Med Biol* 2019;**18**(3):217–224.

Tammiste, T, Kask, K, Padrik, P, Idla, K, Rosenstein, K, Jatsenko, T, Veerus, P, Salumets, A. A case report and follow-up of the first live birth after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue in Eastern Europe. *BMC Women's Health* 2019;**19**:65.

Tokieda, Y, Ishiwata, I, Segino, M, et al. Establishment of a novel method for cryopreservation and thawing of the mouse ovary. *Hum Cell* 2002;**15**:230-7.

Trounson, A, Mohr, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;**305**(5936):707-9.

Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 2004;**113**(S1):S24-7.

Tytell, M. Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues. *International Journal of Hyperthermia* 2005;**21**(5): 445-455.

Von Wolff, M, Donnez, J, Havoc, O, et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy – a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur J Cancer* 2009;**45**: 547–1553

von Wolff, M, Dittrich, R, Liebenthron, J, Nawroth, F, Schüring, AN, Bruckner, T, Germeyer, A. Fertility-preservation counselling and treatment for medical reasons: data from a multinational network of over 5000 women. *Reprod BioMed Online* 2015;**31**:605–612.

von Wolff, M, Sanger, N, Liebenthron, J. Is ovarian tissue cryopreservation and transplantation still experimental? it is a matter of female age and type of cancer. *J Clin Oncol* 2018;**36**:3340–1.

von Wolff, M, Andersen, CY, Woodruff, TK, Nawroth, F. FertiPROTEKT, oncofertility consortium and the danish fertility-preservation networks - what can we learn from their experiences? *Clin Med Insights Reprod Health* 2019;**13**:1179558119845865.

Xiao, Z, Zhang, Y and Fan, W. Cryopreservation of human ovarian tissue using the silver closed vitrification system. *J Assist Reprod Genet.* 2017;**34**(11):1435–1444.

Yang, XM, et al., Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model. *Cardiovasc Res* 1996;**31**(5):777-83.

Zhou, XH, Wu, YJ, Shi,J, Xia, YX, Zheng, SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* 2010;**60**:101-105.

Wallace, WH, Anderson, RA, Irvine, DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005;**6**:209-18.

Wallace, WHB, Kelsey T.W. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS ONE* 2010;**5**:e8772.

Wallace, WH, Smith, AG, Kelsey, TW, Edgar ,AE, Anderson, RA. Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation. *Lancet Oncol* 2014;**15**:1129–36.

Wittingham, D, Lyon, M, Glenister, P, Longterm storage of mouse embryos at 196°C: the effect of background radiation. *Genet Res* 1977;**29**:171-81.

ARTIGO EM INGLÊS

Comparative analyzes of vitrification with a closed steel container and slow freezing for cryopreservation of human ovarian tissue: morphological aspects and the Heat Shock Response

Abstract

Purpose:

The aim of this study was to compare the effects of vitrification, using a closed steel container with slow freezing for cryopreservation of human ovarian cortex in morphological and tissue heat shock response (HSR).

Methods:

Prospective controlled experimental study with 12 patients submitted to gynecological videolaparoscopy at the Fêmima Hospital, from March to December, 2018. A superficial biopsy of ovarian cortical tissue was sectioned into several small fragments (2mm x 3mm x 1-2mm). The fragments of each patient were allocated in 3 conditions: fresh ovarian tissue, ovarian tissue submitted to slow freezing and ovarian tissue submitted to vitrification with a steel closed container. After rewarming or thawing, morphological analysis were performed for all conditions. To test the HSR, the ovarian fragments were submitted to heat challenge (2h exposure to 42°C). Eight hours after the heat challenge, the tissue was prepared for the immune quantification (western blot) of heat shock protein 70 kDa (HSP70).

Results:

The number of total intact follicles was higher in fresh ovarian tissue when compared to tissues submitted to both slow freezing and vitrification ($p=0.007$). When compar-

ing the frequencies of intact follicles between groups, there was a difference only for primordial follicles ($p < 0.001$), higher in fresh ovarian tissue. There were no significant differences between the two cryopreservation techniques, however, the absolute numbers of follicles suggests a tendency for better preservation on vitrification. HSR (evaluated by HSP70 expression) was higher in fresh ovarian tissue ($p = 0.001$) and blunted after cryopreservation. Interestingly, comparing the two techniques, a higher HSP70 content was found after slow freezing than after vitrification, which may indicate, despite the lower number of follicles, a better cytoprotection in slow freezing samples. However, there was no difference in the median HSP between temperatures in the slow freezing and vitrification groups ($p = 0.937$).

Conclusions:

Our results indicate that each cryopreservation technique may present different particular advantages, such as a higher numbers of intact primordial follicles for vitrification with the closed steel container and better preserved HSR for slow freezing.

Keywords: ovarian cryopreservation, closed vitrification system, heat shock response

Introduction

The cryopreservation of human ovarian tissue was proven to be feasible in 1996, when it offered a new method for fertility preservation (Hovatta et al., 1996). Since the first infant was born after the transplantation of frozen/thawed ovarian tissue in 2004 (Donnez et al., 2004), over 130 live births have occurred after the orthotopic auto-transplantation (Meirow et al., 2005; Donnez and Dolmans, 2017; Xiao et al., 2017; Jensen et al., 2017; Andersen et al., 2018; Tammiste et al., 2019). Currently, the most widely used options for preserving the fertility of cancer patients wor-

ldwide are embryo and oocyte cryopreservation. Both options present difficulties at the moment of their accomplishment, the main one being the need of the use of follicular growth stimulating hormones for oocyte uptake and, if applicable, the generation and cryopreservation of embryos. This hormonal induction process may delay the initiation of antineoplastic treatment and may also worsen her clinical condition, depending on the type of malignancy she suffers (Donnez et al., 2013).

Cryopreservation of ovarian tissue is receiving increasing attention from infertility and oncology professionals, as it may represent several benefits for young women when undergoing cancer treatment with chemotherapy or radiotherapy, at the risk of becoming sterile and entering in early menopause (Demeestere et al., 2007; ESHRE Working Group on Oocyte Cryopreservation in Europe, 2017; von Wolff et al., 2019; Takae et al., 2019). This technology not only allows the patient to generate her biological child but also re-establish her post-transplantation ovarian physiological functions (Donnez et al., 2010 and Donnez et al., 2011; Xiao et al., 2017; Takae and Suzuki, 2019).

The majority of reports of ovarian tissue cryopreservation come from the slow freezing technique (Muller et al., 2012; Donnez et al., 2015; Jensen et al., 2015; Dalman et al., 2017), but vitrification has raised the interest of researchers and some reports can already be obtained from the literature (Almodin et al., 2004; Sanfilippo et al., 2015; Fabbri et al., 2016; Xiao et al., 2017). Vitrification is the major protocol used for ovarian tissue in Japan, performed by 25 (93.0%) institutions (Sanada et al., 2019). However, it is not yet established which cryopreservation technique, slow freezing or vitrification results in higher rates in terms of follicular survival and ovarian stroma, as well as post transplantation live births (Chibelean et al., 2020). Slow freezing as a more classic methodology already has several reports of successful post-

transplantation of tissue to the cancer-free patient (Donnez et al., 2004; Oktay and Karlikaya, 2000; Meirov et al., 2005; Andersen et al. 2008; von Wolff et al., 2009; Rosendahl, 2011; Jensen et al., 2015; Donnez et al., 2015; Oktay et al. 2016; Tam-miste et al., 2019). For its execution, however, appropriate equipment is required, usually at a very high cost. In addition, because of its slow nature, freezing can induce the formation of ice crystals within cells and stroma, leading to death or dysfunction upon return to physiological conditions, harming the tissue as a whole (Klocke et al., 2015).

Vitrification, on the other hand, is an attractive alternative to slow freezing as it avoids the potential damage caused by intracellular ice formation (Mazur, 1984) and because it is faster and does not require specific equipment for cryopreservation (Galbinski et al., 2003; Almodin et al., 2004; Sanfilippo et al., 2015). It is based on the ability of highly concentrated liquid cryoprotectant solutions to become so viscous at sufficiently low temperatures that they solidify rapidly without ice formation (Rall, 1987). High concentrations of cryoprotectants employed for vitrification and direct contact of the biological sample with liquid nitrogen (LN₂), however, are important factors that deserve attention in performing the technique due to the risk of cell damage (Bielanski et al., 2000; Bielanski et al., 2003). Recent studies comparing the slow freezing technique with ovarian tissue vitrification have shown very similar results in terms of follicular preservation and tissue functionality (Chen et al., 2006; Sheikhi et al., 2011; Klocke et al., 2015; Sanfilippo et al., 2015; Silber, 2016; Fabbri et al., 2016). However, the use of plastic containers in vitrification may result in inferior efficiency, as plastic is not an appropriate heat conductor (Zhou et al., 2010; Amorim et al., 2011, Sheikhi et al., 2011 ; Bos-Mikich et al., 2012; Aquino et al., 2014;

Fabbri et al., 2016; Xiao et al., 2017; Massignam et al., 2018). Our group has developed a metal capsule designed for cryopreservation of vitrified human ovarian tissue (Patent n°.: BR 20 2013 019 739-0) (Bos-Mikich et al., 2012; Bös-Mikich et al., 2013; Aquino et al., 2014; Massignam et al., 2018) that allows rapid cooling of biological material and eliminates the possibility of contact with the tissue stored in it with LN₂, a possible source of pathogens, and has shown morphological and physiological viability after devitrification in animal studies (Aquino et al., 2014, Massignam et al., 2018).

Heat shock proteins (HSP) are considered part of a family of proteins known as “stress proteins” (Krause, et al., 2007). HSP70 expression, being the most abundant and highly conserved HSP (Noble et al., 2008), has already been evaluated in ovarian tissue submitted to different cryopreservation techniques (Maffei et al., 2014), and are considered adequate for physiological evaluation of the ovarian cortex after vitrification (Nikishin et al., 2018). The functions of the HSP70 include protecting thermally damaged proteins from aggregation by unfolding the aggregated proteins, refolding the damaged proteins or directing them to efficient degradation, thereby acting as a molecular chaperone (Madden et al., 2008). Other functions include protein translocation, anti-apoptosis, anti-inflammatory and, more recently, HSP roles have been expanded to incorporate cellular signaling control and immune responses (Krause et al., 2015a). The comparison between basal levels of HSP70, with that obtained after heat stress (a process called heat shock response, HSR) may demonstrate the physiological capacity of cells to respond to challenging stimuli, ie, indirectly, demonstrate the state of cellular homeostasis.

Herein, we aimed to compare the effectiveness of vitrification, using a metal capsule, in the face of slow freezing, for cryopreservation of human ovarian tissue, looking at morphological aspects and tissue HSR.

Methods

Participants Characteristics and Ethics

Twelve females participants volunteered for this study (age 34.6 ± 3 y.o. and Body mass index (BMI) of 27.5 ± 3.1 kg/m²). General patients characteristics are depicted at table 1. Informed consent form was obtained from all participants prior to beginning the study. Research assessments and protocols were approved by the local Ethics Committee. This work is in accordance with the international laws on procedures to deal with human tissue and its design according to the guideline for publication of CONSORT. The researchers signed the compromise agreement regarding the secrecy to use data according to the resolution of the National Health Council CNS 466/2012. The project was submitted for evaluation by CEP-GHC and approved under number 17135.

Videolaparoscopy technique

After general anesthesia, a Verress needle is inserted and pneumoperitoneum is developed with CO₂ at 13mm/Hg. Next, the 10mm umbilical trocar and 10mm optics with cold light are placed. After abdominal cavity inventory, two more 5mm pelvic punctures were performed in both iliac fossae. The gynecological surgery was

initially scheduled and during the procedure, a superficial cortical biopsy of the ovarian tissue was performed in the operated area, with delicate forceps and scissors without electricity. Each fragment measured ~1cm in length and width and 4mm in depth. After removal from the cavity, the ovarian tissue sample was delivered in physiological solution at room temperature (between 22-24°C) for transport to the laboratory.

Transport and preparation of the ovarian fragment

The ovarian tissue fragment was washed with 0.9% physiological solution under sterile conditions, placed in 50ml plastic tubes containing the same physiological solution and pH 7.4. All transport (20-30min) was performed at room temperature, and the tube was placed in a Styrofoam carton to transport to the ICBS embryology and histology laboratory on very hot or very cold days (Bos-Mikich et al., 2012). Each fragment of ovarian tissue was sectioned with a scalpel blade 22 aiming at minimal manipulation of the fragments during the procedure. Firstly, strips of about 1cm of the entire length of the fragment were made and afterwards, each strip was sectioned into several smaller fragments measuring 2mm x 3mm x 1-2mm (Ferreira et al., 2010; Suzuki et al., 2015; Haino et al., 2018), one of them deposited in paraformaldehyde for morphological evaluation of primordial, primary and secondary follicles.

Slow Freezing and thawing Technique

The small fragments of ovarian tissue were placed in 50 ml plastic tubes containing 30 ml equilibration solution of 0.1 mol/L sucrose and 1.5 mol/L ethylene glycol

(EG) in buffered saline solution (PBS) for 30 min on a oscillating stirring table at 1°C. The ovarian cortex fragments were placed in 1.8ml cryotubes (Nunc A/S, Denmark), each containing 1ml of cryoprotectant and then cryopreserved using a programmable freezing device (K10, Planner, UK) .The following cooling curve was used: 2°C/min at -9°C, 5min pause, and induction of nucleation with the aid of a cooled caliper. Then, the temperature drop was 0.3°C/min to -40°C and 10°C/min to -140 ° C, when the cryotubes were removed from the machine and they were immersed directly in the LN₂ at -196°C. Finally, the tubes were sealed in canisters and stored in a liquid nitrogen tank.

The samples were thawed in three stages with a duration of 10 min each. The cryotubes containing the frozen tissue were placed in a water bath at 37 ° C. When the solution became liquid, the cortical tissue was withdrawn and placed in the first thawing medium (0.75 mol/L ethylene glycol and 0.25 mol/L sucrose in PBS, and transported to the second thawing medium with sterile brushes (0.25 mol/L sucrose in PBS) at room temperature. After 10 min, the tissue was transferred to PBS for 10 min (Rosendahl, 2011).

Vitrification and rewarming technique

The previously prepared ovarian tissue fragments were transferred to equilibrium solution (ES) with 7.5% ethylene glycol (EG) and dimethylsulfoxide (DMSO) followed by the vitrification solution (VS) with 15% EG and DMSO, both in HTF medium (Irvine), for 25 and 15 min, respectively. The fragments were carefully transferred from one solution to another with the aid of sterile brushes so as to carry the mi-

nimum of medium in each transfer. Tissue samples were placed in the base of the container. Finally, the system was immersed in LN₂ for storage. Each metal container received from 10 to 12 confirmed fragments of a single ovary. The metal capsule (Patent n^o.: BR 20 2013 019 739-0) was made of stainless steel, with a volume of 1 ml and a height of approximately 2 cm (Aquino et al., 2014).

For rewarming, the metal capsules were withdrawn from the LN₂ and exposed to tap water for opening the cap within 30 seconds. The base of the capsule containing the tissue samples was exposed to the water bath at 37°C for 1 min with the aid of a forceps. The contents were removed from the inside of the capsule and transferred to the first rewarming solution containing 1M sucrose in HTF for 1min followed by the second solution containing 0.5M sucrose for 3 min and the last solution with 0.25M sucrose for 5min. All tissue manipulation was performed with sterile brushes. Finally, the tissue fragments were left in HTF-Hepes medium. All solutions were always kept at room temperature (Aquino et al., 2014). After, they were fixed in paraformaldehyde solution for histology or cultured in incubator with 5% CO₂ atmosphere, at 37°C in HTF medium, for 1h before being submitted to the thermal stress test.

Ovarian Heat Shock Response (HSR) test

Considering the importance of the HSR for tissue/cell stress adaptation and proteostasis, we tested the capacity of ovarian tissue, to increase the expression of HSP70, under heat stress conditions (a normal and expected response in healthy cells). Briefly, the fresh, thawed or devitrified tissues were incubated at two different temperatures: 37°C (control) and 42°C (heat stressed) for 2h in a suitable incubator (5% CO₂- Form Scientific, Marietta, OH, USA). After incubation, the tissue fragments

were homogenized and prepared for total protein quantification and western blot analysis for HSP70.

Protein quantification and western blot for HSP70

Ovarian tissue protein quantification was determined using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) and samples (1 μ g) were mixed with 5x Laemmli's loading buffer [50 mM Tris, 10% SDS, 10% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol and 2 mg/ml bromphenol blue, final concentrations in a ratio of 1:5, boiled for 5min and electrophoresed. For the sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), equivalent amounts of protein (1 μ g) were applied in 10% polyacrylamide minigel, for 2h and 100V. After, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chicago, USA) according to the electrotransfer (Bio-Rad, Hercules, USA) manufacturer's instructions (2h, 100V). For immunoblotting procedures, membranes were blocked in 2% BSA in wash buffer [50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl (TEN)-Tween 20 0.1% solution, pH 7.4] for 30min and after, incubated overnight with Monoclonal Anti-HSP70 antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 1:1.000 dilution. After appropriate wash, membranes were probed with Anti-Mouse IgG, biotin antibody at 1:10.000 dilution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 1h. Afterwards, membranes were incubated with a final Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 1:1.000 dilution for 1h. Visualization of the blots was performed using chemiluminescence reagent p-coumaric acid and luminol, in ImageQuantTM LAS 4000 chemiluminescence system (GE Healthcare, Chicago, USA)

and quantified in ImageJ (version 1.51f; NIH, Maryland City, USA). A standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA) was used as a reference to determine the molecular weights of the bands. The data were normalized using the Ponceau S method (Klein et al., 1995).

Ovarian morphology and evaluation

Ovarian morphology, particularly of the primordial, primary and secondary follicles as well, was evaluated from histological sections of 5 μm thickness stained with hematoxylin and eosin for analysis under light microscope. For histological processing, the thawed or devitrified fragments and controls were placed in 4% paraformaldehyde solution before being dehydrated in increasing sets of ethanol at room temperature. After diaphanization, the ovary fragments were placed in paraffin for histological sections and hematoxylin and eosin stains.

The follicle development stages were classified by the number of layers and the shape of the granulosa cells. The primordial follicles were classified as those containing a single layer of flattened cells and the primary follicles will be those with a single and complete layer of cuboid granulosa cells (Gougeon, 1996). Criteria for considering a primordial or primary follicle as damaged include: presence of vacuoles in the ooplasm, pycnotic germinal vesicle, follicular cells detached from the follicular basement membrane, retraction of the oocyte and incomplete layer of follicular cells surrounding the oocyte. Secondary and antral follicles were not the main focus of our analyzes because they no longer belong to the ovarian reserve, but were described as to their morphology, whenever present in the histological sections. All the analysis performed by the same embryologist.

Statistical analysis and sample size calculation

The sample calculation considered the data obtained in a previous bovine ovarian tissue vitrification study (Aquino, 2014) in which 93% of normal primordial follicles were observed after rewarming and data from the slow freezing cryopreservation program of human ovarian tissue Denmark (Rosendahl et al., 2011) which obtained 68% of morphologically normal primordial follicles after thawing. Using the WINPEPI program, with 80% power and significance level of 5% and considering the difference between the proportions, we obtained the need for 46 primordial follicles in each group and 46 primordial follicles for the control group of evaluation of primordial follicles fresh, with a total of 138 follicles. The average follicle per standard sample is 10 follicles (Rosendahl et al., 2011; Donnez et al., 2013). Thus, 12 to 14 patients were required to complete the study.

Results were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences Program (SPSS v. 20.0) (IBM, Armonk, New York, USA). Categorical variables were described by frequencies and percentages. The asymmetric quantitative variables were described by the median, the minimum and the maximum, and the symmetrical variables were described by the mean and standard deviation, or confidence interval. To compare the number of follicles and the HSP delta at the different temperatures between the groups, the Friedman test was used and the differences were localized by the Wilcoxon test, followed by Bonferroni correction for multiple comparisons. The comparison of the HSP70 expression between groups and temperatures was performed by the Bonferroni Correlation Model of Generalized Estimating Equation Model (GEE), considering that the measurements of the different techniques and temperatures are not independent. To analyze the correlation between quantitative

variables, the Spearman correlation coefficient was used. For the association of categorical variables, the Chi-square test was used. A significance level of 5% was considered for the established comparisons.

Results

Data from 12 patients, whose mean age was 34.6 (± 3.2) years and mean body mass index 27.5 (± 3.1), were analyzed (Table 1). The associated clinical characteristics of the patients were polycystic ovarian (1 patient), endometriosis (2 patients), hipertension (3 patients), tabagism (1 patient) and diabetes (1 patient).

Characteristics	Descriptive Measures
Age, mean \pm standard deviation	34.6 \pm 3.2
Weight, mean \pm standard deviation	73.7 \pm 12.4
Height, mean \pm standard deviation	163.3 \pm 5.2
Body mass index, mean \pm standard deviation	27.5 \pm 3.1
Polycystic ovary, n (%)	1 (8.3)
Endometriosis, n (%)	2 (16.7)
Arterial hypertension, n (%)	3 (25.0)
Tabagism, n (%)	1 (8.3)
Diabetes mellitus, n (%)	2 (16.7)

Table 1 - Descriptive table of sample characteristics

When comparing the median of total, primordial, primary and secondary follicles, intact and damaged follicles among the different groups of ovarian tissue (fresh-control, slow-freezing and vitrification), it was possible to observe statistically significant differences for the good total follicles ($p=0.007$). The fresh ovarian tissue had a higher amount of good total follicles when compared to the total follicles in the groups of ovarian tissue submitted to slow freezing and vitrification. The latter two groups did not differ statistically. Intact primordial follicles also showed a difference between the groups ($p=0.004$), but this difference was found between the slow freezing group and the other two states, which had higher values than slow freezing. In relation to the primary follicles, there was also a difference for the intact ones ($p=0.035$), and the fresh controls had a higher amount than the slow freezing group. However, the vitrification group did not differ significantly from any of the other two groups. These results are presented in Table 2.

	Fresh	Vitrification	Slow freezing	P
Total intact	21 (1 - 330) ^a	11 (0 - 42) ^b	4 (0 - 43) ^b	0.007
Total damaged	2 (0 - 78)	5 (0 - 8)	1 (0 - 16)	0.273
Primordial intact	8 (0 - 298) ^a	4 (0 - 30) ^a	2 (0 - 23) ^b	0.004
Primordial damaged	1 (0 - 59)	2 (0 - 6)	0 (0 - 11)	0.10
Primary intact	6 (0 - 64) ^a	4 (0 - 15) ^{a,b}	2 (0 - 15) ^b	0.035
Primary damaged	1 (0 - 19)	1 (0 - 5)	1 (0 - 5)	0.690
Secondary intact	1 (0 - 8)	0 (0 - 8)	0 (0 - 5)	0.552
Secondary damaged	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	-

Data presented by the median (minimum and maximum) and compared by Friedman test.

a, b: different letters represent different distributions.

Table 2 - Comparative table of the number of follicles in ovarian tissue in the Fresh, Vitrification and Slow Freezing states.

Figures 1 and 2 show representative images of fresh, vitrified-rewarmed and slow frozen-thawed human ovarian tissue samples. Figure 1 A shows a nest of follicles at different developmental stages in fresh tissue. No significant morphological differences were observed when compared with follicles within vitrified-rewarmed fragments (B).

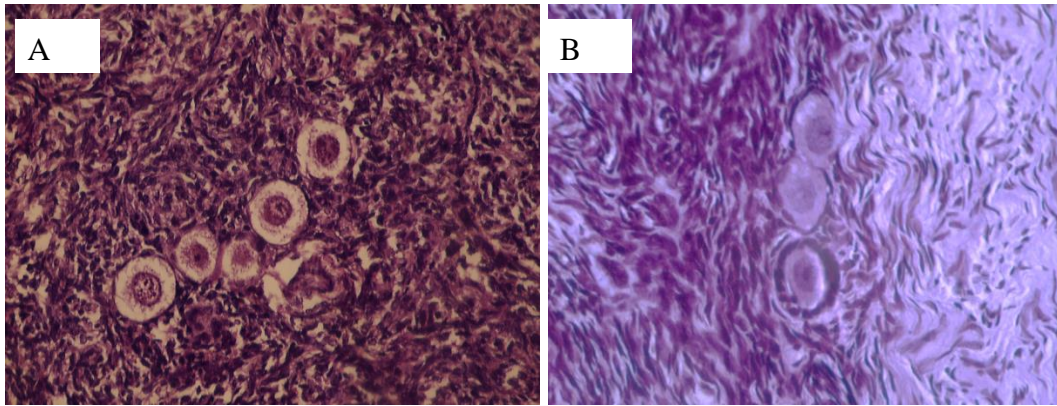


Figure 1- Morphology of primordial and primary follicles within (A) non-vitrified and (B) vitrified human ovarian tissue (X 200).

Figure 2 shows higher magnification of representative intact follicles in fresh (A) and slow frozen-thawed ovarian tissue samples. Note the well preserved oocyte and follicle structures at different developmental stages. Figure 3 shows representative images of damages, such as cytoplasmic vacuoles (A) and retraction (B) in oocytes, after cryopreservation.

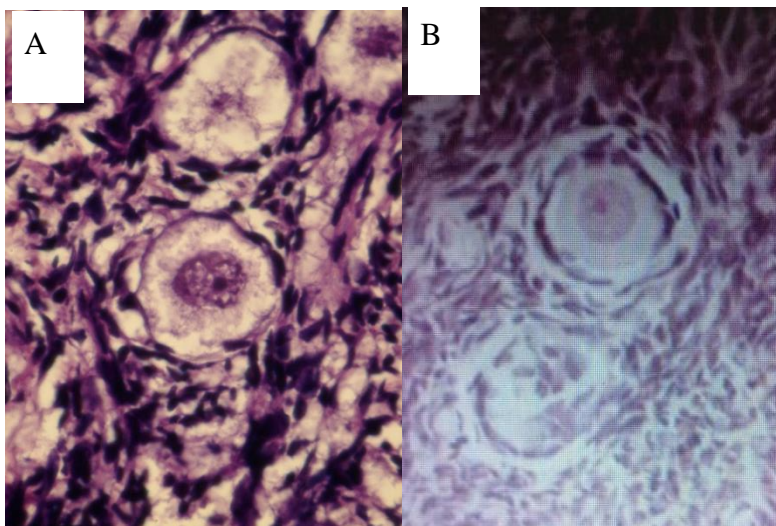


Figure 2 - Morphology of follicles at different developmental stages within (A) fresh and (B) frozen-thawed ovarian tissue (X 400).

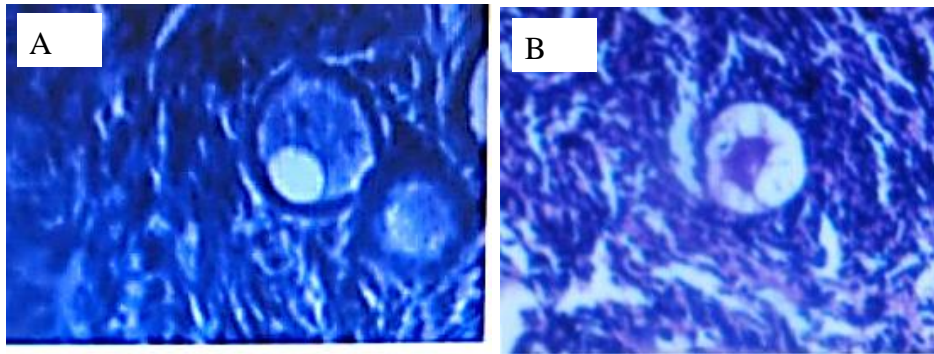


Figure 3- Morphology of damaged (A) vitrified-rewarmed and frozen-thawed (B) follicles within ovarian tissue samples. (X 400).

Table 3 shows the follicle numbers of each type, adding the follicles of all patients. Percentage values of total follicles evaluated, in each group, of the primordial, primary and secondary types are presented. Also the percentage of intact are described. When the frequencies of intact follicles between the groups were compared, there was difference only for the primordial follicles ($p < 0.001$). The difference was found between the fresh group and the slow freezing and vitrification groups, which had a lower percentage of intact primordial follicles. There was no difference for other types of follicles.

	N° Primordial follicles(%)		N° Primary follicles(%)		N° Secondary Follicles(%)		
	Total	Intact	Total	Intact	Total	Intact	
Fresh	984	768 (78.0)	695 (90.5)	186 (18.9)	154 (82.8)	30 (3.1)	30 (100.0)
Vitrification	218	124 (56.9)	98 (79.0)*	78 (35.8)	58 (74.4)	16 (7.3)	16 (100,0)
Slow freezing	134	64 (47.8)	45 (70.3)*	58 (43.3)	45 (77.6)	12 (8.9)	12 (100.0)

Table 3- Descriptive table of follicle frequencies in the Fresh, Vitrification and Slow freezing states.

Table 4 shows the results of HSP70 expression in all conditions. Statistically significant differences were found between temperatures 37 and 42°C in the vitrification group, where there was an average of 0.970 (arbitrary units) at 37°C and dropped to 0.449 at 42° C ($p=0.001$). In the other two states this difference was not statistically significant for the fresh group ($p=0.153$) and for the slow freezing group ($p=0.070$). However, when analyzing the delta (difference from 37°C to 42°C), fresh samples clearly increase their HSP70 content, when compared with tissues submitted to both cryopreservation techniques (Figure 4). The median of the difference of HSP between the temperatures for the fresh group was 0.290 (minimum of -1.284 and maximum of 1.278), for the slow freezing group was -0.557 (minimum of -3.400 and maximum of 1.426) and for the vitrification group was -0.636 (minimum of -1.701 and maximum of 0.276), with a statistically significant difference between these deltas ($p=0.018$). The differences found were between the fresh and slow freezing

groups ($p=0.044$) and between fresh and vitrification ($p=0.044$) (Figure 4). However, there was no difference between the slow freezing and vitrification groups ($p=0.937$). When we compared the basal levels of HSP70 (37°C), the fresh ovarian tissue presented the highest content (Table 4) followed by the slow freezing samples and finally the vitrification samples ($p<0.001$). Interestingly, no significant difference was found between the fresh tissue and the tissue recovered from the slow freezing, indicating a better cellular preservation.

After the heat challenge, only the fresh tissue was able to maintain or increase (in most samples) the levels of HSP70 (despite not statistically significant). Both cryopreservation techniques caused a incapacity of the cells to express HSP70 in response to the challenge. However, vitrification reached the lowest levels of expression.

95% confidence interval						
State	Temperature	average	Inferior limit	Upper limit	P temperature	P interaction
Fresh	37°C	2.193	1.487	2.899	0.153	<0.001
	42°C	2.498	1.835	3.161		
Vitrification	37°C	0.970	0.689	1.251	0.001	
	42°C	0.449	0.333	0.565		
Slow freezing	37°C	1.665	0.996	2.334	0.070	
	42°C	1.108	0.825	1.391		

p between 37°C states: p Fresh - slow freezing =0.432; p Fresh - Vitrification **<0.001**; p Slow freezing - Vitrification = 0.082

p between 42°C states: p Fresh - Slow freezing =**0.001**; p Fresh - Vitrification **<0.001**; p Slow freezing - Vitrification **<0.001**

p values obtained from *Generalized Estimating Equation Model (GEE)*

Table 4 - Comparative table of HSP between States and between temperatures

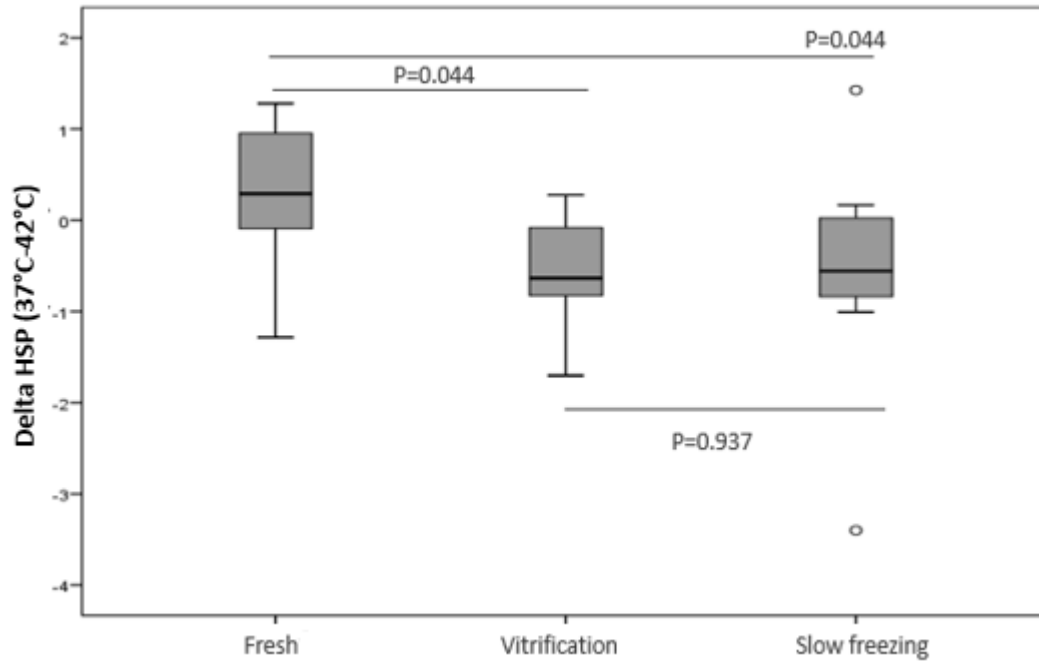


Figure 4 - Graph of the comparison of the Delta between the groups.

In Table 5 histology data were correlated with HSP expression at 37°C and 42°C in the fresh, vitrification and slow freezing groups. There were positive, statistically significant, direct and strong correlations between the number of total and primordial follicles, and expression and HSP at 37°C, in the fresh group. This means that higher levels of basal HSP70 content correlates with higher number of primordial follicles.

		HSP 37°C	HSP a 42°C
Fresh	Primordial (+)	0.722*	0.497
	Primordial (-)	0.733*	0.248
	Primary (+)	0.393	0.102
	Primary (-)	0.019	-0.254
	Secondary (+)	0.269	0.055
	Secondary (-)	-	-
	Total (+)	0,658*	0.413
	Total (-)	0.471	0.032
Vitrification	Primordial (+)	0.127	0.021
	Primordial (-)	0.215	-0.021
	Primary (+)	0.461	-0.201
	Primary (-)	- 0.34	-0.251
	Secondary (+)	0.482	-0.46
	Secondary (-)	-	-
	Total (+)	0.245	-0.144
	Total (-)	0.171	-0.046
Slow freezing	Primordial (+)	- 0.018	-0.082
	Primordial (-)	0.195	0.094
	Primary (+)	0.521	0.169
	Primary (-)	0.050	-0.270
	Secondary (+)	0.244	-0.024
	Secondary (-)	-	-
	Total (+)	0.448	0.039
	Total (-)	0.190	-0.095

r s : Spearman's correlation coefficient *p<0.05

Table 5 - Correlation table of HSP at 37°C and 42°C with histology

There were no statistically significant correlations between the values of body mass index with the results of morphological data or HSP expression. Correlations between morphological data and age were found. Age correlated in a statistically significant, inverse and strong way with the number of secondary follicles in the vitrified technique ($r_s = -0.724$ $p=0.008$), with the number of primordial follicles in the slow freezing technique ($r_s = -0.591$, $p=0.043$) and with total follicles in the slow freezing technique ($r_s = -0.607$, $p=0.036$). Older patients have fewer of these follicles in the cited techniques.

Discussion

Comparative studies between cryopreservation techniques for ovarian tissue still present contradictory results, sometimes with advantages for slow freezing (Dalmann et al., 2017) and other times with promising results for vitrification (Sanfilippo et al., 2015; Fabbri et al., 2016). The divergent results described for vitrification may be connected to the type of material used for storage the samples and the applied protocol.

In vitrification, the cooling rate varies according to the cryopreservation container material used to prevent direct contact of the ovarian tissue with the NL_2 (Gosden et al., 2011). Considering that metal is a much faster heat conductor than plastic, our group developed a metallic container, initially in aluminum foil and later in steel (Bös-Mikich et al., 2013). The use of this device for vitrification, through a bovine experimental model, generated positive results in morphological aspects (Aquino et al., 2014) and post-devitrification biochemical analysis (Massignam et al., 2018).

This steel container complies with “clinical grade” specifications as the capsule allows extremely rapid cooling of biological material and eliminates the possibility of tissue contact with liquid nitrogen, a possible source of contamination. The metal capsule has already been tested for sealing using a dry red powder dye (Sudan) (Aquino et al., 2014). Other metal devices for closed vitrification have been proposed. The titanium device, in a study with monkeys and heterotopic transplantation, resulted in resumption of hormonal cycles (Sugishita et al., 2018). A study with vitrification of human ovarian tissue with silver container, found better morphological and viability results when compared with plastic container (Xiao et al., 2017).

Compared with oocytes and embryos, the structure of human ovarian tissue is more complex, consisting of different types of cells (oocytes, granulosa cells, blood) and fibrous stroma. Maintaining the cryostability of the tissue is challenging. Primordial follicles are an important biomarker for assessing ovarian reserve or the fertility potential of a woman. Moreover, primordial follicles have been found to be more resistant to cryoinjury, and thus, the morphology and integrity of primordial follicles are commonly used to assess ovarian tissues after cryostorage (Hovatta et al., 1996; Zhou et al., 2010). Primordial follicles have time to repair nonlethal damage to organelles and other structures during their prolonged growth phase (Oktay et al., 1998; Shaw et al., 2000). In this study, the morphology of primordial follicles was used to evaluate the efficacy of the cryopreservation techniques. Based on morphological evaluation (table 2), our results demonstrated that the number of normal primordial follicles after rewarming was higher than after thawing, indicating a better preservation of the tissue submitted to vitrification. There are studies with similar primordial follicular density (Herraiz et al., 2014) and studies that found no significant difference between the two techniques evaluated (Oktem O, et al., 2011; Fabbri R, et

al., 2016). In addition, there was no significant difference between normal fresh primordial follicles and intact follicles after rewarming. Also in relation to normal primary follicles, there was no significant difference between the fresh tissue group and the group evaluated after rewarming. Evaluating the percentage values of total follicles, normal primordial follicles after slow freezing/thawing and after vitrification/rewarming were not statistically different, besides a greater percentage in the vitrification group (79% x 70.3%). Our results demonstrated that this vitrification technique preserves follicle as well as slow freezing, reaching superior percentage values compared with study by Klocke S et al., 2015 (66.7% x 72.7%). Our results are in agreement with those obtained by Huang et al., 2008 and Keros et al., 2009 and also according to the study by Amorim et al., 2011 and Sanfillipo e. al., 2015. In a systematic review of twelve comparative studies between the two cryopreservation techniques (Shi Q et al., 2017), it was shown that only two studies indicated that vitrification is associated with a higher proportion of intact primordial follicles compared with slow freezing. In the remaining ten studies, no differences were detected in the number of intact primordial follicles comparing the two methods, corroborating with our results. Other study tested the effect of a metal container for human ovarian tissue vitrification, comparing silver container with plastic container (Xiao et al., 2017). This work have demonstrated that the number of normal primordial follicles in the metal container group was significantly higher than in the plastic container group. However, this study did not compared with slow freezing.

Although follicles may be morphologically intact after cryopreservation, their ability to develop and produce an oocyte to be fertilized, with the ultimate achievement of pregnancy and live birth, may be affected by cryopreservation, regardless of the freezing method (Shi et al., 2017). Several studies compare the two techniques

only with morphological analyzes (Sanfilippo et al., 2015; Dalman A et al., 2017). In our work, we tested the ability of the ovarian cortex tissue (including follicles and stroma) to physiologically respond to a non-lethal stress, through the expression of HSP. The HSPs, particularly HSP70 (the most abundant and expressed protein in all tissues following different types of cellular stressors), is induced by the activation of a molecular pathway known as heat shock response (HSR, please consult Krause M et al, 2015). It is expected that, healthy cells and tissues, respond to heat stress (exposure to high temperatures), by increasing the expression of HSP70 (Muller et al, 2019).

The fresh ovarian tissue, as expected, increased the expression of HSP70 after exposed to 42°C, indicating an adequate physiological state (Fig 4). However, after both, rewarming and thawing, the HSR (thus HSP70 expression) was blunted (Fig 4), indicating a dramatic reduction on the proteostasis machinery. Our results also show that, despite the reduction when compared with fresh tissue, the levels of HSP70 were higher after slow freezing than after vitrification, besides no statistically significant difference were found comparing the Delta of the two groups (Fig 4). This may represent a better cytoprotection in tissues submitted to slow freezing. In fact, in different study, using animal model, HSP70 levels (baseline) were significantly increased only in the slow freezing group of whole sheep ovaries (Maffei et al., 2014), a similar result from the obtained in our study. The positive correlation of the number of normal primordial follicles with HSP70 expression, may indicate that higher HSP70 levels (cytoprotection) is related with higher preservation of primordial follicles.

Studies evaluating functional capacity by quantifying estradiol secretion after culture found no difference between techniques (Klocke S et al., 2015). Comparison

of estradiol secretion after vitrification with plastic or silver container found better indices in this latter group (Xiao et al., 2017).

The correlation of morphological data with HSP expression at both temperatures demonstrated the expected positive, and significant direct and strong correlation between the number of normal primordial follicles and HSP expression.

Different plastic devices have been attempted for ovarian tissue cryopreservation and all of them reported significant losses in primordial follicles pool compared to fresh ovarian tissue (Isachenko et al., 2009; Bagis et al., 2008; Zhou et al., 2010). Our study found that fresh ovarian tissue had better follicular morphology and greater response of HSP to a heat stress compared with both techniques, but no significant difference within the techniques.

The vitrification with the steel container seems to achieve better morphological outcome besides no statistic difference. After both cryopreservation techniques, the ovarian tissue clearly reduce its capacity to respond to heat stress, indicating an inability to react to a stressful event. The levels of HSP70 were different than previous studies that found similar results in native and vitrified/rewarmed samples (Nikishin et al., 2018), however, they only measured basal levels of HSP70, not the response to heat stress. It is important, however, to look at the results of 42°C incubations, with caution. Our samples were submitted to heat stress immediately after rewarming and thawing. Different results may be obtained after prolonged times of recovery after rewarming and thawing. It means that, the two techniques may need different times for full tissue recovery before the heat challenge. This hypotheses is now being tested in our laboratory.

Conclusion

Our results indicate that each cryopreservation technique may present different particular advantages, such as a higher numbers of intact primordial follicles for vitrification (using steel container) and better preserved cytoprotection, for slow freezing. The ovarian HSR test is a potential technique to test the ovarian ability to maintain the homeostasis and resist to the cryopreservation environment but still need standardization, specially testing different tissue recovery time after rewarming and thawing. Finally, our results suggests that the steel container is a promising tool to be used in vitrification, but further investigation on physiological aspects are required.

References

Almodin, CG, Minguetti-Câmara, VC, Meister, H, et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod* 2004;**19**:1287-93

Amorim, CA, Curaba, M, Van Langendonck, A, Dolmans, MM, Donnez, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**:160–186.

Andersen, CY, Bollerup, AC, Kristensen, SG. Defining quality assurance and quality control measures in connection with ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a call to action. *Hum Reprod* 2018;**33**(7):1201–4.

Aquino, D, Danielli, L, Rigon, P, et al. Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. *JBRA Assisted Reproduction* 2014;**18**(1):12-15.

Bagis, H, Akkoc, T, Tass, A, Aktoprakligil, D. Cryogenic effect of antifreeze protein on transgenic mouse ovaries and the production of live offspring by orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries. *Mol Reprod Dev* 2008;**754**:608–613.

Bielanski, A, Nadin-Davis, S, Sapp, T, Lutze-Wallace, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000;**402**:110–116.

Bielanski, A, Bergeron, H, Lau PC, Devenish, J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003;**462**:146–152.

Bos-Mikich, A, Marques, L, Rodrigues, JL, et al. The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation after different times and temperatures of transport. *J assist Reprod Genet* 2012;**29**:1267-71.

Bös-Mikich, A, Aquino, D, Danielli, L, Rigon, PSL, Lothhammer, N, Frantz, N. Metal cryovial: a new, promising system for clinical grade vitrification of ovarian tissue. *Human Reproduction* 2013;**28**(1):112–115.

Chen, SU, Chien, CL, Wu, MY, et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 2006;**21**:2794-800.

Chibeleian, CB, Petca, R-V, Radu DC, Petca, A. State of the Art in Fertility Preservation for Female Patients Prior to Oncologic Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2020; **56**(2):89.

Dalman, A, Farahani, NSDG, Totonchi, M, Pirjani, R, Ebrahimi, B, Valojerdi, MR. Slow freezing versus vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation: An evaluation of histological changes, WNT signaling pathway and apoptotic genes expression. *Cryobiology* 2017;**79**:29–36.

Demeestere, I, Simon, P, Emiliani, S, Delbaere, A, Englert, Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007;**12**:1437–1442.

Donnez, J, Dolmans, MM, Demylle, D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;**364**:1405–1410.

Donnez, J and Dolmans, MM. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. *Clin Obstet Gynecol* 2010;**53**:787–796.

Donnez, J and Dolmans, MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol* 2013;**9**:735–749.

Donnez, J and Dolmans, MM. The ovary: from conception to death. *Fertil Steril* 2017;**108**(4):594–5.

ESHRE Working Group on Oocyte Cryopreservation in Europe, Shenfield, F, de Mouzon, J, Scaravelli, G, Kupka, M, Ferretti, AP, Prados, FJ, et al. Oocyte and ovarian tissue cryopreservation in European countries: statutory background, practice, storage and use. *Hum Reprod Open* 2017. <https://doi.org/10.1093/hropen/hox003>.

Fabbri, R, Vicenti, R, Macciocca, NA et al. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Human Reprod* 2016;**31**(8):1838–49.

Galbinski, S, Bös-Mikich, A, Ferrari, AN. Viabilidade e fertilização in vitro de oócitos bovinos após Vitriificação. *RBGO*. 2003;**25**(8):553-9.

Gosden, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation *Fertil Steril* 2011;**96**:264-8.

Gougeon, A., Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; **7**: 121-55.

Haino, T, Tarumi, W, Kawamura, K, Harada, T, Sugimoto, K, Okamoto, A, Ikegami, M, Suzuki, N. Determination of Follicular Localization in Human Ovarian Cortex for Vitrification. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2018;**7**(1):46-53.

Herraiz, S, Novella-Maestre, E, Rodríguez, B, Díaz, C, Sánchez-Serrano, M, Mirabet, V, Pellicer, A. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril* 2014;**101**(3):775–784.

Hovatta, O, Silye, R, Krausz, T, Abir, R, Margara, R, Trew, G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996;**116**:1268–1272.

Huang, L, Mo, Y, Wang, W, Li, Y, Zhang, Q, Yang, D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;**139**:193–198.

Jensen, AK, Macklon, KT, Fedder, J, Ernst, E, Humaidan, P, Anderson, CY, et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:325–336.

Klein, RM, Kern, RZ, Sokol, D. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1995;**36**:59-66.

Klocke, S, Bündgen, N, Köster, F, Eichenlaub-Ritter, U, Griesinger, G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2014;**291**(2):419–426.

Klocke, S, Bundgen, N, Koster, F, Eichenlaub-Ritter, U, Griesinger, G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 2015;**2912**:419–426.

Krause, MS, et al., MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? *Cell Biochem Funct* 2007;**25**(1):23-32.

Krause, M, et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediat Inflamm* 2015; 249205.

Madden, LA, Sandström, ME, Lovell, RJ,McNaughton, L. Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. *Amino Acids*. 2007;**34**(4):511–516.

Maffei, S, Pennarossa, G, Brevini, TAL, et al. Beneficial effect of directional freezing on in vitro viability of cryopreserved sheep whole ovaries and ovarian cortical slices. *Human Reprod* 2014;**29**(1):114–24.

Massignam, ET, Ferreira, M, Sanguinet, E, Dupont, A, Klamt, F, Frantz, N, Bos-Mikich, A. Antioxidant defence capacity of ovarian tissue after vitrification in a metal closed system. *JBRA Assist Reprod* 2018;**22**(3):199–204.

Muller, CC de L. et al. Heat-induced extracellular HSP72 release is blunted in elderly diabetic people compared with healthy middle-aged and older adults, but it is partially restored by resistance training. *Experimental Gerontology* 2018;**111**:180-187.

Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;**247**:125-42.

Meirow, D, Levron, J, Eldar-Geva, T. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl.J. Med* 2005;**353**:318–321.

Nikishin, DA, Filatov, MA, Kiseleva, MV, Bagaeva, TS, Konduktorova, VV, Khramova, YV, Semenova, ML. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2018;**35**(10):1851-1860.

Noble, E.G., Milne, K.J., Melling, C.W. Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;**33**(5):1050–1065.

Oktay, K, Newton, H, Aubart, Y, Salha, O, Gosden, RG. Cryopreservation of immature human oocyte and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998;**69**:1-7.

Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;**342**(25):1919.

Oktay, K, Bedoschi, G, Pacheco, F, Turan, V, & Emirdar, V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *Am J Obstet Gynecol* 2016;**214**(1):94.e1-94.e9.

Oktem, O, Alper, E, Balaban, B, Palaoglu, E, Peker, K, Karakaya, C, Urman, B. Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries. *Fertil Steril* 2011;**95**:2661–4.e1.

Rall, W.F. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos. *Cryobiology* 1987;**24**:387-402.

Rosendahl, M, Schmidt, KT, Ernst, E, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. *RBMOnline* 2011;**22**(2):162-171.

Sanada, Y, Harada, M, Kunitomi, C, Kanatani, M, Izumi, G, Hirata, T, et al., A Japanese nationwide survey on the cryopreservation of embryos, oocytes and ovarian tissue for cancer patients. *J Obstet Gynaecol Res* 2019;**45**(10):2021-2028.

Shaw, J, Oranratnachai, A, Trounson, A. Fundamental cryobiology of mammalian oocyte and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000;**53**:59-72.

Shi, Q, Xie, Y, Wang, Y, Li, S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2017;**7**(1):8538.

Sheikhi, M, Hultenby, K, Niklasson, B, et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reprod* 2011;**26**:594-603

Silber, S. How ovarian transplantation works and how resting follicle recruitment occurs: A review of results reported from one center. *Women's Health Lond* 2016;**12**:217–227.

Suzuki, N, Yoshioka, N, Takae, S, Sugishita, Y, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency *Human Reproduction* 2015;**30**(3):608–615.

Takae, S, Lee, JR, Mahajan, N, Wiweko, B, et al., Fertility Preservation for Child and Adolescent Cancer Patients in Asian Countries *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:655.

Takae, S and Suzuki, N. Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reprod Med Biol* 2019;**18**(3):217–224.

Tammiste, T, Kask, K, Padrik, P, Idla, K, Rosenstein, K, Jatsenko, T, Veerus, P, Salumets, A. A case report and follow-up of the first live birth after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue in Eastern Europe. *BMC Women's Health* 2019;**19**:65.

von Wolff M, Andersen CY, Woodruff TK, Nawroth F. FertiPROTEKT, oncofertility consortium and the danish fertility-preservation networks - what can we learn from their experiences? *Clin Med Insights Reprod Health* 2019;**13**:1179558119845865.

Xiao, Z, Zhang, Y and Fan, W. Cryopreservation of human ovarian tissue using the silver closed vitrification system. *J Assist Reprod Genet.* 2017;**34**(11):1435–1444.

Zhou, XH, Wu, YJ, Shi, J, Xia, YX, Zheng, SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* 2010;**60**:101-105.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados morfológicos e histológicos obtidos indicam pouco comprometimento dos folículos pelas técnicas de criopreservação, com resultados similares e com maior percentagem de folículos primordiais normais após reaquecimento quando comparados com folículos descongelados. É um indicativo do potencial da técnica proposta.

A expressão de HSP70 ao estímulo térmico foi adequada no grupo controle de ovários frescos. Entretanto, a resposta fisiológica de tecido ovariano criopreservado, avaliada pela quantificação de imunocontéudo de HSP70 a 37°C é prejudicada pelas duas técnicas de criopreservação de tecido ovariano, mas o grupo submetido a congelamento lento aparentemente preserva mais a capacidade de expressão de HSP70. Nos dois grupos, quando submetidos a indução de estresse por calor a 42°C durante 2h, o imunocontéudo encontra-se claramente reduzido, indicando incapacidade de responderem a um evento estressante.

Possivelmente esse resultado pode ser atribuído a algum evento que impossibilitou as HSP do tecido ovariano submetido a criopreservação de responder adequadamente ao estresse induzido por calor a 42°C, levando a morte do tecido e conseqüentemente ao imunocontéudo diminuído. Talvez as células do tecido ovariano submetido a criopreservação, notadamente quando submetido a vitrificação, necessitem de tempo maior em meio de cultura a 37°C após o descongelamento ou reaquecimento para recuperarem as características fisiológicas normais. Outra possibilidade, pode ser o tamanho padrão dos fragmentos ter prejudicado a resposta fisiológica ao estresse térmico.

Como a avaliação da resposta fisiológica não foi de acordo com a avaliação morfo-histológica, é possível que a técnica de indução de estresse térmico e quantificação de HSP deva ser analisada ou substituída futuramente.

PERSPECTIVAS

A criopreservação de tecido ovariano vem sendo agregada ao arsenal terapêutico, notadamente em pacientes jovens submetidas a tratamento oncológico, tendo em vista a preservação da fertilidade futura. Da mesma forma que a vitrificação se consagrou como técnica majoritária para criopreservação de gametas e de embriões humanos, podemos vislumbrar a partir desse trabalho, seu potencial para criopreservação de tecido ovariano humano. Os resultados morfológicos demonstram resultados similares para ambas técnicas, com vantagens para vitrificação. A cápsula metálica demonstrou sua eficácia do ponto de vista morfológico. A possibilidade de uma técnica reproduzível e de baixo custo tende a instigar os pesquisadores no sentido de adaptar a vitrificação para uso em criopreservação de tecido ovariano.

O grupo pretende seguir com a linha de pesquisa, inicialmente testando novos tempos na quantificação das HSPs, partindo de um tempo de repouso em meio de cultura após o retorno a temperatura fisiológica. Simultaneamente, entendemos necessário avaliar o potencial fisiológico dos fragmentos de tecido ovariano descongelados ou reaquecidos, por outro método.

A partir da efetiva comprovação da capacidade fisiológica pós reaquecimento, pretendemos utilizar a técnica de vitrificação com capsula metálica para desenvolver um Banco de Tecido Ovariano Humano em nosso meio.

ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa de doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) a ser realizado no Hospital Fêmeina, do Grupo Hospitalar Conceição (GHC), intitulado: “Análises fisiológicas e morfológicas comparativas entre o congelamento lento e a vitrificação para criopreservação de tecido ovariano humano”.

Os remédios para tratar o cancer (quimioterapia) e os tratamentos com radiação para o cancer (radioterapia) podem causar danos aos ovários das mulheres ou meninas, impedindo que elas engravidem no futuro. Sua participação neste projeto poderá ajudar a buscar soluções para preservar o tecido do ovário de mulheres com câncer que necessitem quimioterapia ou radioterapia para que no futuro, quando curadas, possam tentar engravidar com seu ovário guardado num Banco de Tecido Ovariano Congelado. Vamos comparar duas técnicas de congelamento. A primeira técnica é o congelamento lento que já é utilizado em alguns países e exige equipamento caro. A outra técnica é a vitrificação, mais rápida e simples e que não necessita de equipamentos caros.

Caso você aceite participar, num primeiro momento, teremos que fazer uma entrevista de 15 a 20 minutos na sua próxima consulta aqui mesmo no ambulatório do Hospital Fêmeina. Em um segundo momento, durante a cirurgia de ovário já indicada pelo seu médico, retiraremos um pequeno pedaço de apenas 1 centímetro da parte dos seus ovários que estará sendo operada na cirurgia. Esta pequena retirada

não aumenta os riscos da cirurgia, não muda o funcionamento do ovário e não aumenta o tempo de cirurgia em mais do que 5 minutos. O sangramento é pequeno e coagula com aplicação do cauterio (aparelho elétrico para estancar sangramento). Como você já estará anestesiada, não sentirá dor. Isso não tem risco de aumentar a dor depois da cirurgia. O pequeno pedaço do ovário será congelado pelas duas técnicas: congelamento lento e vitrificação. Depois de descongelado, será avaliado e comparado em relação ao seu formato e com teste que verifica se sobrevive a uma temperatura alta. O pedacinho retirado do ovário não vai ser usado para gerar nenhum tipo de gravidez (não será fertilizado) e será destruído após a pesquisa. Nenhum material vai ficar guardado depois da pesquisa.

Os pesquisadores assinaram o termo de compromisso quanto ao sigilo e privacidade para utilização de dados segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 466/2012.

Eu, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informada:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
- De que minha participação é involuntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento na instituição;

- Da garantia que não serei identificada quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa;
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com os pesquisadores: Sérgio Galbinski (sgalbinski@gmail.com) e Andréa Prestes Nácul (andreanacul@gmail.com), pelo telefone 33145223 de segunda a sexta feira das 08h às 12h ou diretamente na Sala 304 do Hospital Fêmina (Av. Mostardeiro, 17 - Porto Alegre).
- Também que, se houver dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-Geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3352407, endereço Av. Francisco Trein 596, 3o andar, bloco H, sala 11, das 09h às 12h e das 14h:30min às 17h;

Declaro que recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com os pesquisadores.

Porto Alegre ____ de _____ de 2017.

Nome do participante

Assinatura

Nome do pesquisador

Assinatura

Anexo 2: Instrumento de Pesquisa e Coleta de Dados

Número:Data:.....Idade:.....Peso:.....IMC:.....

HAS....DM....TIR...ENDOMETRIOSE...SOP.....SOROL.....

Indicação do procedimento:.....

fase 1: Biópsia – dimensões:.....Numero de fragmentos:.....

fase 2: Transporte - horário saída:.....temperatura inicial:..... tempo total:.....

Horário chegada:.....temperatura chegada:.....

fase 3: Análise morfológica e histológica do tecido fresco:

Análise histológica tecido fresco:

Num. folículos primordiais : N bons/N danificados:.....

Num. folículos primários: N bons/N danificados:.....

Num. folículos secundários: N bons/N danificados:.....

Estroma:.....

fase 4: Quantificação de HSP frescos:.....

fase 5: Congelamento lento: número de fragmentos congelados:.....

descongelamento: data:.....hora inicio:..... hora final.....

Num. folículos primordiais : N bons/N danificados:.....

Num. folículos primários: N bons/N danificados:.....

Num. folículos secundários: N bons/N danificados:.....

Estroma:.....

fase 6: Quantificação de HSP 1h pós descongelamento, a 37°C:.....

fase 7: Quantificação de HSP após 5min a 42°C:.....

fase 8: Vitrificação: numero de fragmentos vitrificados:.....

Reaquecimento: data: hora início:..... hora final:.....

Num. folículos primordiais : N bons/N danificados:.....

Num. folículos primários: N bons/N danificados:.....

Num. folículos secundários: N bons/N danificados:.....

Estroma:.....

Fase 9: Quantificação de HSP 1h pós desvitrificação, a 37°C:.....

Fase 10: Quantificação de HSP após 5min a 42°C:.....