

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente
Área de Oncologia

**PRESERVAÇÃO DE FERTILIDADE: CULTIVO DE
FOLÍCULOS OVARIANOS E NOVO DISPOSITIVO PARA
CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL**

Pós-Graduando: Vera Lucia Lângaro Amaral
Nível: Doutorado

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo
2023

**PRESERVAÇÃO DE FERTILIDADE: CULTIVO DE
FOLÍCULOS OVARIANOS E NOVO DISPOSITIVO PARA
CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL**

VERA LUCIA LÂNGARO AMARAL

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2023

Ficha Catalográfica

Amaral, Vera Lúcia Lângaro.

Preservação de Fertilidade: Cultivo de folículos ovarianos e novo dispositivo para criopreservação seminal. / Vera Lúcia Lângaro Amaral. São Paulo, 2023.

86f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Tiago Góss dos Santos.

1. Lisado de plaquetas, 2. Oncofertilidade, 3. Criopreservação seminal

CDU 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vera Lúcia Lângaro Amaral

Título: PRESERVAÇÃO DE FERTILIDADE: CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS
E NOVO DISPOSITIVO PARA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

Aprovado em: 20/01/ 2023

Banca Examinadora

Orientador: Tiago Góss dos Santos

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. Glauco Baiocchi Neto

Instituição: Fundação Antônio Prudente/SP

Membro da banca: Dr. Ciro Dresch Martinhago

Instituição: Chromosome Medicina Genômica/SP

Membro da banca: Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Instituição: Universidade de Caxias do Sul/RS

Membro da banca: Dra. Eleonora Bedin Pasqualotto

Instituição: Universidade de Caxias do Sul/RS

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Partes desta pesquisa recebeu apoio do Programa de Bolsas de Pesquisas UNIEDU – Art. 170 do Governo do Estado de Santa Catarina e Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, Edital 01/2021 assinado em 1º de abril de 2021.

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese se concretizasse.

As instituições A.C.Camargo Câncer Center e a UNIVALI que juntas proporcionaram esta oportunidade de concluir esta etapa da minha vida acadêmica.

Ao meu orientador Tiago Góss dos Santos por toda orientação, força e dedicação ao longo desta trajetória.

Ao meu amigo e parceiro científico Marcel Frajblat pelo incentivo permanente e carinho.

Ao meu grande amigo e guru Alfred Senn, que me conduziu e apoiou sempre com sua infinita sabedoria e calma.

A Crislaine (Criovita) pela colaboração técnica e contribuição para os resultados deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, pela amizade e força dada durante todos estes anos de estudo.

Aos meus alunos, que com dedicação contribuíram e fizeram parte deste estudo.

Em especial agradeço a Deus pela minha família que com todo o amor e paciência estiveram ao meu lado ao longo de todos estes anos e são o alicerce para que eu consiga vencer os desafios e conquistar meus objetivos.

RESUMO

Amaral, Vera Lucia Lângaro. **Preservação de fertilidade:** cultivo de folículos ovarianos e novo dispositivo para criopreservação seminal. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUÇÃO: A oncofertilidade tem o desafio de buscar estratégias para preservar a função reprodutiva. Este estudo explorou duas possibilidades como implementação para as técnicas de preservação da fertilidade feminina e masculina. **OBJETIVO:** Analisar a eficiência do cultivo de folículos pré-antrais de camundongos suplementado com lisado de plaquetas humanas e desenvolver um protótipo para criopreservação de sêmen humano. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os folículos pré-antrais foram isolados mecanicamente de ovários de fêmeas de camundongos e foram cultivados individualmente em sistema entre camadas de óleo mineral. Os folículos foram cultivados divididos em 4 grupos, sendo um controle, sem o uso do lisado de plaquetas e três grupos com diferentes concentrações de lisado de plaquetas humanas (PLTMax®). Foram avaliadas a sobrevivência celular, desenvolvimento folicular e características oocitárias. Para o segundo estudo foi desenvolvido e impresso em 3D com filamentos de acrilonitrilo butadieno-estireno (ABS) um protótipo que suporte 10 palhetas com amostras seminais no vapor de nitrogênio líquido (N₂L), etapa essencial para criopreservação de sêmen humano. Para os testes foram utilizadas 40 amostras seminais. A temperatura ambiente e no interior das palhetas de envase das amostras foram medidas e estabelecida a curva de resfriamento. Os parâmetros de motilidade, vitalidade e fragmentação do DNA espermático foram avaliados antes do congelamento e após o descongelamento. Foram realizados dois testes, um de posicionamento das palhetas e outro comparativo entre o protótipo e um dispositivo com suporte em poliestireno expandido (EPS). **RESULTADOS:** O cultivo de 11 dias induziu um aumento no tamanho folicular em todas as condições, sendo maior no grupo controle, seguido do grupo com 10% de PLTMax®, mas com diferença significativa ($p < 0,001$). O grupo controle apresentou maior número de oócitos intactos (>50%) em relação aos demais (<35%). Todos os 4 grupos apresentaram taxas de vitalidade celular acima de 70%. Quanto aos testes com o protótipo em ABS foi verificado que as curvas de refrigeração foram notavelmente reproduzíveis. O material do protótipo resistiu a inúmeros mergulhos (>300) no N₂L, sem demonstrar danos ao material. Diferenças significativas ($p < 0,001$) foram observadas para a taxa de recuperação média da motilidade e vitalidade espermática em relação aos dados da amostra

fresca em ambos os testes. A motilidade, a vitalidade e a fragmentação do DNA espermático antes do congelamento e após o descongelamento não mostraram diferenças em relação a posição das palhetas. Também não houve diferença quanto ao índice de fragmentação verificada das amostras criopreservadas com uso do protótipo em ABS e o suporte em EPS, mesmo após o cultivo, após 24 horas de cultivo. Contudo, houve diferença em relação a amostra fresca ($p < 0,001$). Quanto a recuperação das taxas de motilidade e vitalidade não houve diferença entre o ABS e EPS após o descongelamento e 24 horas de cultivo. **CONCLUSÃO:** O PLTMax®, embora tenha apresentado menor desempenho que o HSA, é um candidato de suplementação para o cultivo de folículos pré-antrais que merece ser mais explorado. O protótipo em ABS demonstrou resistência, praticidade e segurança para criopreservação seminal de forma reprodutível e eficiente.

PALAVRAS-CHAVE: Lisado de plaquetas. Criopreservação. Câncer. Fertilidade. Espermatozoides. Folículos.

ABSTRACT

Amaral, Vera Lucia Lângaro. **Fertility preservation: ovarian follicle culture and a new device for seminal cryopreservation.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUCTION: Oncofertility has the challenge of seeking strategies to preserve reproductive function. This study explored two possibilities as implementations for female and male fertility preservation techniques. **PURPOSE:** To analyze the efficiency of mouse preantral follicle culture supplemented with human platelet lysate and to develop a prototype for human semen cryopreservation. **MATERIAL AND METHODS:** Preantral follicles were mechanically isolated from female mouse ovaries and were individually cultured using a mineral oil interlayer system. The follicles were cultured divided into 4 groups, one control, without the use of platelet lysate and three groups with different concentrations of human platelet lysate (PLTMax®). Cell survival, follicular development and oocyte characteristics were evaluated. For the second study, a prototype was developed and printed in 3D with acrylonitrile butadiene styrene (ABS) filaments to support 10 straws with seminal samples in liquid nitrogen (N₂L) vapor, an essential step for human semen cryopreservation. For the tests 40 seminal samples were used. Ambient and internal temperatures inside the sample straws were measured and the cooling curve was established. The parameters of motility, vitality and sperm DNA fragmentation were evaluated before freezing and after thawing. Two tests were performed, one for positioning the straws and the other comparing the prototype and a device with expanded polystyrene (EPS) support. **RESULTS:** The 11-day culture induced an increase in follicular size in all conditions, being higher in the control group followed by the group with 10% PLTMax®, but with significant difference ($p < 0.001$). The control group presented a higher number of intact oocytes (>50%) compared to the others (<35%). All 4 groups presented cell vitality rates above 70%. As for the ABS prototype tests, it was verified that the cooling curves were remarkably reproducible. The prototype withstood numerous dips (>300) in N₂L without showing damage to the material. Significant differences ($p < 0.001$) were observed for the mean recovery rate of sperm motility and vitality compared to the fresh sample data in both tests. Motility, vitality and sperm DNA fragmentation before freezing and after thawing showed no differences with respect to the position of the straws. There was also no difference in the fragmentation index verified for samples cryopreserved using the ABS prototype and the EPS support, even after 24 hours of culture. However, there was a difference compared to the fresh

sample ($p < 0.001$). As for the recovery of motility and vitality rates there was no difference between ABS and EPS after thawing and 24 hours of culture. **CONCLUSION:** PLTMax®, although it showed lower performance than HSA, is a supplementation candidate for preantral follicle culture that deserves further exploration. The ABS prototype demonstrated strength, practicality and safety for seminal cryopreservation in a reproducible and efficient manner.

KEY WORDS: Platelet lysate. Cryopreservation. Cancer. Fertility. Spermatozoa. Ovarian follicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Migração das células germinativas primordiais para as cristas genitais.....	3
Figura 2 - Etapas do desenvolvimento folicular (foliculogênese).....	4
Figura 3 - Criopreservação seminal em vapor de N ₂ L com uso de “barco” de isopor improvisado.....	13
Figura 4 - Sistema de cultura. A: Placa de cultura de 96 poços. B: Montagem da composição do cultivo no poço da placa, DMEM:F12 meio de cultura entre duas camadas de óleo de 20 µL (camada inferior) e 80 µL (camada superior). C: Aditivos proteicos ao meio de cultura para os grupos G1, G2, G3 e G4.....	20
Figura 5 - Exemplos de folículos recuperados e selecionados para o cultivo, após dissecação dos ovários de camundongos pré-púberes. Os círculos amarelos correspondem às áreas (expressas em µ ²) calculadas por ImageJ. Fotomicrografia obtida por microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x).....	22
Figura 6 - Exemplos de folículos após 11 dias de cultivo e 16-18h horas após a indução do hCG. A: folículo mostrando crescimento folicular, B: folículos atresícos. Fotomicrografia obtida por microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x).....	23
Figura 7 - Oócitos avaliados como intacto (A) e atresíco (B) após 11 dias de cultivo de folículos ovarianos murinos isolados. Fotomicrografia obtida por microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x).....	23
Figura 8 - Boxplot das superfícies foliculares em µm ² entre o início (D1) e o final da cultura (D11) nas 4 condições testadas (G1: HSA 10% + ITS 1%, G2: PLTM 10% + ITS 1%, G3: HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%, G4: HSA 5% + ITS 5% + PLTM 5%). Comparação estatística por ANOVA e testes post hoc.....	24
Figura 9 - Distribuição de oócitos intactos e degenerados recuperados dos grupos (G1: HSA 10% + ITS 1%, G2: PLTM 10% + ITS 1%, G3: HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%, G4: HSA 5% + ITSS 5% + PLTM 5%).....	25
Figura 10 - Vitalidade celular (%) dos folículos no final do período de cultura nas quatro condições testadas (G1: HSA 10% + ITS 1%, G2: PLTM 10% + ITS 1%, G3: HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%, G4: HSA 5% + ITSS 5% + PLTM 5%). Comparação estatística por (χ^2 (N=2958,3) = 19,1, p<0,01).....	26
Figura 11 - Protótipos desenvolvidos e reprovados em testes de manuseio e segurança e flutuação no N ₂ L.....	31
Figura 12 - A: Croqui do suporte de palhetas para criopreservação seminal, B: Projeção tridimensional do protótipo e C: Protótipo impresso com ABS em 3D, vista de cima do suporte de palhetas, consistindo num paralelepípedo vazio que fica sobre uma base	

flutuante. As reentrâncias permitem que 10 palhetas sejam colocadas horizontalmente e de forma estável.....	32
Figura 13 - Fotomicrografia obtida em Microscópio Olympus CKX41 (400X) de espermatozoides após realização do teste SCD. A – halo grande; B – halo médio; C – halo pequeno; D – halo ausente; E – degradado e halo ausente.....	34
Figura 14 - Fluxograma das etapas experimentais para o teste de posicionamento das palhetas no suporte. Cada amostra foi tratada separadamente.....	35
Figura 15 - Dispositivo confeccionado manualmente em poliestireno expandido (EPS) utilizado como suporte de palhetas com amostras seminais para flutuação em vapor de N ₂ L durante a criopreservação. Vista lateral em A e superior em B.....	36
Figura 16 - Fluxograma das etapas experimentais para o teste comparativo da criopreservação de amostra seminais distribuídas entre o Protótipo em ABS e o suporte em EPS.....	37
Figura 17 – As temperaturas foram registradas a cada minuto usando dois termopares (Akzo Instrumentos, Brasil), um inserido em uma palha de controle, na posição 5 do protótipo, e o segundo no ar ambiente. Três períodos de resfriamento foram monitorados: 1) por 20 minutos em um refrigerador, 2) por dez minutos em uma bandeja de poliestireno expandido contendo N ₂ L, com o suporte em modo de flutuação, 3) por um período variável em N ₂ L com as palhetas liberadas do protótipo.....	40
Figura 18 - Imagens microscópicas (400x) dos halos que representam o DNA espermático por meio do teste de dispersão da cromatina espermática (SCD). A: espermatozoides sem fragmentação de DNA, B: espermatozoides com fragmentação de DNA. Fotomicrografia obtida em Microscópio Olympus CKX41 (400X).....	43
Figura 19 - Boxplot da motilidade do sêmen fresco, descongelado e após 24h de cultivo à 37°C, com o uso do suporte em EPS e o protótipo ABS e taxas de recuperação (R). * O sêmen fresco é significativamente (p<0,001) diferente dos demais grupos. ** diferença significativa (<0,001) após descongelamento e 24hs de cultivo. Análise pelo test-t de amostras pareadas.....	44
Figura 20 – Boxplot da vitalidade do sêmen fresco, descongelado e após 24h de cultivo à 37°C, com o uso do suporte em EPS e o protótipo ABS e taxas de recuperação (R). * O sêmen fresco é significativamente (p<0,001) diferente dos demais grupos. ** diferença significativa (<0,001) após descongelamento e 24hs de cultivo. Análise pelo test-t de amostras pareadas.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de diferentes metodologias de criopreservação seminal usando a etapa de vapor de N ₂ L.....	16
Tabela 2 – Superfícies foliculares iniciais e finais nos 4 grupos de estudo. N representa o número de folículos obtidos em 3 experimentos, nos quais as 4 condições foram testadas em paralelo.....	25
Tabela 3 - Valores (média ± desvio padrão) dos principais parâmetros seminais iniciais das amostras (N=20) usadas para o teste de posicionamento das palhetas).....	38
Tabela 4 - Valores (média ± desvio padrão) de motilidade progressiva, não progressiva, formas imóveis, vitalidade e fragmentação pré- congelamento e pós- descongelamento..	41
Tabela 5.A - Motilidade total e vitalidade pré-congelamento e pós-descongelamento em relação à posição das palhetas (1,5 e 10) no protótipo e taxas de recuperação (R). Os valores são médias ± desvios padrão.....	41
Tabela 5.B. - Taxas de recuperação (R) da motilidade e da vitalidade usando resultados de todas as palhetas congeladas com o protótipo. Os valores são médias ± desvios padrão	
Tabela 6 - Valores (média ± desvio padrão) dos principais parâmetros seminais iniciais das amostras (N=20) usadas para o teste comparativo entre o protótipo em ABS e o suporte em EPS.....	42
Tabela 7 - Índice de fragmentação espermático (IDF) após o descongelamento e 24h de cultivo. Letras iguais são usadas para identificar diferenças estatísticas significantes com o test-t de amostras pareadas.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina sérica bovina
CPAs	Crioprotetores
CGP	Células Germinativas Primitivas
DMEM:F12	Modified Eagle's Medium:Nutrient Mixture Ham F-12
eCG	Gonadotropina coriônica equina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROS	Espécies reativas ao oxigênio
FCs	Fatores de crescimento
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
Gy	Gray (unidade de radiação ionizante absorvida)
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hLP	Lisado de plaquetas humanas
HSA	Albumina sérica humana
IDF	Índice de fragmentação de DNA
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
ITS	Insulina-transferrina-selênio
LH	Hormônio luteinizante
LP	Lisado de plaquetas
N₂L	Nitrogênio líquido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRP	Plasma rico em plaquetas
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
RHA	Reprodução Humana assistida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Câncer e a Fertilidade	1
1.2 O Impacto da Quimioterapia e Radioterapia Sobre os Ovários	2
1.3 O Impacto da Quimioterapia e Radioterapia Sobre os Testículos.....	5
1.4 Oncofertilidade	7
1.5 Cultivo de Folículos Ovarianos Isolados	9
1.6 Criopreservação Seminal	12
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO 1	19
3 CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS ISOLADOS DE CAMUNDONGO SUPLEMENTADO COM LISADO DE PLAQUETAS	19
3.1 Materiais e Métodos	19
3.2 Resultados	22
3.3 Discussão	26
CAPÍTULO 2	30
4 PROTÓTIPO PARA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL	30
4.1 Materiais e Métodos	30
4.2 Resultados	38
4.3 Discussão	45
5 CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	66
Apêndice 1 - Questionário realizado com embriologistas via on-line	66
Apêndice 2 – Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVALI.....	67
Apêndice 3 – Parecer Consubstanciado do CEP	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial e é esperado 28,4 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2040, um aumento de 47% em relação a 2020 (Sung et al. 2021). Contudo, o diagnóstico precoce e os avanços contínuos no tratamento do câncer aumentaram significativamente, assim como as taxas de sobrevivência de pacientes (Bojic et al. 2021). A sobrevida está em torno de 80% para vários tipos de câncer, em particular para pacientes jovens (Rodriguez-Wallber e Oktay 2014).

Os tratamentos oncológicos cirúrgicos, quimioterápicos e/ou o uso de radiação podem afetar a fertilidade de homens e mulheres, assim como o próprio câncer pode prejudicar a funcionalidade das gônadas (Gonçalves e Quinn 2022).

A preocupação com a fertilidade de pacientes oncológicos é um assunto emergente e a criopreservação de gametas é uma opção comumente utilizada para preservar a fertilidade futura. Neste contexto, esta tese mostra um estudo da viabilidade do cultivo de folículos pré-antrais de camundongos suplementado com lisado de plaquetas humanas e o desenvolvimento de um protótipo para criopreservação seminal.

Para melhor organização do texto, optamos por apresentar a introdução subdividida em tópicos gerais e específicos de forma distinta para os gametas. Após a introdução, a tese será apresentada em dois capítulos, sendo o primeiro abordando um experimento voltado para preservação de gametas femininos e o segundo capítulo para preservação de gametas masculinos.

1.1 O Câncer e a Fertilidade

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Os tipos que acometem o pulmão, fígado, estômago, mama e cólon são as cinco principais causas de morte relacionada ao câncer (Cao et al. 2021). Contudo, os tratamentos com cirurgia oncológica, quimioterapia e radioterapia têm melhorado as taxas de cura total ou parcial e aumentado significativamente a sobrevida dos pacientes. Entretanto, estes tratamentos são agressivos, especialmente para jovens e adultos em idade reprodutiva, porque possuem ação citotóxica nos ovários e testículos e apresentam alto risco para a função gonadal (Almodin et al. 2004; Donnez et al. 2013).

Uma das possíveis consequências após tratamentos oncológicos, é a falência gonadal que está associada a fatores como a idade em que se iniciou o tratamento, doses administradas,

via de administração, tempo de exposição (Oliveira et al. 2014; Jayasinghe et al. 2018) localização do campo de radiação em pacientes submetidos à radioterapia, tipo de câncer (principalmente em pacientes do sexo masculino) e status de fertilidade pré-tratamento (Ben-Aharon e Shalgi 2012). Para Moura e Monteiro (2020) a idade em que o paciente inicia o tratamento não se mostra um fator protetor ou acelerador dos efeitos sobre a fertilidade, mas sim a dose de quimioterápicos acumulada nos tecidos é que tem um impacto fundamental na fertilidade.

Os tratamentos antineoplásicos também podem causar diminuição da fertilidade ou infertilidade também devido aos seus impactos no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, causando hipogonadismo ou atuando essencialmente nas células germinativas (Ben-Aharon e Shalgi 2012; Silber 2012).

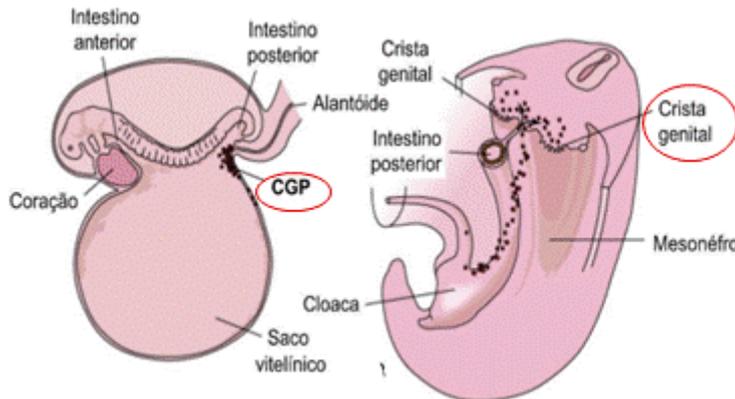
Existem vários mecanismos relacionados a gonadotoxicidade induzida pelos agentes quimioterápicos (Levine 2012; Krouwel et al. 2022). Cada classe de agente quimioterápico pode ter um mecanismo de ação diferente nas células cancerígenas, com a interrupção do ciclo de divisão celular (Jayasinghe et al. 2018). Igualmente os testículos e ovários podem perder sua funcionalidade, tanto na produção hormonal quanto na produção e manutenção da viabilidade dos gametas.

1.2 O Impacto da Quimioterapia e Radioterapia Sobre os Ovários

A quimioterapia e a radioterapia são utilizadas rotineiramente durante o tratamento dos mais variados tipos de câncer feminino e possuem ação que pode impactar negativamente a função ovariana (Sonigo et al. 2019). Os ovários são constituídos por diferentes tipos celulares que operam em conjunto a fim de executar sua função endócrina e promover a manutenção do gameta feminino até a ovulação. Os folículos ovarianos são fundamentais para a manutenção dos oócitos e para a síntese de hormônios necessários para a manutenção do ciclo ovariano (Findlay et al. 2009).

A formação dos ovários já acontece a partir dos primeiros meses de desenvolvimento, o feto possui células germinativas primordiais (CGP) que migram para a crista genital, região onde serão formadas as gônadas (Figura 1). Neste local é iniciado o processo de diferenciação destas células para oogônias e esta fase termina com a formação dos oócitos primário. Neste momento é iniciado o processo meiótico o qual é interrompido durante a prófase da primeira divisão meiótica. Estes oócitos primários permanecerão em repouso até a menarca, quando

retomarão progressivamente a meiose e serão ovulados como oócitos secundários (Sadler 2005).



Fonte: Adaptado de Sadler (2005)

Figura 1 - Migração das células germinativas primordiais para as cristas genitais

O número máximo de células germinativas tem seu pico em torno da 20ª semana do feto, quando são encontrados aproximadamente 7 milhões, diminuindo para 2 milhões ao nascimento e declínio progressivo até a menopausa. No início da puberdade, a mulher conta com uma média de 400 mil oócitos primários. Estas células são rodeadas por células foliculares que a cada ciclo, que quando recrutadas, proliferam e se diferenciam até a maturação folicular e ovulação (Wallace e Kelsey 2010).

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando com o folículo pré-ovulatório. Este processo ocorre simultaneamente à oogênese. A população folicular ovariana é heterogênea e de acordo com os aspectos morfológicos, pode-se encontrar folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais, estes chamados de terciários ou pré-ovulatórios (Figura 2). Contudo, 99,9% destes folículos não atingirão a ovulação, visto que a maioria morre por um processo fisiológico designado atresia folicular. Todo o processo de recrutamento folicular, desenvolvimento, maturação e ovulação do oócito é modelado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Martins et al. 2008; Moore et al. 2016). Como os folículos não se renovam, são passíveis de sofrer danos por diversos esquemas terapêuticos que geram citotoxicidade.



Fonte: Adaptado de Rosseto et al. (2011)

Figura 2 - Etapas do desenvolvimento folicular (foliculogênese)

Rotineiramente os protocolos aplicados na prática clínica dos tratamentos para o câncer incorporam uma combinação de vários fármacos. A quimioterapia é reconhecidamente gonadotóxica, principalmente quando utiliza agentes alquilantes, taxanos e complexos de platina entre outros, pois apresentam efeitos negativos sobre a reserva folicular ovariana (Levine 2012; Sonigo et al. 2019).

A falência ovariana que pode ocorrer após o tratamento, tem um risco maior em mulheres mais idosas, como consequência da menor reserva ovariana presente nestas pacientes, já as mais jovens que não apresentarem falência imediata com agentes gonadotóxicas, poderão eventualmente desenvolver infertilidade e menopausa precoce (Demeestere et al. 2007; Levine 2012). Desta forma, o retorno do ciclo menstrual não garante a fertilidade normal.

A quimioterapia pode ter dois tipos de efeito, sendo o primeiro imediato, que ocorre durante o tratamento e pode ser temporário, embora induza a amenorreia e perda do crescimento folicular, mas se houver ainda um número suficiente de folículos primordiais em repouso e estes não forem afetados, o ciclo menstrual poderá retornar após o término do tratamento. Já no efeito da quimioterapia em longo prazo há perda de folículos primordiais resultando em falência ovariana precoce (FOP) que surgirá após alguns anos, após o término do tratamento, fazendo com que a paciente entre em menopausa precoce (Sonigo et al. 2019; Jayasinghe et al. 2018).

São múltiplos os danos que a quimioterapia pode causar, como os efeitos diretos sobre o DNA e consequente apoptose celular, principalmente de folículos primordiais e células da granulosa. Também ocorrem danos diretos ao estroma ovariano que resultam em fibrose e hialinização de capilares sanguíneos resultando em danos no crescimento folicular (Levine 2012; Jayasinghe et al. 2018) indução ao estresse oxidativo celular (Ben-Aharon e Shalgi 2012) e diminuição de fatores inibitórios que regulam a ativação folicular, assim, haveria um excesso

de folículos em crescimento durante o tratamento e diminuição da reserva folicular (Morgan et al. 2012; Bedoschi et al. 2016).

A compreensão dos mecanismos dos fármacos gonadotóxicos abriu novos rumos para estudos que vislumbrem proteção contra os danos produzidos pelo tratamento quimioterápico, incluindo métodos e agentes que atuem nas vias de ativação folicular, apoptóticas e vascular, com objetivo de reduzir ou evitarem danos ao ovário (Roness et al. 2016). Um exemplo deste efeito protetor foi descrito por Budak et al. (2022) que constataram a ação protetora do plasma rico em plaquetas (PRP) na fertilização *in vitro* de ratos com falência ovariana induzida por ciclofosfamida.

A radioterapia isolada ou combinada com agentes quimioterápicos é amplamente utilizada no tratamento de uma série de neoplasias, e tem o potencial de causar infertilidade permanente. O uso da radioterapia pode diminuir a fertilidade quando direcionada para os órgãos reprodutivos ou para estruturas que produzem hormônios necessários para a reprodução (Poorvu et al. 2019). O grau de persistência dos efeitos adversos da radiação ionizante depende da idade da paciente, dose e campo de irradiação (Piazza et al. 2011).

A dose de radiação calculada para destruir 50% da reserva oocitária é estimada em menos de 2 gray (Gy) (Wallace et al. 2003). No processo irradiativo, os oócitos sofrem um rápido início de picnose, condensação dos cromossomos, vacuolização do citoplasma e ruptura nuclear (Piazza et al. 2011). Os danos podem ser de maneira direta e destruir os folículos e indireta pela formação de radicais livres, bem como por alterar o fluxo sanguíneo desses órgãos e causar fibrose vascular (Lin et al. 1999).

Irradiação entre 14-30 Gy também pode ter impacto na fertilidade, causando danos na musculatura uterina e capilares, limitando assim a capacidade de uma gravidez a termo, aumentando a incidência de aborto espontâneo (Bath et al. 1999). Este dano é maior nas meninas em idade pré-púberes (Piazza et al. 2011).

1.3 O Impacto da Quimioterapia e Radioterapia Sobre os Testículos

O testículo tem como principal função a produção de andrógenos e suportar a espermatogênese e este processo depende do desenvolvimento e funcionalidade das células somáticas testiculares e das células germinativas. O principal andrógeno, a testosterona, é produzido pelas células de Leydig, que ficam no espaço intersticial entre os túbulos seminíferos. No interior dos túbulos seminíferos ficam as células de Sertoli que dão o suporte estrutural e metabólico para que ocorra a espermatogênese. Os hormônios hipofisários, FSH (folículo

estimulante) e LH (Luteinizante) atuam sobre as células de Leydig e Sertoli e são regulados pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzida pelo hipotálamo. Juntos, estes hormônios formam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que promove e mantém o desenvolvimento dos espermatozoides (Moore et al. 2016; Mäkelä et al. 2019).

O câncer pode ter um impacto multifatorial sobre a espermatogênese, além dos efeitos adversos da terapia antineoplásica, em particular os agentes alquilantes e a irradiação induzem danos testiculares que resultam em azoospermia prolongada e infertilidade (Qu et al. 2019).

É imprevisível o retorno da espermatogênese após o tratamento dos mais variados tipos de câncer e agentes quimioterápicos. Schrader et al. (2001) relatam que 15-30% dos sobreviventes ao tratamento permanecem azoospermicos. Andreu et al. (2000) observaram em seus estudos que 24% dos indivíduos tornaram-se inférteis após o tratamento.

Os tumores testiculares e os linfomas são os tipos de câncer que mais frequentemente acometem os homens. Contudo, as taxas de cura são altas e a preocupação com a fertilidade dos pacientes é alta. Tanto o tratamento oncológico pode impactar na espermatogênese como a própria doença, sendo difícil muitas vezes a avaliação da causa dos distúrbios da fertilidade (Schrader et al. 2001).

Muitos danos podem provocar a parada da espermatogênese, as espermatogônias são muito sensíveis a radiação independentemente da idade que o paciente iniciou o tratamento, já as células de Leydig são mais resistentes em homens adultos do que na puberdade (Shalet et al. 1989). Mesmo que os testículos não recebam diretamente a radiação, os danos a produção espermática podem ocorrer, basta um campo próximo aos testículos ser irradiado e será o suficiente, ainda que o testículo esteja protegido (Gandini et al. 2006).

Segundo Okada e Fujisawa (2019), uma radiação de apenas 0,1 Gy já pode alterar a quantidade e morfologia das espermatogônias. Em intensidade de 2 a 3 Gy, pode causar danos aos espermátocitos e ocorre diminuição das espermátides. A espermatogênese é reduzida de forma significativa quando os testículos são expostos a níveis de 4 a 6 Gy.

A radioterapia também pode causar efeitos deletérios provocados pelo aumento das espécies reativas ao oxigênio (EROS), levando a lipoperoxidação e conseqüentemente fragmentação de DNA nas células imaturas da linhagem germinativas (Cordelli et al. 2003).

Ståhl et al. (2004) avaliaram o impacto dos tratamentos na integridade do DNA espermático em pacientes com carcinoma de células germinativas, e, verificaram que quando tratados com radioterapia coadjuvante, tiveram um índice de fragmentação de DNA (IDF) significativamente maior do que os pacientes não tratados (18% vs. 13%).

Um espermatozoide com dano no DNA pode fertilizar um oócito, porém se discute a

respeito da influência exercida no desenvolvimento embrionário e fetal, quando as anormalidades do DNA paterno não são reparadas pelo oócito ou pelo embrião (Sakkas e Alvarez 2010). Estudos mostraram que a taxa de gravidez clínica pode ser afetada (Rex et al. 2017), assim como aumento de abortos (Zini e Sibman 2009) podem ser observados em casos de danos ao DNA paterno.

Bujan e De Mas (2002) também verificaram aumento da fragmentação do DNA espermático após o uso de um protocolo de quimioterápicos (Bleomicina, Etoposida e Cisplatina), além de constatarem um aumento de aneuploidias e espermatozoides diploides. Mesmo que estes danos possam ser transitórios, a recomendação de criopreservação seminal antes do início do tratamento deve ser incentivada.

Duca et al. (2019) avaliaram o desenvolvimento morfo volumético do testículo, a função gonadal e parâmetros espermáticos de adultos que sobreviveram ao câncer infantil e verificaram em um terço dos indivíduos um baixo volume testicular, baixos níveis de testosterona e concentração espermática.

Estes dados trazem implicações complexas tanto hormonais quanto psicológicas que devem ser investigadas e consideradas no aconselhamento reprodutivo. A utilização de metodologias disponíveis para a preservação da fertilidade deve ser oferecida pelas clínicas. O desenvolvimento de novas estratégias mais acessíveis e eficientes de preservação da fertilidade é desafio constante para a ciência envolvida com a oncofertilidade.

1.4 Oncofertilidade

Não existem até o momento instrumentos que possam prever a ocorrência e/ou da gravidade do dano gonadotóxico, ou mesmo que permitam aferir se o dano ocorrido levará a transtornos definitivos (Carvalho 2015).

O termo ou área da oncofertilidade busca associar conhecimentos em oncologia e endocrinologia reprodutiva e biotecnologia para fornecer estratégias de preservação da função reprodutiva para pacientes diagnosticados com câncer (Carvalho 2015; Akasha e Woodruff 2019).

O termo oncofertilidade foi estabelecido em 2006 por Teresa K. Woodruff, atual diretora do “*Oncofertility Consortium*®”. Este campo de atuação é interdisciplinar, onde participam especialistas em oncologia, medicina reprodutiva, embriologistas e psicólogos para prestarem atendimento rápido, eficiente e acolhedor às pacientes, além de aprimorar o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de estratégias de preservação da função reprodutiva em

sobreviventes de câncer (Kobayashi et al. 2017). Porém, algumas opções disponíveis ainda estão em fase experimental, e sua indicação deve ser recomendada com cautela para pacientes em situações de fragilidade emocional (Moura et al. 2016).

O envolvimento do paciente nas decisões clínicas permite a compreensão dos objetivos e preferência do envolvido em termos de cuidado e prevenção da fertilidade. Muitas vezes a sobrevivência do paciente é considerada prioridade, no entanto, algumas mulheres, por exemplo, podem ter sua qualidade de vida afetada pela impossibilidade futura de experimentar a maternidade (Gonçalves e Quinn 2022). Portanto, é necessária uma equipe multidisciplinar que possa conduzir os casos individualmente para proporcionar apoio necessário nas tomadas de decisões (Sonigo et al. 2019).

De acordo com as diretrizes clínicas mundiais, os clínicos devem informar e discutir o risco de infertilidade o mais breve possível com o paciente e encaminhá-los para especialistas da área da reprodução assistida (Covelli et al. 2019).

Nesse contexto, surgem questionamentos e propostas para melhoria e manutenção da qualidade de vida de pacientes oncológicos, dentre os quais estão as estratégias para preservação da função gonadal e/ou de gametas e, por conseguinte, da fertilidade.

Técnicas de reprodução assistida já bem estabelecidas, como a criopreservação de gametas e embriões, têm sido usadas com a finalidade de preservar a fertilidade tanto de homens como mulheres (Demeestere et al. 2005; Prentice e Anzar 2011; Tao et al. 2020).

Em vários casos a criopreservação de oócitos ou de embriões pode não ser uma opção viável devido a necessidade de estimulação hormonal para obtenção de oócitos e que atrasa o início do tratamento, além de não ser uma estratégia recomendada para crianças e pacientes jovens que não iniciaram a puberdade, para mulheres adultas que não possuem parceiro ou ainda aquelas com câncer sensível à hormônios, por exemplo tumores de mama e ovário (Moura et al. 2016).

Alternativamente, a associação da técnica de criopreservação e reimplante de tecido ovariano pode ser realizada em qualquer período do ciclo menstrual e não requer estimulação hormonal e já possui mais de 200 nascidos vivos no mundo (Dolmans et al. 2020). Outra técnica promissora é o cultivo de folículos pré-antrais, que pode ser realizado antes ou após a criopreservação do tecido ovariano (Xiao et al. 2015; McLaughlin et al. 2018). Esta técnica permite recuperar folículos antes que se tornem atresícos, cultivá-los até sua maturação e assim obter oócitos capazes de serem fertilizados *in vitro* e produzirem embriões saudáveis (Figueiredo et al. 2019).

Para homens adultos a criopreservação de espermatozoides e de biopsias testiculares é uma técnica amplamente utilizada para preservar a fertilidade e com ela foi possível conceber milhões de bebês nascidos vivos em todo mundo (Tao et al. 2020). Já para meninos pré-púberes que não produzem espermatozoides e que sofrerão os efeitos danosos dos tratamentos gonadotóxicos, a única alternativa, ainda experimental, é a criopreservação do tecido testicular, onde posteriormente as células germinativas poderiam se diferenciar em espermatozoides (Benvenuti et al. 2018).

1.5 Cultivo de Folículos Ovarianos Isolados

A criopreservação de tecido ovariano é uma alternativa para as mulheres, principalmente em idade pré-púbere. Porém, uma séria preocupação que deve ser abordada é o risco de reimplantar células tumorais junto com o tecido enxertado, especialmente em pacientes com leucemia, que continua sendo o câncer hematológico mais comum em mulheres com menos de 20 anos de idade (Dolmans e Amorim 2019).

O desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos isolados também tem sido considerado uma alternativa promissora de preservação da fertilidade feminina sem a possibilidade de reintrodução de células alteradas. O cultivo pode ser realizado antes ou após a criopreservação do tecido ovariano e oócitos maduros podem ser obtidos, como descrito em estudos em camundongos (Jin et al. 2010), macacos (Xu et al. 2013) e humanos (Xiao et al. 2015; Mclaughlin et al. 2018). Com o avanço da bioengenharia, os folículos pré-antrais isolados podem ser também transplantados, inseridos em um ovário artificial (Dolmans e Amorim, 2019; Ghezelayagh et al. 2022). Para construir um ovário artificial, é necessário recriar um ambiente anatômico e fisiológico semelhante ao do ovário natural, assim folículos isolados seriam encapsulados em uma biomatriz 3D construída de alginato, fibrina ou matrizes ovarianas descelularizadas (Dadashzadeh et al. 2021).

Todos os sistemas de cultivo são iniciados com a obtenção dos folículos do ovário, que podem ser obtidos por biópsia ou após a ooforectomia, posteriormente podem ser isolados individualmente de forma mecânica ou enzimática (Demeestere et al. 2002). Segundo Kim et al. (2005), os folículos isolados mecanicamente, apresentam menor viabilidade logo após seu isolamento, no entanto, após o cultivo, proporciona maior crescimento, sobrevivência folicular e oócitos maduros, quando comparado ao isolamento enzimático. Eppig e Schroeder (1989) observaram que quando os folículos pré-antrais são isolados enzimaticamente, ocorre uma

maior dispersão das células da granulosa e estas são essenciais para proliferação e crescimento do folículo.

Uma técnica eficaz para permitir o cultivo de folículos ovarianos *in vitro* ainda não foi estabelecida, apesar de existirem diversos protocolos (Nikiforov et al. 2018; Rajabzadeh et al. 2020; Wang et al. 2022). Cada protocolo varia em alguma etapa ou suplementação na tentativa de melhorar as taxas de sobrevivência celular. Alguns estudos propõem promover uma sustentação ao folículo através de algum tipo de um biomaterial com consistência elástica, como alginato e colágeno para manter a arquitetura folicular (Desai et al. 2012; Vanacker e Amorim 2017). Nikiforov et al. (2018) descreveram um sistema de cultivo entre camadas de óleo mineral alocados em placas de 96 poços em formato de “V”, onde obtiveram sucesso com o desenvolvimento de folículos isolados de ovelhas.

Diversos trabalhos em modelos animais utilizaram para cultivo de folículos isolados, o como meio base α -MEM (*alpha minimal essential medium*) (Xiao et al. 2015; Pazoki et al. 2015, Xu et al. 2021), o TCM-199 (Nikiforov 2018) e o DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Choi et al. 2013), os autores, além dos suplementos já contidos nos meios utilizados, variaram na adição de suplementações nutritivas.

Ainda não há um consenso sobre as condições de cultivo, principalmente quanto as suplementações utilizadas como ativadores de proliferação celular e fatores de crescimento (Ghezelayagh et al. 2022). Uma revisão realizada por Silva et al. (2021) revelou que as condições inadequadas de cultivo de folículos *in vitro* ainda são uma barreira para que esta técnica seja concretizada com sucesso. Estas condições são responsáveis pelo aumento de espécies reativas ao oxigênio que alteram os padrões epigenéticos dos oócitos e células foliculares.

Uma alternativa contra o estresse oxidativo seria a suplementação de antioxidantes ao meio de cultura. A combinação insulina-transferrina-selênio (ITS) é a suplementação adequada para este cenário, sendo que a insulina induz a captação de glicose e aminoácidos, e tem atividade mitogênica e antiapoptótica (Augustin et al. 2003), já a transferrina e o selênio são oligoelementos que possuem propriedades antioxidantes. A combinação desses elementos em meios de cultura provoca uma redução na produção de radicais livres e peroxidação lipídica (Kim et al. 2005).

Geralmente hormônios como o folículo estimulante (FSH) e o luteinizante (LH), fatores de crescimento e suplementos proteicos são adicionados ao meio de cultivo (Demeestere et al. 2005). Em modelos animais de cultivo de folículos, é comum encontrar nos trabalhos o soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) como suplemento proteico (Rodrigues et

al. 2010; Rajabzadeh et al. 2015). Porém, quando se cultiva folículos ovarianos humanos, há uma substituição do SFB pela albumina sérica humana (Xiao et al. 2015; Yang et al. 2020). Esta suplementação é composta por inúmeras substâncias como fatores de crescimento, proteínas, aminoácidos e fontes precursoras de esteroides (Abedelahi et al. 2008; Rodrigues et al. 2010), todos sinalizadores e precursores necessários para proliferação celular.

O desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos é um processo complexo, regulado por fatores que dependem dos componentes presentes no meio de cultivo, portanto, ainda é um desafio o entendimento das vias de sinalização que promovem o crescimento folicular e a maturação oocitária com o sucesso esperado para garantir a produção de embriões com potencial de desenvolvimento.

O lisado de plaquetas (LP), composto por uma preparação de matriz extracelular a partir de plaquetas humanas, mostrou ser capaz de suportar a proliferação celular (Fortunato et al. 2016). O lisado plaquetário humano (hPL) foi sugerido como uma suplementação proteica potencial para o cultivo celular *in vitro* de células de medula óssea, tecido adiposo, células tronco mesenquimais, entre outras, em substituição ao SFB. A busca por um equivalente derivado humano ao SFB é devido aos riscos de transmissão de contaminantes xenogênicos como antígenos, vírus, bactérias e príons (Santos et al. 2018).

As plaquetas são um reservatório natural de inúmeras proteínas, citocinas e fatores de crescimento (FCs). A extração de FCs por lise de plaquetas humanas representa uma alternativa mais barata e segura ao uso de FCs recombinantes ou proteínas animais e FCs (Burnouf et al. 2016; Santos et al. 2018). Alguns fatores reguladores da foliculogênese estão presentes nas plaquetas, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), que proporciona a proliferação das células da granulosa e da teca (Jones e Shikanov 2019), e o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) que está envolvido no desenvolvimento dos folículos nos estágios pré-antrais (Magalhães-Padilha et al. 2012), entre outros.

Em 2014, Pazoki et al. cultivaram folículos pré-antrais em um meio enriquecido com LP pela primeira vez e a taxa de sobrevivência e o crescimento de oócitos foram aceitáveis. Em 2015, Pazoki et al. substituíram o FBS por PL para comparar o crescimento e o desenvolvimento de folículos pré-antrais *in vitro*, o lisado plaquetário obteve um efeito positivo no crescimento e desenvolvimento oocitário.

Ainda não há um consenso sobre o procedimento padrão para a obtenção do hPL, podendo ser obtido por sangue de cordão umbilical, soro ou plasma, ou concentrado plaquetário de aférese, além de variações para a lise das plaquetas (congelamento/aquecimento, sonicação, detergentes, ativação por CaCl₂) (Burnouf et al. 2016). Deste modo a qualidade do produto e

seus efeitos entre lotes e diferentes preparações variam, justificando a variabilidade de resultados encontrados após a utilização do mesmo.

Contudo, o lisado de plaquetas humanas (PLTMax®, PLTM, PL Bioscience, Aachen Alemanha) é um suplemento comercial, rico em fatores de crescimento e tem sido utilizado para a proliferação celular *in vitro*, sendo um potencial substituto do soro fetal bovino ou outra fonte de proteína semelhante (Alonso-Camino e Mirsch 2019; Kakudo et al. 2019), no entanto, não foi encontrado qualquer trabalho que tenha utilizado este produto na cultura do folículo ovariano.

1.6 Criopreservação Seminal

O congelamento seminal é um método de criopreservação e armazenamento que garante a fertilidade futura para homens. Pode ser utilizada para preservar a fertilidade de homens que irão a doação do sêmen, uso em RHA, realizar vasectomia, ou que serão submetidos a tratamentos que possam afetar a sua fertilidade, tais como quimioterapia, radioterapia ou cirurgias (Schrader 2001; Huang et al. 2022).

Existem alguns métodos de criopreservação que diferem entre si em termos de taxas de resfriamento, composição dos crioprotetores (CPAs), tipo de envase e do protocolo de descongelamento (Li et al. 2019). Embora a criopreservação de sêmen tenha alcançado ótimos resultados, ainda não foi estabelecida uma técnica “padrão-ouro” para a recuperação de espermatozoides viáveis após a criopreservação (Huang et al. 2022). É improvável que se consiga uma única taxa considerada ótima de congelamento, mas é necessário que se mantenha as propriedades biológicas e estas sejam consideradas (Martins et al. 2019).

Atualmente existem diferentes métodos utilizados para criopreservar o sêmen humano, o congelamento programável (lento) e os métodos manuais, que podem apresentar diferentes rampas de resfriamento, e mais recentemente, surgiu a técnica de vitrificação espermática (Hinting e Agustinus 2020).

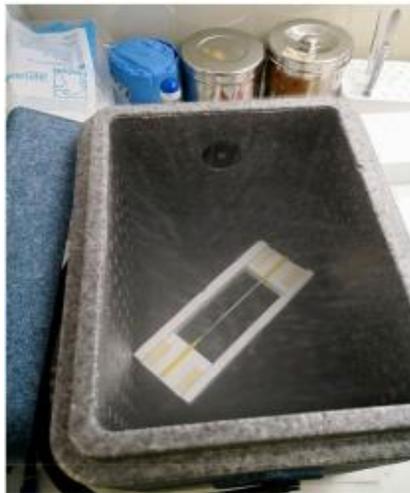
O método programável, em geral, é simples de utilizar, não requer intervenção do operador durante o processo e há controle da temperatura realizado por um equipamento automático (Tao et al. 2020; Tongdee et al. 2015). Contudo, é útil apenas para processar muitas amostras e estas produzem calor latente que competirá com o sistema de resfriamento do equipamento (Rios e Botella 2019). Lee et al. (2012) verificaram que o processo de congelamento e descongelamento pelo método programável causou uma redução de 66% na motilidade progressiva rápida e 45% nos espermatozoides com motilidade progressiva lenta.

O congelamento de forma manual, chamado de rápido, é baseado em um contato direto das amostras com vapor de nitrogênio líquido (N_2L) por 10 a 15 minutos (Li et al. 2019). De acordo com Paoli et al. (2019) o vapor possui um gradiente térmico que depende especificamente da distância da superfície do N_2L e do volume contido no recipiente. Uma alternativa deste protocolo é a manutenção das amostras por 10 min a $4^\circ C$, antes da etapa do vapor de N_2L (Di Santo et al. 2012).

Esta metodologia possui as vantagens de suportar diferentes tipos de envase, utiliza apenas uma etapa de criopreservação e reduz o tempo de operação; o que eleva seu custo-benefício. Em contrapartida, o controle da temperatura é manual e a distância das amostras do vapor de N_2L não é padronizada (Rios e Botella 2019; Di Santo et al. 2012). A curva de resfriamento não é controlada e as temperaturas de congelamento podem variar entre -70 a $-99^\circ C$ (Fabbri et al. 2004).

Para que as amostras permaneçam a uma determinada altura do vapor, são improvisados suportes para este fim, como demonstrado (Figura 3) no estudo conduzido por Huang et al. (2020).

Segundo Riva et al. (2018), o congelamento rápido oferece motilidade pós-descongelamento e taxa de sobrevivência superiores ao congelamento lento.



Fonte: Huang et al. (2020)

Figura 3 - Criopreservação seminal em vapor de N_2L com uso de “barco” de isopor improvisado.

Para o descongelamento de amostras seminais criopreservadas por estas técnicas, Fabbri et al. (2004) propõem as seguintes opções: descongelamento a temperatura ambiente por 10 min e posteriormente a $37^\circ C$ por mais 10 min; somente a $37^\circ C$ por 10 min; ou somente

temperatura ambiente durante 15 min. Após o completo descongelamento a amostra deve ser processada com meio de cultivo e centrifugação para retirada do crioprotetor.

Já a vitrificação, é um método de criopreservação rápido, simples e de baixo custo, mas que requer microvolumes ($\leq 20 \mu\text{l}$), o que a torna menos interessante quando se trata de amostras com grandes volumes (Tao et al. 2020).

Independentemente da técnica escolhida, a criopreservação prejudica a viabilidade das células espermáticas pois causa danos celulares conhecidos como crioinjúrias (Cavalcante et al. 2006). A criopreservação pode causar dano mecânico, choque osmótico (Di Santo et al. 2012; Hinting e Agustinus 2020), aumento de espécies reativas ao oxigênio, alteração na composição de carboidratos do glicocálice, prejudicando a função das proteínas de membrana responsáveis pelo transporte e metabolismo de íons e fragmentação do DNA do espermatozoide (Zribi et al. 2010). Porém, segundo Isachenko et al. (2004) a fragmentação do DNA espermático não necessariamente está relacionada a criopreservação, mas sim com o protocolo utilizado, ou ainda com a qualidade da amostra seminal, preparo do sêmen antes da criopreservação, além dos protocolos de avaliação utilizados.

Um estudo conduzido por Gonsálvez et al. (2009), com espermatozoides mantidos em incubadora até 24h, observou que o aumento da fragmentação de DNA espermático ocorre ao longo do tempo e varia entre os indivíduos, sendo a maior velocidade de fragmentação nas primeiras 4 horas de incubação, diminuindo para 50% no segundo período e chegando a 1% no término do teste.

Ozkavukcu et al. (2008) sugerem que diferentes e novos métodos de criopreservação, utilizando distintos crioprotetores, devam ser considerados para atender diferentes tipos de amostras seminais, como as normais, oligospermicas ou para indivíduos com neoplasias e inférteis, pois possuem características próprias. Além da qualidade da amostra seminal, um processo de criopreservação bem-sucedido depende da ação do crioprotetor em evitar o dano dos espermatozoides no processo do congelamento, isso reflete na qualidade do espermatozoide após descongelamento.

É estimado que a amostra perca de 25% a 75% de sua motilidade após processo de criopreservação (Martins et al. 2019). Gupta et al. (2010) mencionam que cerca de 50% dos espermatozoides perdem a motilidade após o congelamento e aquecimento. Isso resulta da exposição ao choque térmico, formação de cristais de gelo e desidratação celular que geram danos irreversíveis (Tongdee et al. 2015; Li et al. 2019).

Quando se opta por realizar a criopreservação por meio do método manual, vale ressaltar que o processo é controlado pelo operador e que uma das etapas é a manutenção, por

determinado tempo, das amostras seminais no vapor de N_2L . A distância das amostras do N_2L e o tempo de manutenção nesta fase do protocolo, normalmente não são relatados na literatura, entretanto, quando apresentam esta metodologia, são distintas, como demonstramos na Tabela 1. Esta ausência de informações deixa uma lacuna na descrição do protocolo e permite que o executor crie maneiras próprias para obter a manutenção das amostras seminais na distância ideal do vapor de N_2L , não garantindo assim a reprodutibilidade da metodologia.

Tabela 1 - Resumo de diferentes metodologias de criopreservação seminal usando a etapa de vapor de N₂L.

Autor	Processamento Seminal Pré-Congelamento	Refrigeração Prévia Da Amostra	Distância Da Amostra/Vapor De N ₂ L/Tempo	Envase	Dispositivo Para Suporte Da Amostra	Método De Descongelamento	Meio Diluidor	Processamento Seminal Após Descongelamento	Taxa De Recuperação Da Motilidade Total /Vitalidade
Amesse et al. 2003	Amostra fresca	4°C/2h	-189° C/15 min	Criotubos	–	30 min T° amb	TYB (Irvine Scientific)	Não	Mot: 12,4% Vit: 33,6%
Nallella et al. 2004	Amostra fresca		-96° C/2 h	Criotubos	–	5 min T° amb + 20 min a 37°C	TYB (Irvine Scientific)	Não	Mot; 48,8%
Ngamwuttiwong e Kunathikom 2007	Amostra fresca	–	15 cm/30 min	Palhetas/ 0,25mL	–	10 min T° amb + 10 min aquecida	Meio contendo glycerol, glycina e glicose	Não	Mot: 44% Vit: 38,5%
Paras et al. 2008	Amostra fresca	–	25 cm/15 min	Palhetas /0,5mL	–	5 min aquecida	TYB (Irvine Scientific)	Sperm wash	Mot: 52,5%
Wongkularb et al. 2011	Swim up - (técnica de seleção espermática)	-	15 cm/15 min	Ciotubos	-	25° C - 28° C por 5 min	Spermfreeze; FertiPro)		Mot: 47,3% Vit: 49,5%
Creemers et al. 2011	Amostra fresca	6°C/60 min	4 cm/30 min	Palhetas	–	22° C / 2 min	Sperm CryoProtec (Nidacon)	Sperm wash	Mot: 47,8%
Oberoi et al. 2014	Sperm Wash (lavagem por centrifugação)	4°C/10 min	–	Criotubos	–	60 min T° amb	Meio de congelamento (CodeHSISC-20 William A Cook, Australia Pty. Ltd.)	Sperm wash	Mot: 46%
Tongdee et al. 2015	Sperm Wash (lavagem por centrifugação)	–	10 min	Criotubos	Rack metálica	15-20 min T° amb	(Spermfreeze; FertiPro)	Não	Mot: 27,9%
Rios et al. 2018	Sperm Wash+Swim up	4°C/20 min	20 min	Palhetas /0,5mL	–	37° C / 15 min	TYB (Irvine Scientific)	Sperm wash	Mot: 21%

Li et al. 2020	Amostra fresca	4°C/15 min	5 cm/10 min	Criotubos	-	2 min T° amb + 37° C	Solução Tyrode modificada sem gema (in house)	-	Mot: 26%
Eini et al. 2021	Amostra fresca	-	5 cm/20 min	Palhetas	-	37° C	Sperm Freezing Medium (Life Global)	Sperm wash	Mot: 30,5% Vit: 45,8%

Fonte: Autoria própria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a eficiência do cultivo de folículos pré-antrais de camundongos e desenvolver um protótipo para criopreservação de sêmem humano.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a eficiência do cultivo de folículos pré-antrais com lisado de plaquetas (PLTMax®);
- Aplicar um questionário para embriologistas sobre a criopreservação seminal;
- Criar e testar protótipos para criopreservação seminal;
- Produzir em impressora 3D um protótipo de suporte de palhetas para congelamento;
- Verificar a recuperação da viabilidade espermática após criopreservação em diferentes posições das palhetas no protótipo;
- Comparar a eficiência do protótipo com um suporte improvisado para criopreservação seminal.

CAPÍTULO 1

3 CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS ISOLADOS DE CAMUNDONGO SUPLEMENTADO COM LISADO DE PLAQUETAS

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica muito promissora pois consegue preservar inúmeros folículos pré-antrais. Estes, podem ser preservados inclusos no tecido ou isolados e cultivados *in vitro* para maturação oocitária, antes ou após a criopreservação.

Embora avanços tenham sido realizados, o cultivo folicular *in vitro* ainda apresenta lacunas de entendimento, sendo considerado um método experimental (Guzel e Oktem 2017; Herta et al. 2018). Novas suplementações, que forneçam diferentes vias de sinalização celular são necessárias para o desenvolvimento folicular e maturação oocitária e de interesse para otimizar o sistema de cultivo.

Em 2015, Pazoki et al. cultivaram folículos pré-antrais de camundongos em um meio enriquecido com lisado de plaquetas extraído de cordão umbilical em substituição ao soro fetal bovino como suplemento de cultivo e obtiveram resultados promissores.

3.1 Materiais e Métodos

Aprovação ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, SC, Brasil), sob o parecer nº 017/18.

Obtenção de folículos ovarianos

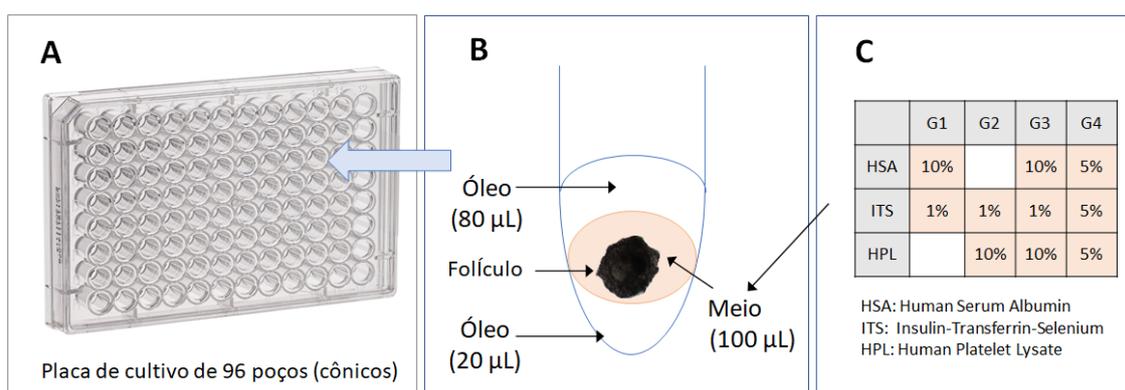
Camundongos fêmeas pré-púberes (N=22, SWR-SWISS), com 15-18 dias de idade, pesando 13-15 g, foram obtidos no biotério da UNIVALI. Após a eutanásia dos animais em uma câmara de CO₂/O₂, os folículos ovarianos pré-antrais foram isolados mecanicamente usando agulhas hipodérmicas (26G) em placas de Petri, na presença do meio GV-HEPES (Ingamed, Maringá, Brasil), sob estereomicroscópio em fluxo laminar. Folículos morfolologicamente normais, com células intactas, sem antro, de superfície comparáveis, foram selecionados (N=165) e cultivados.

Cultura in vitro de folículos

O meio DMEM:F12 medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture Ham F-12, pH 7,32, Sigma Aldrich, São Paulo) foi utilizado para a cultura folicular. Este meio básico foi suplementado com 1% de penicilina (Sigma Aldrich), 5 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich) e 0,5 IU de gonadotropina coriônica equina (eCG, Syntex, Sigma Aldrich). Vários suplementos proteicos foram adicionados, nomeadamente lisado de plaquetas humanas (PLTMax, Sigma Aldrich, São Paulo), insulina, transferrina e mistura de selênio (ITS, Sigma Aldrich) e albumina de soro humano (Ingámed, Maringá). As 4 condições testadas (G1, G2, G3, G4) são apresentadas na Figura 4.

Uma vez selecionados, os folículos foram cultivados individualmente em placas de cultura de 96 poços com fundos cônicos (Corning). O sistema utilizado, descrito por Nikiforov et al. (2018), consiste em colocar os folículos em 100 µL de meio entre duas camadas de óleo mineral (Nujol®, Mantecorp, Brasil) (Figura 4). Cada folículo foi monitorado individualmente do início ao fim do experimento. A cultura foi realizada em uma incubadora (Thermo Fisher Scientific) a 37 °C com 5% de CO₂.

Após 10 dias de cultura, o fim da maturação folicular e dos oócitos foi induzido pela adição de 30 µL de DMEM:F12 contendo 1,5 IU/mL de hCG (Vetecor 5000®-Hertape Callier, Brasil), previamente aerado sob CO₂. A cultura continuou por 16 horas, após as quais os folículos foram transferidos para uma placa Petri e reexaminados para avaliação da qualidade e maturação oocitária.



Fonte: Autoria própria

Figura 4 - Sistema de cultura. A: Placa de cultura de 96 poços. B: Montagem da composição do cultivo no poço da placa, DMEM:F12 meio de cultura entre duas camadas de óleo de 20 µL (camada inferior) e 80 µL (camada superior). C: Aditivos proteicos ao meio de cultura para os grupos G1, G2, G3 e G4.

Aquisição e análise de imagens

Os folículos foram numerados de acordo com sua posição na placa de cultivo e fotografados usando um microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x), equipado com uma câmera OCTAX e software Eyeware (Vitrolife, São Paulo). As fotografias foram submetidas a análise dimensional com o software de domínio público ImageJ (NIH, Bethesda, EUA) para determinar a superfície dos folículos (Figura 5).

Avaliação do crescimento folicular

No 11º dia de cultura, aproximadamente 16 a 18h após a indução feita com hCG, os folículos foram transferidos para uma placa de Petri contendo o meio GV-HEPES e fotografados. As superfícies foram medidas com o software ImageJ. Folículos com uma superfície inferior a 19.000 μm^2 e/ou menor que a área inicial foram considerados atrésicos (Figura 6).

Classificação de oócitos

Após a maturação e indução do hCG, foi avaliada a maturidade dos oócitos dos folículos cultivados, classificando-os em: intactos ou degenerados. Os oócitos intactos incluíram os vários estágios de maturação: prófase I, metáfase I e metáfase II. Os oócitos degenerados incluíam várias morfologias, como citoplasma fragmentado ou lisado, presença de clivagem meiótica ou outros sinais de apoptose (Figura 7).

Avaliação da vitalidade celular

Ao final do cultivo foi avaliada a vitalidade das células foliculares. Para este fim, os folículos foram transferidos para microtubos contendo 100 μL de colagenase IV (Sigma Aldrich, São Paulo) e incubados por 30 min a 37° C. Posteriormente foram adicionados 100 μL de hialuronidase (80 IU/mL, Ingámed, Maringá) para mais 30 min de incubação. Durante este procedimento, os microtubos foram agitados por vortex a cada 15 minutos. Uma vez concluídas as incubações, 50 μL de HSA (Ingámed) e 250 μL de tampão fosfato (Ingámed) foram adicionados, antes da centrifugação por 5 min a 3510 RPM. O granulado celular foi ressuspenso em 20 μL de tampão fosfato (Ingámed) e 20 μL de 0,4% de corante vital azul Tripan (Sigma-Aldrich, EUA). As suspensões celulares foram então examinadas em uma célula de contagem Neubauer, e examinadas em microscópio de luz (400X). Células não coradas de azul foram consideradas vivas e células coradas foram consideradas mortas. Os resultados foram expressos como % de formas vivas.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software Jamovi (versão 1.6.23.0, Sydney, Austrália). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para comparações múltiplas e teste *t*-Student para valores pareados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3.2 Resultados

Foram obtidos 165 folículos com características semelhantes para o cultivo (Figura 5). As medidas das superfícies foliculares iniciais obtidas no primeiro dia de cultivo (D1) e finais no 11º dia (D11) nas quatro condições de cultivo são apresentadas na Tabela 2 e como boxplots na Figura 8.

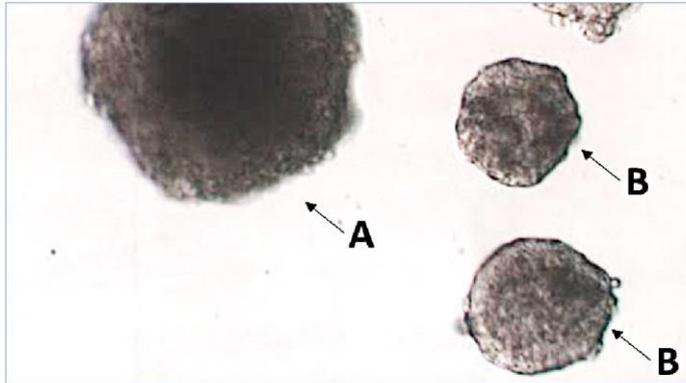
Os resultados apresentados na Figura 8 correspondem a média de três experimentos em que as 4 condições foram testadas simultaneamente em D1 e D11. Em D1 (Fig. 8A), os tamanhos dos folículos não apresentaram diferenças significativas ($p=0,09$), enquanto em D11 (Fig. 8B), houve um aumento no tamanho do folículo em todas as condições, com os maiores aumentos observados no grupo G1 (HSA 5%+ITS 1%) e no grupo G2 (PLTM 5%+ITS 1%). Os tamanhos finais das superfícies foliculares dos grupos G2,G3 e G4 apresentaram diferenças significativas ($p<0,001$) em relação ao grupo G1, porém não diferiram entre si. Na Figura 6 está demonstrada a diferença visual entre os folículos que apresentaram desenvolvimento ao final do cultivo e os que foram considerados atrésicos.



Fonte: Autoria própria

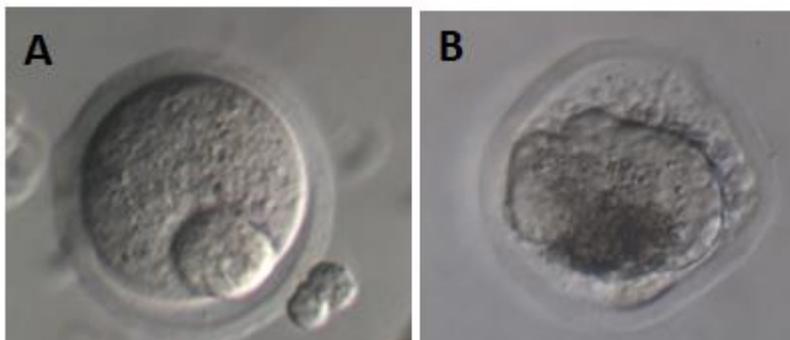
Figura 5 - Exemplos de folículos recuperados e selecionados para o cultivo, após dissecação dos ovários de camundongos pré-púberes. Os círculos amarelos correspondem às áreas

(expressas em μ^2) calculadas por ImageJ. Fotomicrografia obtida por microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x).



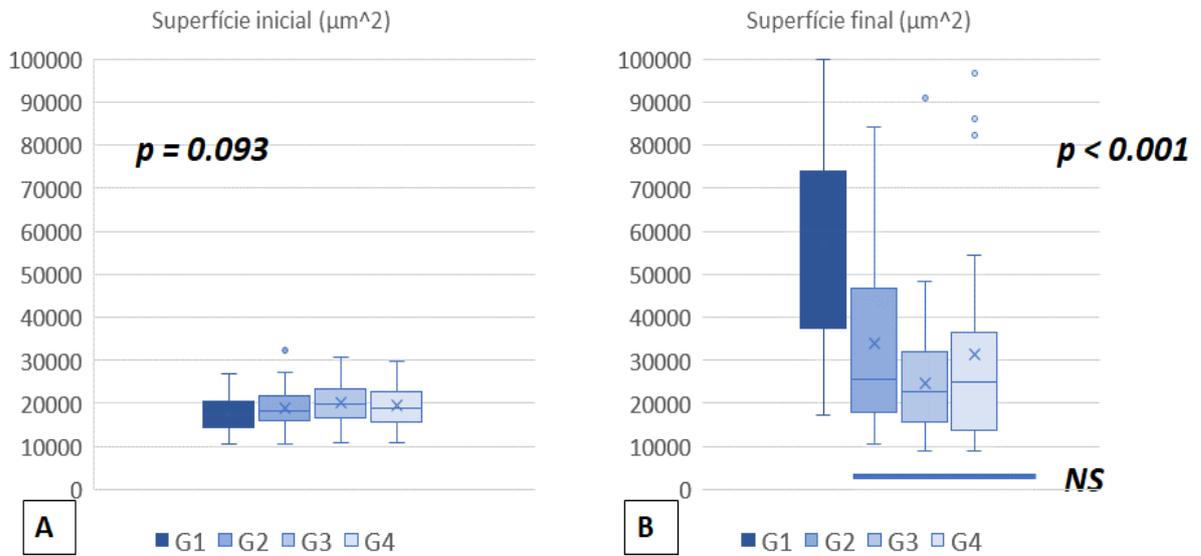
Fonte: Autoria própria

Figura 6 - Exemplos de folículos após 11 dias de cultivo e 16-18h horas após a indução do hCG. A: folículo mostrando crescimento folicular, B: folículos atrésicos. Fotomicrografia obtida por microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x).



Fonte: Autoria própria

Figura 7 - Oócitos avaliados como intacto (A) e atrésico (B) após 11 dias de cultivo de folículos ovarianos murinos isolados. Fotomicrografia obtida por microscópio invertido (Olympus MII, Japão, 400x).

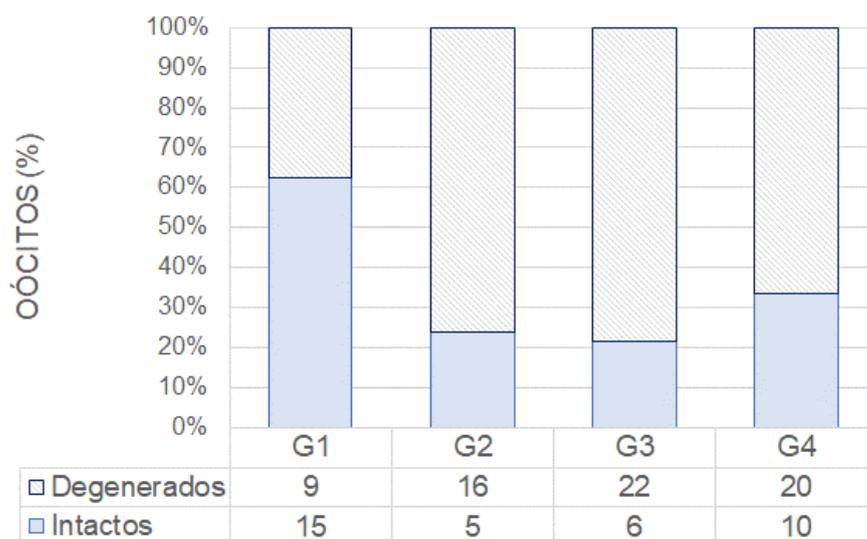


Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Boxplot das superfícies foliculares em μm^2 entre o início (D1) e o final da cultura (D11) nas 4 condições testadas (G1: HSA 10% + ITS 1%, G2: PLTM 10% + ITS 1%, G3: HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%, G4: HSA 5% + ITS 5% + PLTM 5%). Comparação estatística por ANOVA e testes post hoc.

Os tamanhos iniciais e finais foram significativamente diferentes para os grupos G1, G2 ($p < 0,001$) e G4 ($p < 0,01$), enquanto que o crescimento folicular do grupo G3 não foi significativo ($p = 0,104$) (Tabela 2).

Ao todo foram recuperados oócitos intactos ou degenerados (Figura 7), o número total oscilando entre 21 e 30 por grupo. O grupo G1 destaca-se pelo maior número de oócitos intactos (>50%) em relação aos demais (<35%) (Figura 9). Essa diferença é significativa ($\chi^2 : (N=103,3) = 11,4, p=0,01$).



Fonte: Autoria própria

Figura 9 - Distribuição de oócitos intactos e degenerados recuperados dos grupos (G1: HSA 10% + ITS 1%, G2: PLTM 10% + ITS 1%, G3: HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%, G4: HSA 5% + ITSS 5% + PLTM 5%).

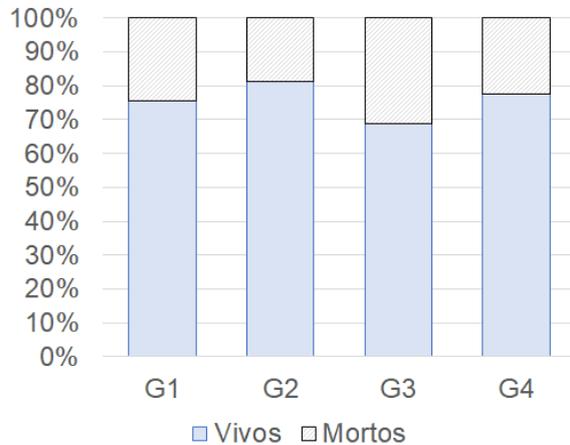
Tabela 2 - Superfícies foliculares iniciais e finais nos 4 grupos de estudo. N representa o número de folículos obtidos em 3 experimentos, nos quais as 4 condições foram testadas em paralelo.

Grupos	N	Superfície inicial x 10 ³ μm ²	Superfície final x 10 ³	p
		Média ± DP	μm ² Média ± DP	
G1(HSA 10%+ITS 1%)	33	17.94 ± 0.69	57.27 ± 4.04	< .001
G2 (PLTM 10% + ITS 1%)	38	18.76 ± 0.71	33.85 ± 3.75	< .001
G3 (HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%)	37	20.45 ± 0.76	24.53 ± 2.43	0.104
G4 (HSA 5% + ITS 5% + PLTM 5%)	38	19.29 ± 0.74	31.27 ± 3.97	0.006

Fonte: Autoria própria

Finalmente, a vitalidade celular dos folículos no final da cultura e a distribuição de células mortas/vivas são apresentadas na Figura 10. Todos os 4 grupos apresentaram taxas de

vitalidade acima de 70%. Estatisticamente, essas taxas são significativamente diferentes em um teste qui-quadrado ($\chi^2 : (N=2958,3) = 19,1, p<0,01$).



Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Vitalidade celular (%) dos folículos no final do período de cultura nas quatro condições testadas (G1: HSA 10% + ITS 1%, G2: PLTM 10% + ITS 1%, G3: HSA 10% + ITS 1% + PLTM 10%, G4: HSA 5% + ITSS 5% + PLTM 5%). Comparação estatística por ($\chi^2 (N=2958,3) = 19,1, p<0,01$).

Em conjunto, esses resultados indicam que o uso de PLTM, nas concentrações utilizadas, não favoreceu o desenvolvimento folicular *in vitro*, o resultado do aumento da superfície dos folículos foi inferior ao grupo que utilizou como suplementação o HSA. Embora o PLTM tenha apresentado ainda oócitos intactos e viabilidade celular.

3.3 Discussão

A cultura *in vitro* dos folículos ovarianos isolados é uma técnica emergente, abordada na área da oncofertilidade e que está se tornando uma alternativa à preservação da fertilidade feminina.

Para algumas mulheres diagnosticadas com câncer, por exemplo, as com baixa reserva ovariana e as pobres respondedoras ao estímulo hormonal, as técnicas ofertadas para preservação da fertilidade, como criopreservação de oócitos e embriões, não são a melhor escolha. Nestes casos, a recuperação do número de oócitos pode ser muito baixo e não garantiria a fertilidade no futuro.

Outros casos, como as mulheres com câncer hematológico, a proposta de criopreservação de tecido ovariano e reimplante posterior, estão sujeitas ao risco de reintrodução de células neoplásicas (Salama e Woodruff 2019).

A técnica de cultivo de folículos ovarianos isolados poderia beneficiar estas mulheres, e crianças também, pois após a retirada de fragmentos ovarianos, os folículos podem ser isolados e cultivados antes ou após a criopreservação (Kim et al. 2005; Rajabzadeh et al. 2020). Várias abordagens foram descritas para o isolamento de folículos pré-antrais de fragmentos ovarianos e sua cultura *in vitro* (Figueiredo e Lima 2017; Pazoki et al. 2015; Xu et al. 2021).

Optamos por trabalhar com folículos mecanicamente isolados cultivados em um meio entre duas camadas de óleo mineral. Este método tem uma vantagem sobre o sistema de cultura bidimensional, pois impede a adesão celular à superfície da placa de cultura, preservando a estrutura tridimensional do folículo (Nikiforov et al. 2018). Este modo também garante a entrega homogênea de nutrientes ao folículo, promove a manutenção de junções intercelulares e ajuda a manter o oócito dentro das camadas de células granulosas (Asaduzzman et al. 2018; Heiligkeitag e Eichenlaub-Ritter 2018). No entanto, Shea et al. (2014), relatam que culturas tridimensionais usando uma matriz de gel têm limitações no fornecimento de nutrientes para a massa tecidual em desenvolvimento, já que a substância em que o folículo é encapsulado exerce um controle inibidor sobre a iniciação do crescimento folicular.

Nosso estudo mostra que o uso de plaquetas PLTM, sozinho ou em conjunto com o HSA, reduz significativamente o crescimento folicular em comparação com o grupo que utiliza apenas HSA (Figura 8). Os tamanhos iniciais dos folículos coletados foram iguais nos quatro grupos testados ($p=0,09$). As diferenças de tamanho observadas após 11 dias de cultura não poderiam, portanto, estar associadas à homogeneidade dos folículos inicialmente selecionados.

Observou-se crescimento folicular significativo em todos os grupos, com exceção do grupo G3, que continha PLTM de 10% e 10% HSA (Tabela 2). Os folículos desse grupo apresentaram vitalidade celular significativamente menor (~70%) ($p<0,01$, Figura 10) do que os de outros grupos (~80%). A quantidade de proteína adicionada a esse grupo (10% HSA, 10% PLTM) foi maior do que a adicionada aos outros grupos com 10% HSA, 10% PLTM e 5% HSA + 5% PLTM. Essa combinação pode ter causado uma inibição da proliferação celular. A identificação de fatores que promovam o desenvolvimento folicular ou induzam a atresia é um dos principais objetivos da pesquisa sobre foliculogênese. As vias extrínsecas e intrínsecas da indução da apoptose nas células de granulosa ainda não estão claramente definidas, mas incluem a ausência de fatores de crescimento ou a presença de estímulos citotóxicos (Demeestere et al. 2005).

Um estudo sobre folículos pré-antrais encapsulados em gel de fibrina transplantado na região subcutânea de ratos mostrou após 14 dias uma maior taxa de sobrevivência na presença de 15% de lisado de plaquetas (LP) em comparação com 5%, 10% e 20% de concentrações, enquanto o crescimento e o amadurecimento do folículo não diferem do controle sem LP (Rajabzadeh et al. 2015). Semelhante aos resultados do nosso estudo, o LP derivado do cordão umbilical levou ao menor crescimento dos folículos e à secreção estradiol em relação ao soro fetal bovino (Pazoki et al. 2015). No entanto, os folículos cultivados em 5% das concentrações de LP apresentaram a maior taxa de sobrevivência (93,5%), com menor formação de folículos anormais (4,1%), mas sem apresentar maturação oocitária. No mesmo ano, Pazoki et al. (2015), cultivaram oócitos com e sem células da granulosa e verificaram que a presença de LP no meio de cultivo favoreceu a maturação oocitária,

Em um estudo sobre a proliferação de células epiteliais da córnea humana, o PLTM induziu efeitos inibitórios maiores do que a suplementação do soro bovino fetal (SFB) (Huang et al. 2017), em contraste, esse efeito não foi observado em outras linhagens celulares, como fibroblastos, células endoteliais ou células tumorais (Burnouf et al. 2016). Assim, diferentes tipos de células apresentam respostas distintas quando cultivadas na presença de PLTM (Kakudo et al. 2019). De acordo com nossos resultados, na presença do PLTM, as células foliculares murinas não apresentaram o mesmo desempenho proliferativo que o HSA promoveu, porém, as respostas podem ser diferentes em outras concentrações.

Em nosso estudo, observamos a presença de oócitos imaturos e/ou degenerados liberados espontaneamente dos folículos ovarianos, antes do fim do período de cultivo. Tais ocorrências já foram descritas (Murase et al. 2018). Foi proposto que os folículos ovarianos cultivados com LP secretam uma maior quantidade de progesterona em comparação com o grupo complementado com o SFB, fato que pode explicar a liberação precoce de oócitos imaturos de folículos. Como a progesterona é um dos fatores responsáveis pela maturação do oócito e pela ovulação final, foi sugerido que o LP poderia ser usado *in vitro* para induzir a ovulação (Pazoki et al. 2015). Em outro estudo do mesmo autor, os oócitos desnudados amadurecem em meio contendo menor concentração de hPL (5%) e apresentam maior taxa de maturação (75%) em relação ao grupo tratado com SFB (60%) (Pazoki et al. 2015).

Em nosso estudo, foi encontrado maior número ($p=0,01$) de oócitos degenerados nos grupos que contêm PLTM em comparação com o grupo que contém HSA. Embora as células foliculares tenham conseguido sobreviver no meio com PLTM, elas podem não ter sido capazes de fornecer os elementos necessários para manter a viabilidade oócito. A saída precoce dos oócitos também pode ser resultado de micro-lesões causadas à membrana folicular durante o

isolamento mecânico, realizada neste estudo. Folículos mecanicamente isolados apresentam menor viabilidade logo após o isolamento, no entanto, após a cultura, proporciona maior crescimento, sobrevivência folicular e oócitos maduros em comparação com o isolamento enzimático (Kim et al. 2018).

Observamos em nosso estudo que a proliferação celular e o aumento na superfície folicular não apresentaram homogeneidade independentemente dos grupos testados, sugerindo que a individualidade do folículo pode ser mediada por muitos fatores. Xu et al. (2010), também observaram três coortes distintas de folículos secundários de macacos cultivados *in vitro*, ou seja: folículos sem crescimento, folículos de crescimento lento (o dobro do tamanho) e folículos de rápido crescimento (pelo menos o triplo do diâmetro). As diferenças no crescimento dos folículos ovarianos humanos também foram demonstradas em outro estudo dos mesmos autores (Xu et al. 2009). Os folículos secundários são heterogêneos em sua capacidade de crescer *in vitro*, sendo uma possível resposta do folículo a estímulos hormonais, bem como sua capacidade de responder e produzir outros fatores de crescimento (Telfer e Zelinski 2013).

O crescimento folicular é regulado por uma complexa interação de fatores metabólicos extra-ovarianos e sinais endógenos. A elucidação desses sistemas de controle é um dos grandes desafios para uma melhor compreensão dos processos envolvidos na foliculogênese ovariana e na aquisição de oócitos viáveis (Scaramuzzi et al. 2011; Martins et al. 2008). Os folículos ovarianos têm vários fatores parácrinos que regulam seu desenvolvimento, a ausência desses fatores pode levar à proliferação de células de granulosa sem a maturação nuclear e citoplasmática adequada do oócito. Este fato pode explicar por que os oócitos obtidos *in vitro* podem não ser competentes para fertilização e desenvolvimento embrionário (Guzel e Oktem 2017). No entanto, oócitos e nascimentos competentes foram obtidos de folículos primordiais murinos (O'Brien et al. 2003), tecido ovariano murino vitrificado pré-antral (Wang et al. 2011), e em humanos (Yang et al. 2020; Xu et al. 2021).

No nosso conhecimento, este estudo mostrou pela primeira vez o uso do PLTM no desenvolvimento folicular *in vitro*. Isto faz com que este componente seja um candidato interessante para suplementação que merece ser mais explorado, especialmente para as concentrações utilizadas. São necessários estudos sobre o desenvolvimento folicular *in vitro* em combinação com a criopreservação de folículos pré-antrais, pois estas técnicas podem oferecer uma opção real para a preservação da fertilidade no futuro em mulheres que precisam se submeter a tratamentos quimioterápicos imediatos, bem como para meninas em idade prepuberal.

CAPÍTULO 2

4 PROTÓTIPO PARA CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

A criopreservação seminal é uma técnica tradicional e amplamente utilizada em clínicas de reprodução assistida em todo o mundo. A técnica pode ser realizada de maneira automatizada, mas também de forma manual e está sujeita a inúmeros protocolos e metodologias de resfriamento gradativo das amostras seminais (Tao et al. 2020).

A falta de uma padronização nas rotinas dos bancos de sêmen e clínicas de reprodução é questionada, assim como na literatura, havendo necessidade de estudos e desenvolvimento de técnicas que possam ser seguras e reprodutíveis (Rios e Botella 2019).

Uma das etapas da criopreservação do sêmen é a exposição das palhetas de envase no vapor de N₂L. A maioria dos estudos omite a forma como realizam esta etapa, principalmente quanto ao suporte das palhetas utilizado. Este fato pode dificultar a comparação de resultados quanto as taxas de sobrevivência espermática após a criopreservação, além de não haver uma padronização.

O desenvolvimento de um protótipo tridimensionalmente impresso em termoplástico pode contribuir para aumentar a reprodutibilidade desta etapa, além de oportunizar a possibilidade de modificações que atendam os protocolos diferenciados de criopreservação.

4.1 Materiais e Métodos

Aprovação ética

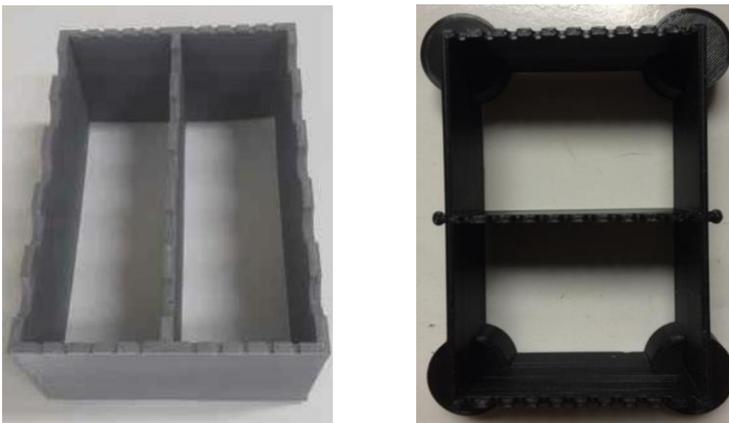
Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, SC, Brasil), que foi aceito sob o parecer nº 5.393.194, e CAAE: 39941420.2.0000.0120. Todos os voluntários, com mais de 18 anos de idade, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da participação.

Desenvolvimento do protótipo de criopreservação

Com o objetivo de conhecer as metodologias rotineiramente utilizadas nas clínicas de Reprodução Humana Assistida (RHA) e bancos de sêmen foi elaborado um questionário (Apêndice 1) em um aplicativo de gerenciamento de pesquisas *online* (*Google Forms*). O link deste formulário foi enviado no mês de janeiro/2021, via *WhatsApp*, para um grupo de aproximadamente 200 embriologistas do Brasil e do Canadá. Observou-se então a necessidade do desenvolvimento de um protótipo para criopreservação seminal.

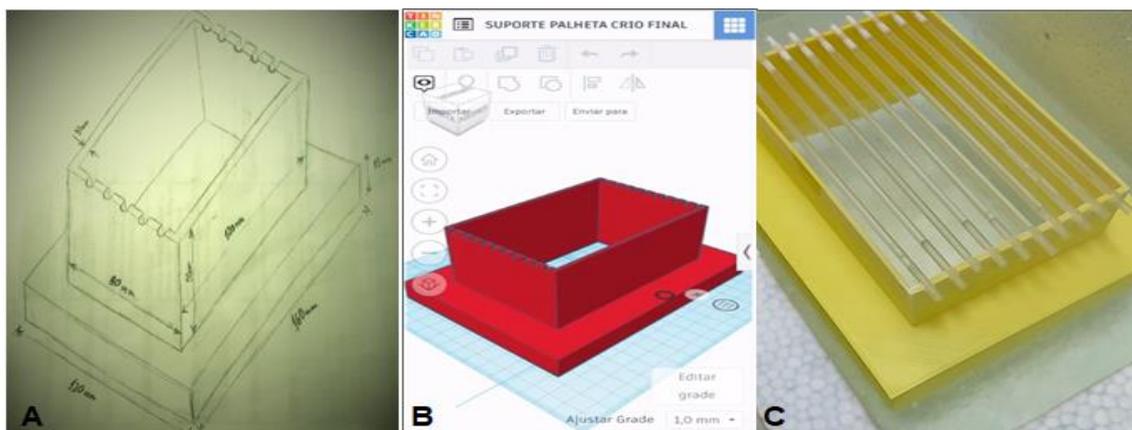
Dois modelos foram propostos e desenvolvidos com impressão 3D, como mostrado na Figura 11. Porém não foram aprovados quanto a flutuabilidade, manuseio e segurança. Posteriormente foi elaborado um protótipo composto por um paralelepípedo vazio com 12 cm x 8 cm x 5 cm (C x L x A), sobreposto sobre uma base flutuante 16 x 12 x 1,5 cm (C x L x A), projetado em um programa de modelagem tridimensional (AUTODESK, Tinkecard) e impresso em 3D com filamentos de acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS) como visto na Figura 12. Este protótipo pode acomodar 10 palhetas fixadas por reentrâncias em posição horizontal. A parte imersa do protótipo em flutuação no N₂L não excede a 1,5 cm, assim as palhetas ficam a uma altura de 5 cm.

A durabilidade e resistência do suporte foi verificada por imersões sucessivas (>300) em N₂L sem que o material mostrasse quaisquer sinais de alteração na textura, forma ou rigidez. A segurança no manuseio das palhetas durante todo o processo também foi aprovada, assim como a possibilidade de higienização a cada utilização.



Fonte: Autoria própria

Figura 11 - Protótipos desenvolvidos e reprovados em testes de manuseio e segurança e flutuação no N₂L.



Fonte: Autoria própria

Figura 12 - **A:** Croqui do suporte de palhetas para criopreservação seminal, **B:** Projeção tridimensional do protótipo e **C:** Protótipo impresso com ABS em 3D, vista de cima do suporte de palhetas, consistindo num paralelepípedo vazio que fica sobre uma base flutuante. As reentrâncias permitem que 10 palhetas sejam colocadas horizontalmente e de forma estável.

Coleta e análise dos parâmetros iniciais do sêmen

As amostras seminais (N=40) foram coletadas entre 2021 e 2022, de homens com idade entre 22 e 46 anos, provenientes de espermogramas realizados em um banco de sêmen localizado em Itajaí/SC. Sendo que 20 amostras foram usadas para o teste de posicionamento das palhetas no protótipo em ABS e 20 amostras para o teste comparativo com um suporte em EPS. O ejaculado foi obtido por masturbação após 2-5 dias de abstinência e imediatamente incubado a 37°C, até a completa liquefação. As concentrações espermáticas foram determinadas com o uso de uma câmara de contagem (Makler®), as motilidades foram determinadas sob um microscópio com magnificação de 200x e classificadas como progressivas, não progressivas e imóveis. A vitalidade foi determinada após a mistura de partes iguais do esperma e do corante isotônico de eosina (0,5%), pela observação microscópica (400x) das preparações entre lâmina e lamínula. A vitalidade é expressa como a porcentagem de espermatozoides sem coloração. Para a morfologia, os esfregaços de sêmen fresco foram corados pelo DiffQuick (Panótico, Laborclin, Brasil) e 200 espermatozoides foram observados sob microscopia (1000x). As recomendações da WHO (2021) foram seguidas para a análise seminal de base.

Análise da Fragmentação do DNA espermático

A taxa de fragmentação do DNA espermático foi determinada pelo método da dispersão da cromatina (SCD) adaptado de Fernández et al. (2003). As amostras de sêmen foram diluídas

num meio de cultura (GV-HEPES, Ingámed, Maringá, Brasil) para atingir uma concentração final de esperma de aproximadamente 15×10^6 /mL. Lâminas microscópicas foram pré-cobertas com uma solução 0,65% de agarose (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). Posteriormente, 70 μ L de sêmen foram adicionados a 30 μ L agarose de baixo ponto de fusão e 30 μ L dessa solução foram colocados na lâmina pré-tratada com agarose e cobertas e pressionadas por lamínula, sendo resfriadas (4° C) por cinco minutos e em seguida as lamínulas foram delicadamente removidas.

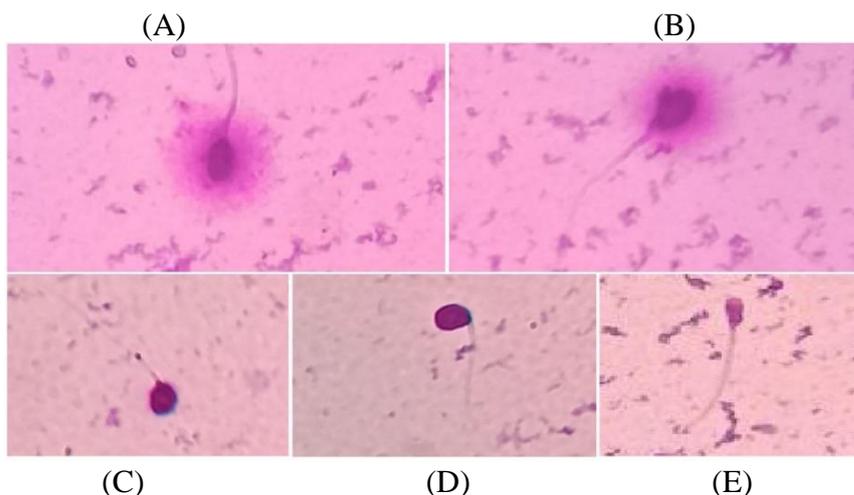
Para elaboração das próximas soluções para o tratamento das lâminas foram utilizados os seguintes produtos:: HCl (Laboratórios de Produtos Anidrol, São Paulo, Brasil), Tris-HCl (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), dithiothreitol-DTT (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), dodecyl sulfato de sódio (SDS, AppliChem, Alemanha), EDTA (Uniscience, São Paulo, Brasil), NaCl (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), solução tampão fosfato (PBS, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), e corante Panótico Rápido (Laborclin, Paraná, Brasil).

O teste SCD envolveu a execução de várias das seguintes soluções para os tempos indicados.

1. Solução de desnaturação (0,08N HCl) durante 7 min.;
2. Solução de lise A (Tris-HCl 0,4 M, DTT 0,8 M, SDS 1%, EDTA 50mM), pH 7,5 durante 10 min;
3. Solução de lise B (Tris-HCl 0,4 M, SDS 1%, NaCl 2M), pH 7,5 durante 5 min;
4. Solução de lavagem (PBS) durante 5 min;
5. Série alcoólica (70% e 100%) durante 2 min cada.

As lâminas foram deixadas secar ao ar ambiente antes de serem coradas com o Panótico. Foram considerados os graus dos halos formados (halo ausente e degradado, halo ausente, pequeno, médio e grande). Os espermatozoides com DNA fragmentados são aqueles que não apresentaram halo de dispersão de cromatina e degradados (sem halo, com a cabeça fragmentada em grânulos ou com coloração muito fraca) e espermatozoides com halo pequeno: espessura do halo $\leq 1/3$ do diâmetro da cabeça. São considerados espermatozoides não fragmentados aqueles com halo grande (dispersão $\geq 3x$ do diâmetro da cabeça) e com halo médio (dispersão $> 1/3$ e $< 3x$ do diâmetro da cabeça) (Figura 13). O Índice de Fragmentação (IDF) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IDF (\%)} = (\text{N}^\circ \text{ espermatozoides fragmentados} / \text{N}^\circ \text{ espermatozoides contados}) * 100$$



Fonte: Autoria própria

Figura 13 - Fotomicrografia obtida em Microscópio Olympus CKX41 (400X) de espermatozoides após realização do teste SCD. A – halo grande; B – halo médio; C – halo pequeno; D – halo ausente; E – degradado e halo ausente.

Monitoramento da temperatura de resfriamento

As temperaturas das amostras e do ar ambiente no laboratório foram medidas durante todo o processo de congelamento usando dois pares térmicos certificados e calibrados (Akso[®], Akso Instrumentos de medição, Brasil), um colocado no ar ambiente do laboratório, o outro no interior de uma das palhetas com sêmen + meio de congelamento, colocadas sobre o protótipo. Seis séries de medidas foram feitas entre março e agosto de 2021. As temperaturas medidas foram consideradas altamente reprodutíveis, independentemente da posição da palheta contendo o termopar no suporte (Figura 17) ou variações externas na temperatura do laboratório.

Teste 1. Criopreservação de amostras dispostas em diferentes posições no protótipo

As amostras foram primeiramente analisadas (Banco de Sêmen CrioVita/SC) como parte de um spermograma e selecionadas com base em valores normais. Foram então transportados para outro laboratório (LBR-Laboratório de Biotecnologia da Reprodução/Univali) onde foram realizados os testes de congelamento. As amostras seminais foram transportadas por aproximadamente 15 min, mantidas a temperatura ambiente em tubos cônicos. A sequência de operações experimentais é descrita na Figura 14. A fim de reduzir a interferência do plasma seminal, as amostras de sêmen foram diluídas (1:1) com meio de cultura (GV-HEPES, Ingámed, Maringá, Brasil) em um tubo cônico e centrifugadas (300 g/ 10 min). Após a remoção do

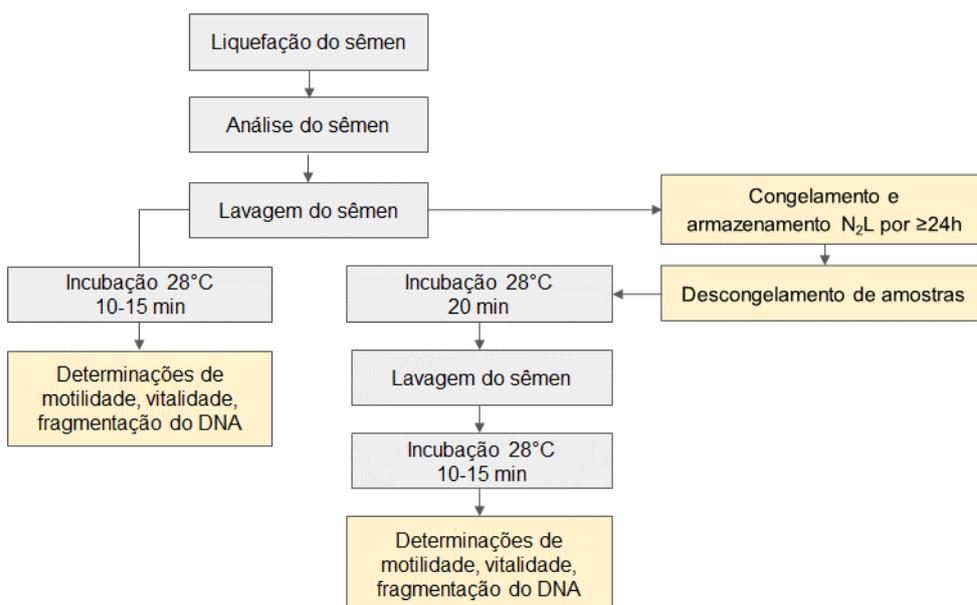
sobrenadante, os sedimentos foram ressuspensos em 600 μL do mesmo meio GV-HEPES e analisados os parâmetros motilidade, vitalidade e fragmentação do DNA.

As amostras de sêmen lavadas foram diluídas com meio de congelamento (Ingá Sperm Freezing, Ingámed, Maringá, Brasil) que possui gema e glicerol na sua composição, na proporção 1:1 e envasadas em 3 palhetas de 0,5 mL. Estas palhetas, previamente identificadas, foram colocadas no suporte nas posições 1, 5, 10. Foram impostos três períodos de resfriamento transferindo o protótipo por 20 minutos para um refrigerador (4 ± 2 °C), depois por 10 minutos para uma caixa de poliestireno expandido medindo 15,5 x 13,7 x 27,5 cm (C x L x A) contendo aproximadamente 750 mL de N_2L , com o protótipo em modo de flutuação. No final dessas operações, as palhetas foram liberadas do suporte e imersas em N_2L , antes de serem transferidas para um botijão criogênico. Ao final do período de criopreservação (≥ 24 h), as palhetas foram retiradas do recipiente criogênico e mantidas por 20 min a 28 °C. As amostras descongeladas foram lavadas como descrito acima e os sedimentos ressuspensos em 400 μL de GV-HEPES. Os parâmetros motilidade e vitalidade foram analisados e verificada a fragmentação do DNA espermático.

As taxas de recuperação R (%) foram calculadas para cada amostra tomando as proporções de pré-congelamento e pós-descongelamento dos valores medidos.

$$R (\%) = (\text{Medida})_{\text{Pós-descongelamento}} / (\text{Medida})_{\text{Pre-congelamento}} \times 100.$$

onde Medida = [motilidade total, vitalidade].

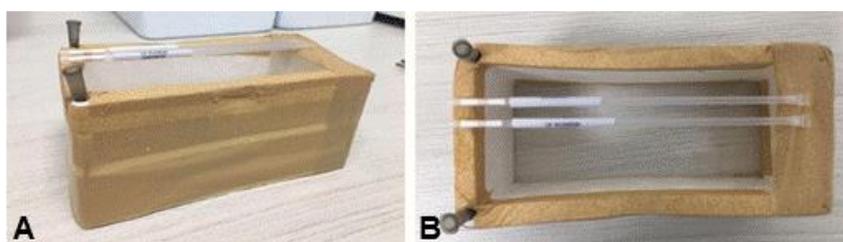


Fonte: Autoria própria

Figura 14 - Fluxograma das etapas experimentais para o teste de posicionamento das palhetas no suporte. Cada amostra foi tratada separadamente.

Teste 2. Criopreservação com o uso do protótipo em ABS vs. Suporte de palhetas em EPS (Controle)

O protocolo de criopreservação para este teste foi com a utilização de um suporte de poliestireno expandido (EPS) fabricado manualmente e usado rotineiramente em um banco de sêmen localizado em Itajaí-SC. O suporte de EPS foi confeccionado no formato de paralelepípedo vazado, com dimensões de 12 x 8 x 5,5 cm (C x L x A), revestido com fita isolante para aumentar sua durabilidade (Figura 15).



Fonte: Autoria própria

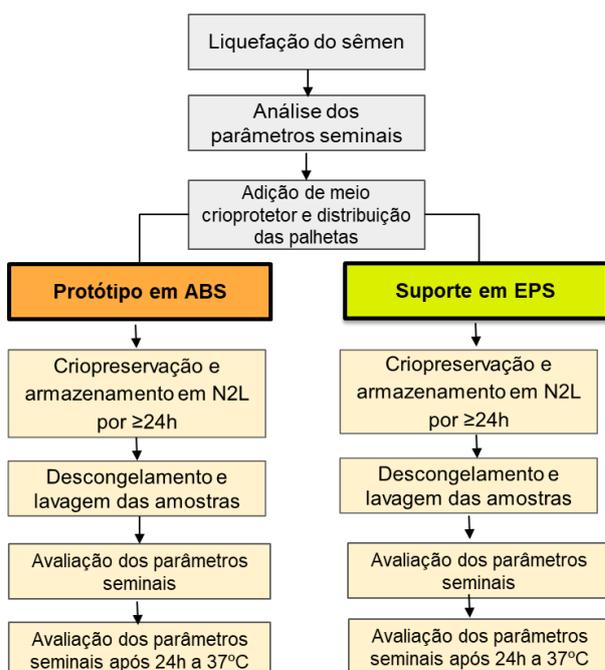
Figura 15 – Dispositivo confeccionado manualmente em poliestireno expandido (EPS) utilizado como suporte de palhetas com amostras seminais para flutuação em vapor de N₂L durante a criopreservação. Vista lateral em A e superior em B.

As amostras (N=20) foram criopreservadas utilizando o meio diluidor Test-Yolk Buffer (TYB ®, Irvine Scientific, USA) na proporção de 1:1 e o conteúdo foi envasado em 4 palhetas de 0,5 mL devidamente identificadas. Duas palhetas foram inseridas no protótipo em ABS nas regiões 5 e 6, próximas ao centro, enquanto outras duas foram colocadas no suporte confeccionado em EPS. Em seguida foram iniciadas as etapas de resfriamento, devidamente iguais para ambos os suportes.

Os dois suportes contendo as palhetas passaram inicialmente 20 minutos em um refrigerador (4 ± 2 °C), em seguida foram transferidos para uma caixa de EPS com dimensões de 15,5 x 13,7 x 27,5 cm (C x L x A) contendo aproximadamente 750 mL de N₂L, onde os suportes ficaram flutuando e mantendo as palhetas expostas ao vapor de N₂L durante 10 minutos. Ao final das duas etapas, as palhetas foram liberadas dos suportes e imersas em N₂L, e posteriormente transferidas para um botijão criogênico, permanecendo durante um período maior que 24 horas antes do início do descongelamento e análises dos parâmetros espermáticos.

Para ao descongelamento as palhetas foram aleatoriamente retiradas do botijão criogênico e mantidas em estufa bacteriológica a 37° C durante 20 minutos. As amostras foram

diluídas lentamente na proporção 1:1 em meio GV-HEPES® (Meio tamponado HEPES, Ingámed Materiais Médicos e Hospitalares, BR). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspendido em 500 µL do mesmo meio GV-HEPES. As amostras foram mantidas a 37° C durante 10 minutos e em seguida foram realizadas as análises de motilidade, vitalidade e a realização técnica de fragmentação de DNA espermático com a mesma metodologia já citada no teste anterior. A motilidade e vitalidade espermática foram avaliadas por três observadores. A análise da fragmentação do DNA espermático foi realizada por dois observadores. Após as análises, as amostras foram mantidas a 37° C por mais 24h, para demonstrar a resistência espermática, e analisados os mesmos parâmetros espermáticos. A metodologia para este teste está demonstrada no fluxograma da Figura 16.



Fonte: Autoria própria

Figura 16 - Fluxograma das etapas experimentais para o teste comparativo da criopreservação de amostra seminal distribuídas entre o Protótipo em ABS e o suporte em EPS

Análise estatística

Os dados foram armazenados em uma planilha Excel. O software estatístico Jamovi (versão 1.6.23.0, Sydney, Austrália) foi usado para avaliação estatística dos dados. Os testes ANOVA e t-STUDENT foram utilizados para analisar as variáveis contínuas (motilidade,

viabilidade, fragmentação). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para os valores $p < 0,05$.

4.2 Resultados

O resultado da pesquisa com os embriologistas quanto a metodologia de criopreservação mostrou que das 36 respostas obtidas, 83% indicaram o uso de sistema de congelamento com etapa de vapor de N_2L . Sobre o suporte de palhetas usado para o processo, 58,3% responderam que este era improvisado manualmente, sendo que 44,4% são feitos de metal, 36% de poliestireno expandido (Isopor[®]), 14% de polipropileno ou outros materiais (6%).

Estes dados confirmaram o interesse em desenvolver um protótipo projetado para aumentar a segurança e a reprodutibilidade desta técnica.

Características das amostras seminais usadas no teste 1 (posicionamento das palhetas)

As características seminais das amostras utilizadas para o teste do posicionamento das palhetas no protótipo estão demonstradas como valores médios \pm desvios padrão e valores de referência da WHO (2021) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores (média \pm desvio padrão) dos principais parâmetros seminais iniciais das amostras (N=20) usadas para o teste de posicionamento das palhetas).

Parâmetros	Média \pm DP	Medianas (Min, Máx)	OMS referência*
Volume (mL)	3.6 \pm 1.6	3,3 \pm 1.9	\geq 1,4
Ph	7.8 \pm 0.4	7.6 \pm 0.5	\geq 7.2
Concentração ($\times 10^6$ /mL)	58.8 \pm 37.2	61,1 \pm 27,6	\geq 16
Total espermatozoides ($\times 10^6$)	188,9 \pm 113,7	201,6	\geq 42
Motilidade progressiva (%)	51.5 \pm 8.6	40,4 \pm 5,2	\geq 30
Não progressivos (%)	22.1 \pm 4.8	24,7 \pm 5,2	\geq 1
Motilidade total (%)	73,6 \pm 6,3	65,1 \pm 4,9	\geq 42
Vitalidade (%)	78.6 \pm 5.4	71,2 \pm 1.4	\geq 54
Morfologia normal (%)	4.5 \pm 1.4	4.3 \pm 0,3	\geq 4

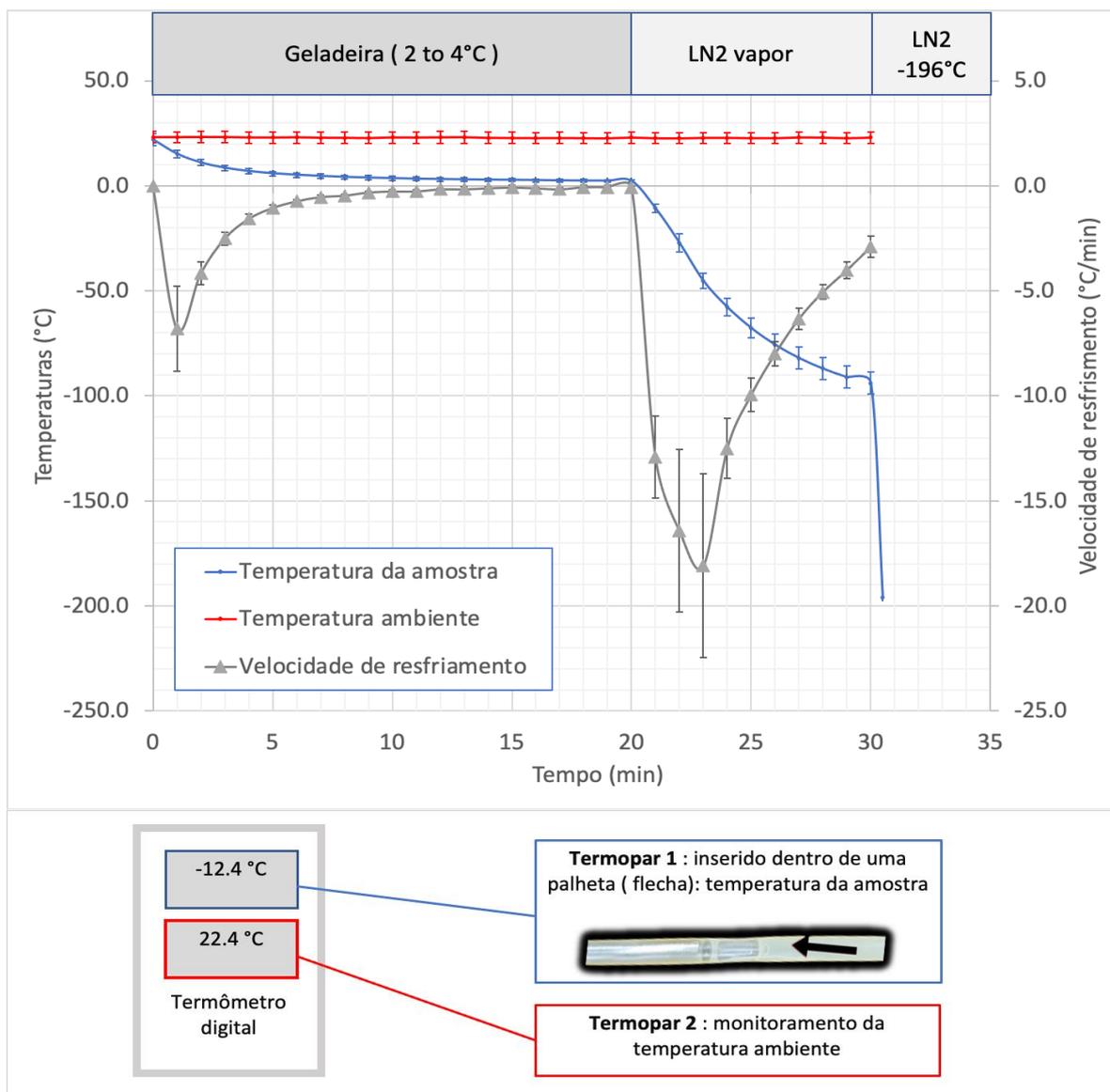
Fonte: Autoria própria

Legenda: *: WHO (2021): 5th centile

Medição de temperaturas durante o processo de resfriamento com o uso do protótipo

A temperatura ambiente no laboratório e a temperatura dentro de uma palheta colocada na posição 5 do protótipo em ABS e foram medidas durante 6 experimentos utilizando 2 pares térmicos. Os valores registrados são mostrados na Figura 17. Três estágios podem ser distinguidos: 1) a passagem através do refrigerador a uma temperatura entre 2-4° C; 2) a transferência do dispositivo flutuante para N₂L em uma caixa de poliestireno expandido coberta, com as palhetas a uma distância de 5 cm acima da superfície do nitrogênio; 3) a deposição das palhetas em nitrogênio líquido.

As variações de temperatura nestas três situações mostram uma diminuição da temperatura em direção a um ponto de equilíbrio: +2° C para a fase 1 após 20 min, -99° C para a fase 2 após 20 min, -196° C para a fase 3 após <1 min. Com base na observação de que estas curvas eram notavelmente reproduzíveis, o monitoramento da temperatura não foi realizado sistematicamente ao congelar as amostras nos experimentos seguintes.



Fonte: Autoria própria

Figura 17 – As temperaturas foram registradas a cada minuto usando dois termopares (Akzo Instrumentos, Brasil), um inserido em uma palheta de controle, na posição 5 do protótipo, e o segundo no ar ambiente. Três períodos de resfriamento foram monitorados: 1) por vinte minutos em um refrigerador, 2) por dez minutos em uma bandeja de poliestireno expandido contendo N₂L, com o suporte em modo de flutuação, 3) por um período variável em N₂L com as palhetas liberadas do protótipo.

Parâmetros seminais antes e após o congelamento (teste do posicionamento das palhetas)

Os parâmetros de motilidade e vitalidade foram medidos antes do congelamento e após o descongelamento das amostras seminais. Os valores estão relatados na Tabela 4. Diferenças significativas são observadas para ambos os parâmetros.

Tabela 4 – Valores (média \pm desvio padrão) de motilidade progressiva, não progressiva, formas imóveis, vitalidade e fragmentação pré-congelamento e pós-descongelamento.

Parâmetros seminais	Pré-congelamento	Pós-descongelamento	<i>p</i>
Motilidade progressiva (%)	40.4 \pm 10.1	12.7 \pm 9.6	<0.001
Não progressiva (%)	23.8 \pm 4.2	13 \pm 4.4	<0.001
Motilidade total (%)	64.2 \pm 8.8	25.7 \pm 13.1	<0.001
Imóveis (%)	35.8 \pm 8.8	74.4 \pm 13.1	<0.001
Vitalidade (%)	72.9 \pm 8.2	39.5 \pm 9.7	<0.001
Fragmentação do DNA (%)	26.1 \pm 9.6	27.1 \pm 14.2	NS

Fonte: Autoria própria

Os dados também foram analisados em relação à posição das palhetas no protótipo durante o congelamento. A motilidade e vitalidade antes do congelamento e após o descongelamento para as 3 posições 1, 5 e 10 estão relatadas na Tabela 5.A. Nenhuma diferença estatística é observada entre as 3 posições. As taxas de recuperação variam entre 28% e 45% para a motilidade e entre 52% e 55% para a vitalidade. As variações observadas não são significativas ($p>0,3$). As taxas de recuperação da motilidade e vitalidade usando resultados de todas as palhetas congeladas com o protótipo estão demonstrados na tabela 5.B. As taxas de fragmentação do DNA espermático, também não foram modificadas pelo procedimento de congelamento-descongelamento (Tabela 4).

Tabela 5.A. - Motilidade total e vitalidade pré-congelamento e pós-descongelamento em relação à posição das palhetas (1,5 e 10) no protótipo e taxas de recuperação (R). Os valores são médias \pm desvios padrão.

Parâmetros espermáticos	Posição no protótipo			<i>P</i>
	1	5	10	
Motilidade pré-congelamento (%)	63.1 \pm 13.4	64.3 \pm 10.6	64.7 \pm 5.9	>0.3
Motilidade pós-descongelamento (%)	18.0 \pm 7.3	25.4 \pm 13.6	29.6 \pm 14.4	>0.3
R - Motilidade total (%)	28.3 \pm 7.4	38.5 \pm 19.3	45.4 \pm 21.4	0.35
Vitalidade pré-congelamento (%)	71.6 \pm 10.3	72.4 \pm 7.9	73.8 \pm 8.0	>0.3
Vitalidade pós-descongelamento (%)	37.4 \pm 9	39.2 \pm 10.3	40.6 \pm 10.7	>0.3
R - Vitalidade (%)	52.1 \pm 8	53.9 \pm 11	54.9 \pm 13	0.76

Fonte: Autoria própria

Tabela 5.B. - Taxas de recuperação (R) da motilidade e da vitalidade usando resultados de todas as palhetas congeladas com o protótipo. Os valores são médias \pm desvios padrão.

Parâmetros	Taxas de recuperação (%)	
	Média \pm DP	Mediana (Min, Max)
Motilidade	39.4 \pm 18.9	33.2 (18.8, 78.2)
Vitalidade	53.9 \pm 10.9	53.5 (34.2, 73.5)

Fonte: Autoria própria

Características seminais das amostras usadas no teste 2: Protótipo ABS vs. Suporte EPS

As características seminais das amostras seminais utilizadas para o teste de comparação do protótipo em ABS e o suporte em EPS estão demonstradas como valores médios \pm desvios padrão e valores de referência WHO (2021) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores (média \pm desvio padrão) dos principais parâmetros seminais iniciais das amostras (N=20) usadas no teste 2 (comparativo entre o protótipo em ABS e o suporte em EPS).

Parâmetros	Média \pm SD	Medianas (Min, Max)	WHO referência*
Volume (mL)	3,3 \pm 1.9	2,7 (1.3, 8.3)	\geq 1,4
pH	7.6 \pm 0.5	8 (7, 8)	\geq 7.2
Concentração (x 10 ⁶ /mL)	61,1 \pm 27,6	60,0 (12, 115)	\geq 16
Total espermatozoides (x10 ⁶)	201,6	177 (420,43)	\geq 42
Motilidade progressiva (%)	40,4 \pm 5,2	40,5 (33, 54)	\geq 30
Não progressivos (%)	24,7 \pm 5,2	24,5 (15, 33)	\geq 1
Motilidade total (%)	65,1 \pm 4,9	65,0 (52, 72)	\geq 42
Vitalidade (%)	71,2 \pm 1.4	71 (70, 75)	\geq 54
Morfologia normal (%)	4.3 \pm 0,3	4 (2, 7)	\geq 4

Fonte: Autoria própria

Legenda: *: WHO (2021): 5th centile

Parâmetros seminais antes e após o congelamento no teste 2 (comparativo ABS vs. EPS)

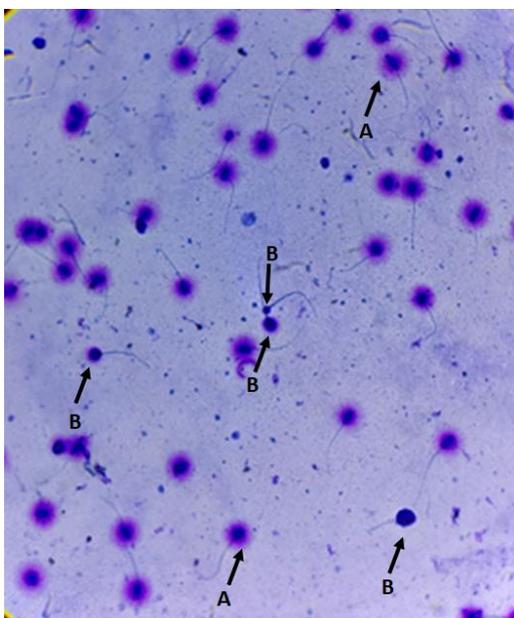
Conforme visualizado na Figura 19, foi verificada uma motilidade total inicial média de 65,5% na amostra fresca e 71,2% na vitalidade. Apresentou uma diferença significativa entre a motilidade antes da criopreservação e após o descongelamento em ambos os grupos ($p < 0,001$). Quando comparados os dois grupos descongelados, não houve diferença significativa ($p = 0,7$).

Após o descongelamento foram obtidas taxas de recuperação da motilidade espermática de 43,6% para o grupo criopreservado utilizando o suporte de EPS e 45,5% para o grupo de

amostras congeladas utilizando o protótipo em ABS. A taxa de recuperação da vitalidade foi de 56,4% para o EPS e 56,6% para o protótipo ABS e não foi verificada diferença significativa entre ambos ($p = 0,9$). As taxas de recuperação da vitalidade e motilidade espermática dos grupos ABS e EPS também não apresentaram diferença significativa após o cultivo por 24 horas a 37° C (Figura 19 e 20).

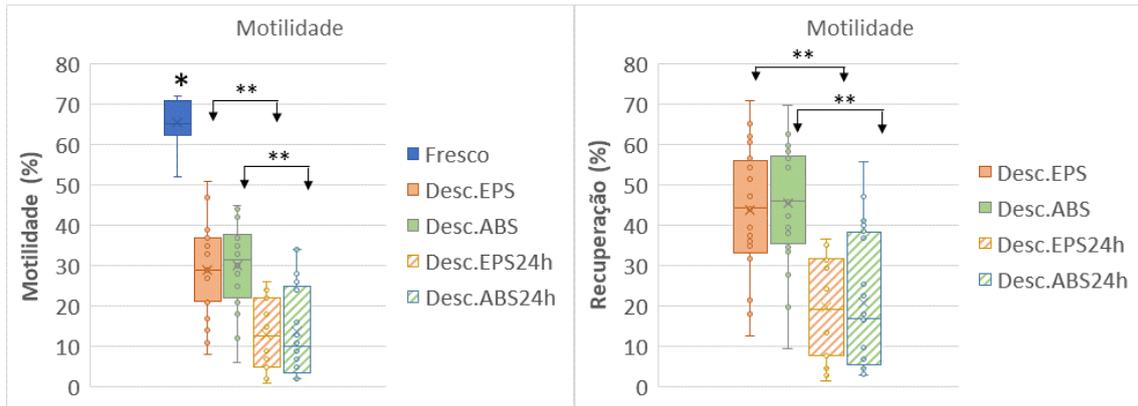
Fragmentação do DNA espermático antes e após a criopreservação no Protótipo em ABS vs. Suporte em EPS

Foi verificado um IDF médio das amostras frescas de 11,56%. Após o descongelamento foi observado um aumento significativo para 25,1% quando congelada no suporte de EPS, e um aumento para 24,9% utilizando o protótipo de ABS. Ambos os grupos congelados apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,001$) quando comparados com a amostra fresca, mas não apresentaram diferença entre si ($p = 0,8$). O IDF verificado após 24 horas de cultivo a 37° C não apresentou diferença entre os grupos EPS e ABS (Tabela 7). A Figura 18 está mostrando imagem microscópica da avaliação do tamanho dos halos na análise da fragmentação de DNA espermático para o cálculo do IDF.



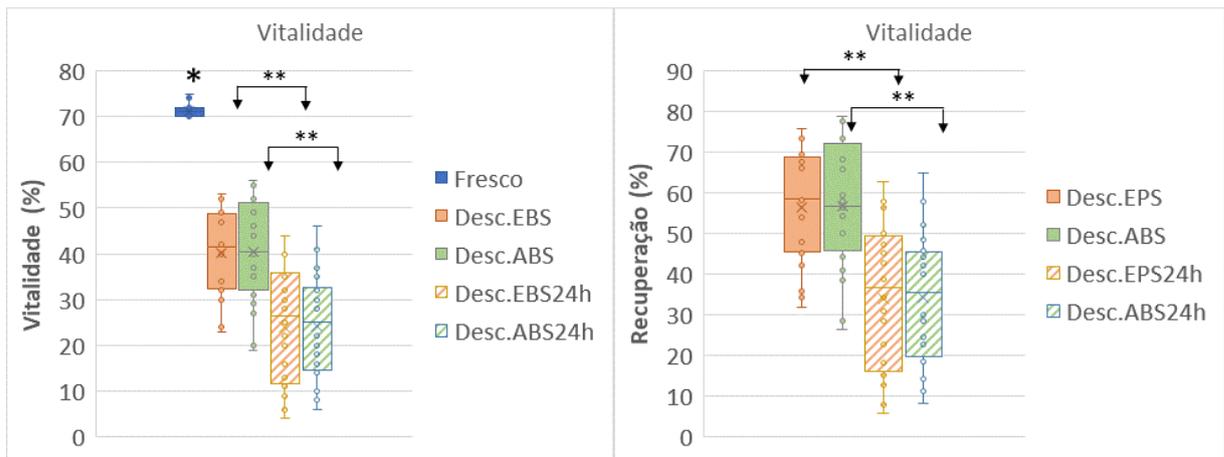
Fonte: Autoria própria

Figura 18 - Imagens microscópicas (400x) dos halos que representam o DNA espermático por meio do teste de dispersão da cromatina espermática (SCD). A: espermatozoides sem fragmentação de DNA, B: espermatozoides com fragmentação de DNA. Fotomicrografia obtida em Microscópio Olympus CKX41 (400X).



Fonte: Autoria própria

Figura 19 - Boxplot da motilidade do sêmen fresco, descongelado e após 24h de cultivo à 37° C, com o uso do suporte em EPS e o protótipo ABS e taxas de recuperação (R). * O sêmen fresco é significativamente ($p < 0,001$) diferente dos demais grupos. ** Diferença significativa ($p < 0,001$) após descongelamento e 24hs de cultivo. Análise pelo test-t de amostras pareadas.



Fonte: Autoria própria

Figura 20 – Boxplot da vitalidade do sêmen fresco, descongelado e após 24h de cultivo à 37° C, com o uso do suporte em EPS e o protótipo ABS e taxas de recuperação (R). * O sêmen fresco é significativamente ($p < 0,001$) diferente dos demais grupos. ** Diferença significativa ($p < 0,001$) após descongelamento e 24h de cultivo. Análise pelo test-t de amostras pareadas.

Tabela 7 - Índice de fragmentação espermático (IDF) após o descongelamento e 24h de cultivo. Letras iguais são usadas para identificar diferenças estatísticas significantes com o test-t de amostras pareadas.

	IDF (%)		IDF 24h (%)	
Sêmen fresco	11.6 ± 9.4	a,b	ND	
Descongelado EPS	25.1 ± 16	a,c	30.7 ± 16.4	d
Descongelado ABS	24.9 ± 18.1	b,c	27.6 ± 15.9	d

Fonte: Autoria própria

Legenda: a,b: $p < 0.001$

c,d: NS

Em conjunto, os nossos achados indicam que o protótipo em ABS possui características físicas favoráveis a manutenção de amostras seminais em todas as etapas de resfriamento, inclusive na etapa de vapor de N₂L. Foi possível conhecer a rampa de resfriamento e verificar também que a posição em que se encontra a palheta não interfere nos resultados da recuperação da viabilidade espermática. Quando comparado com o suporte em EPS não apresentou diferenças nos resultados dos parâmetros seminais avaliados.

4.3 Discussão

A criopreservação seminal é a opção para homens com câncer que irão se submeter ao tratamento oncológico e assim garantir a fertilidade no futuro (Huang et al. 2022). A concentração espermática e a motilidade progressiva geralmente são menores em pacientes com câncer e os índices de fragmentação espermáticas são maiores quando comparados com homens sem a doença (Li et al. 2020). A otimização e reprodutibilidade dos resultados da técnica de congelamento seminal promoverão a segurança necessária a estes homens, que no futuro poderão utilizar os espermatozoides nos ciclos de reprodução assistida.

Neste estudo, foi demonstrado o desenvolvimento de um protótipo que oferece suporte para congelar palhetas de sêmen, utilizando a impressão tridimensional (3-D) e uma resina termoplástica (ABS). Este polímero combina propriedades úteis para nosso protótipo, tais como estabilidade a uma ampla faixa de temperatura, baixa condutividade térmica, resistência ao impacto e à agressão química, resistência à deformação e baixa densidade de massa (Vishwakarma 2017).

O protótipo apresenta flutuabilidade sobre N₂L e suporta mais de 300 ciclos de congelamento-descongelamento e higienização sem alteração estrutural ou o aparecimento de rachaduras ou deformações. Este dispositivo também atende às necessidades dos usuários que foram contatados no período que antecedeu este trabalho. Por exemplo, evita o uso de um

suporte metálico, que tem a desvantagem de ser submergível no N₂L, de induzir trocas de calor heterogêneas e de não permitir o controle da posição das amostras em relação à superfície do N₂L. Também resolve os problemas de durabilidade reduzida dos sistemas de flutuação à base de EPS, que embora tenha um custo reduzido, têm um alto impacto ecológico, são difíceis de higienizar, e não permitem a padronização, já que é confeccionado manualmente.

O EPS comumente utilizado no desenvolvimento de suportes apresenta impacto ambiental por ser um derivado do plástico, com tempo de decomposição indeterminado, e cuja degradação leva a liberação de micro plásticos no ambiente, especialmente se descartado incorretamente (Turner 2020). Apesar de poder ser reciclado, este material apresenta um elevado custo de reciclagem (Monsalve et al. 2019; Lim et al. 2021). Devido à dificuldade de higienização o suporte de EPS pode ser contaminado por amostras seminais e consequentemente contaminar o recipiente contendo N₂L. Desta forma, é necessária a supervisão e substituição constante dos suportes confeccionados com esse material, já o suporte em ABS, também é um derivado de plástico, porém possui maior resistência, permitindo sua reutilização durante períodos maiores sem perda da integridade, apresentando vantagens para o operador e a possibilidade de ser higienizado. O ABS é um termoplástico amplamente utilizado em impressão 3D e com baixa redução nas suas características a cada reciclagem, tornando-o uma alternativa menos poluente e de menor impacto quando destinado corretamente.

Outro fator importante é a segurança com que as palhetas são acopladas, pois devido a fragilidade do suporte em EPS a própria inserção da palheta pode danificar o material, fazendo com que fiquem frouxas no suporte. Também podem ocorrer quedas de palhetas durante o processo, quando estas são apenas posicionadas sobre o EPS. Já no suporte ABS estas situações são evitadas, pois ele apresenta reentrâncias com o diâmetro necessário para acoplar as palhetas, garantindo mais segurança ao procedimento.

A impressão em 3D permite que a altura do protótipo e o número de amostras possam ser modificadas para atender a necessidades específicas do usuário. A impressora 3D está ganhando cada vez mais destaque para fabricação de insumos e adquirindo espaço na reprodução humana assistida, pois oferece prototipagem rápida, de baixo custo e fácil fabricação de dispositivos (Tao et al. 2020; Li et al. 2021; Tiersch et al. 2022). O uso deste protótipo tem, portanto, uma relação custo-benefício positiva.

Um objetivo importante de nosso estudo foi medir a queda de temperatura quando o protótipo foi colocado em um refrigerador a 2-4° C e antes da fase de vapor de nitrogênio líquido. As dimensões da caixa na qual a exposição ao vapor N₂L e a quantidade de N₂L inicialmente presente, foram padronizadas registrada foi de -99° C após 10 minutos no vapor

de N₂L. Segundo Graham (1996), após os espermatozoides passarem pela zona crítica (-15° C a -60°C) praticamente o seu metabolismo cessa e ficam menos susceptíveis aos danos e já podem ser mergulhados no N₂L. Como mostrado na Figura 15, o desvio padrão das temperaturas medidas na fase de vapor de N₂L são maiores do que aqueles observados no refrigerador, mas os coeficientes de variação são pequenos (<10%). Isto demonstra que o protótipo permite a padronização deste modo de congelamento, reduzindo assim as consequências incertas as variações podem exercer sobre os espermatozoides.

Vale mencionar que outros tamanhos de caixa térmica e suporte flutuante poderiam propiciar curvas distintas. Suportes mais altos promovem uma queda inicial de resfriamento menos acentuada e uma temperatura de equilíbrio mais alta, enquanto suportes mais baixos propiciam o contrário. Poderia se verificar as métricas de recuperação em função de diferentes curvas de congelamento.

A falta de padronização leva a uma variação de protocolos e equipamentos envolvidos no processo, a exemplo do trabalho de Huang et al. (2020), que desenvolveram um “barco” em poliestireno extrudado (XPS) para suspensão das amostras sobre o vapor, porém, as dimensões do protótipo não foram descritas. Essa variação nos protocolos demonstra a necessidade do desenvolvimento e aplicação de equipamentos padronizados em etapas que envolvam a operação e controle manual, reforçando a importância da utilização de um suporte com dimensões determinadas e eficiência comprovada, pois diferentes técnicas podem gerar resultados diferentes, dificultando a comparação com a literatura.

Alguns estudos publicados apresentam conclusões controversas quando comparados, ou ausência de detalhamento na metodologia. A variação dos resultados pode estar relacionada com as diferentes metodologias aplicadas, equipamentos, taxas de resfriamento e aquecimento, a preparação do sêmen antes e após a criopreservação, os protocolos dos crioprotetores utilizados e de cada laboratório, além da qualidade seminal. A Tabela 1 demonstra variação de alguns protocolos presentes na literatura, assim como a ausência de informações necessárias para que o estudo seja replicado. Conforme constatado, de onze estudos avaliados, apenas um apresenta a descrição do suporte utilizado.

Neste estudo, com a finalidade de padronizar as condições para o teste de congelamento/descongelamento de amostras seminais e comparação entre a posição das palhetas no protótipo, escolhemos trabalhar com amostras lavadas por centrifugação e ressuspensão do sedimento em meio nutriente GV-HEPES. Uma comparação com a literatura e as taxas de sobrevivência obtidas (Tabela 5), mostrou uma boa concordância, independentemente da posição da palheta no protótipo. A taxa média de recuperação da

motilidade após o descongelamento foi de 39,4 próxima aos 46% obtidos por Oberoi et al. (2014), e 30% relatados por Saleh et al. (2018) e 30,5% publicada por Eini et al. (2021). Segundo Martins et al. (2019), a motilidade espermática pode reduzir 25% a 75% após a criopreservação.

Em nosso estudo, as avaliações dos parâmetros espermáticos foram realizadas 20 minutos após descongelamento e retirada do crioprotetor. Porém, Oberoi et al. (2014) verificaram que ocorre um aumento da motilidade espermática após o descongelamento até 40 minutos depois, passando de 46% (20 min) para 73% (40 min) de taxa de recuperação da motilidade total. Este efeito provavelmente é atribuído ao dano mitocondrial e o tempo que leva para geração de ATP necessário para aumentar a motilidade. Para a vitalidade, a recuperação de 53,9% também foi próxima a 45%, relatada por Ozkavukcu et al. (2008) e 52,5% obtida por um método de congelamento lento programável (Bandularatne e Bongso 2002). Para Watson (2000) aproximadamente 50% da população de espermatozoides não sobrevive ao processo de criopreservação quando avaliadas após o descongelamento.

Quando realizado o teste 2, comparativo entre a criopreservação realizada com o protótipo em ABS e o suporte em EPS, foi observado que não há diferença nas taxas de recuperação da motilidade espermática (45,5% e 43,6%) e vitalidade (56,6% e 56,4%), respectivamente. Estes dados também estão de acordo com resultados publicados na literatura.

No teste de resistência espermática após 24 horas a 37° C, também não foi verificada diferença significativa entre os dois suportes de palhetas, contudo houve redução na taxa de recuperação na motilidade e vitalidade espermática para ambos, conforme demonstrado nas Figuras 19 e 20. O teste de resistência espermática, por ser uma incubação por tempo prolongado de espermatozoides criopreservados, pode aumentar o impacto dos fatores provocados pelo congelamento/descongelamento, como as alterações a membrana plasmática, peroxidação lipídica, estresse oxidativo e danos ao DNA espermático, fatores que podem afetar a longevidade celular (Huang et al. 2020).

A diminuição dos parâmetros seminais observados pode ser explicada pelo estresse químico e físico experimentado pelos espermatozoides durante a criopreservação, como cristais de gelo intra e extracelulares, desidratação celular e choque osmótico (Di Santo et al. 2012; Oberoi et al. 2014). Assim, se deve considerar que a viabilidade final depende muito do crioprotetor utilizado, do método de congelamento e da qualidade inicial da amostra seminal (Esteves et al. 2000).

Thurston et al. (2002) exploraram a hipótese de que a variação interindividual afeta a capacidade de congelamento dos espermatozoides e pode ser determinada geneticamente. É

evidente que o congelamento de sêmen não é um fenômeno biológico natural, no entanto, os genes de interesse provavelmente regulariam aspectos da estrutura do espermatozoide que por sua vez, influenciam a forma como respondem a criopreservação. Holt et al. (2005) testaram esta hipótese de que a suscetibilidade do espermatozoide a crioinjúrias é característica individual. Este dado foi apoiado por evidências vistas em 100 javalis, quando demonstraram ter diferenças genômicas que se relacionaram com a qualidade dos espermatozoides após o descongelamento. Recentemente, Nikitkina et al. (2022), realizaram um estudo com equinos para marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e genes potenciais relacionados a preservação da motilidade espermática em garanhões após o descongelamento. Relataram que estes marcadores e genes identificados para a criotolerância podem ser candidatos promissores para estudos dos processos biológicos espermáticos.

Gualtieri et al. (2021) indicam que a variação de temperatura no resfriamento e aquecimento causam o aumento de EROs devido ao choque térmico e estresse osmótico. Essas EROs podem atacar os ácidos graxos poliinsaturados da membrana, causando a peroxidação lipídica (Colagar et al. 2013), ocasionando o extravasamento de enzimas intracelulares e possibilitando o ataque ao DNA, levando a redução da vitalidade, motilidade a fragmentação do DNA espermático (Bucak et al. 2008; Zribi et al. 2010). Embora a fragmentação de DNA possa não impedir a fertilização do oócito, é relatado que o DNA fragmentado influencia em menores taxas de gravidez, e um elevado nível de fragmentação (>30%) leva a apoptose do embrião e aborto espontâneo (Robinson et al. 2012; Sedó et al. 2017).

Em nosso estudo, no teste comparativo entre o posicionamento das palhetas, as taxas de fragmentação do DNA após o descongelamento são comparáveis aos valores observados antes do congelamento e estatisticamente não houve diferença. No teste comparativo entre o protótipo em ABS e o suporte em EPS, não houve diferença entre o IDF de ambos os suportes após o descongelamento, no entanto o IDF apresentou aumento significativo ($p > 0,001$) após o descongelamento em relação a amostra fresca. Vale lembrar que as metodologias e as amostras são distintas para cada teste realizado. O IDF verificado no teste de resistência espermática após 24 horas também não apresentou diferença estatística entre os suportes, sendo um aumento de 5,6% para o suporte em EPS e 2,7% para o protótipo. Dados semelhantes foram verificados por Dalzell et al. (2003), que demonstrou um aumento de 3% de fragmentação de DNA espermático quando manteve em incubação espermatozoides provenientes de biópsias testiculares após o descongelamento por 24 horas. No entanto, Ortiz et al. (2017) verificaram, utilizando sêmen fresco congelado/descongelado e lavado, um aumento de 21,49% de fragmentação de DNA após manutenção por 24 horas a 37° C, com metodologia semelhante ao nosso estudo.

Estudos utilizando processamento seminal verificaram que não houve diferença significativa na fragmentação do DNA espermático após o congelamento convencional (Duru et al., 2001; Isachenko et al. 2004). Porém, Thomson et al. (2009), utilizando processamento seminal, verificaram aumento significativo na fragmentação após o descongelamento, enquanto Jackson et al. (2010) obtiveram um IDF inferior ao da amostra fresca após processamento seminal. Este efeito pode ser compreendido, considerando que as técnicas de processamento seminal eliminam bactérias, espermatozoides deficientes, com baixa motilidade e mortos, que são potenciais produtores de EROs, desse modo selecionando os considerados melhores, podendo impactar nos resultados (Malvezzi et al. 2014; Ruiten-Ligeti et al. 2017). Porém, apesar de selecionar espermatozoides melhores, estes ainda são suscetíveis aos danos da criopreservação, pois segundo Gil-Guzman et al. (2001), o processamento seminal reduz as defesas antioxidantes presentes no plasma seminal.

Raad et al. (2018) verificaram que o IDF não foi afetado pelo congelamento e descongelamento, quando comparam diversos crioprotetores. Li et al. (2020), em um estudo com 60 homens que criopreservaram sêmen com metodologia semelhante ao nosso estudo, também não observaram diferença no IDF quando compararam as amostras frescas e após o congelamento. Embora Li et al. (2019) tenham evidenciado aumento significativo no IDF após criopreservação. Em ambos os estudos a técnica para detecção da fragmentação de DNA espermático foi o SCD, assim como a realizada em nosso estudo.

Paasch et al. (2004) quando utilizaram o método do TUNEL (deoxinucleotidil transferase terminal) para detecção da fragmentação do DNA espermático, verificaram que não há danos após a criopreservação, assim como foi visto no estudo de Wongkularb et al. (2011).

As controvérsias entre os estudos podem ser explicadas por diversos motivos, como a diferença nas técnicas de congelamento utilizadas, o número de amostras utilizadas, as distintas técnicas de preparo do sêmen antes da criopreservação, assim como as diferentes técnicas para avaliação do DNA espermático (Isachenko et al. 2004; Di Santo et al. 2012). Esteves et al. (2021) realizaram um estudo em homens inférteis e constataram a concordância intraindividual dos resultados do teste de fragmentação do DNA espermático, pelo método SCD, mostrando assim que esta técnica pode ser usada com eficácia no diagnóstico deste parâmetro.

O caminho para a padronização da técnica de criopreservação requer uma metodologia precisa, padronizada e segura. O protótipo que desenvolvemos permite um resfriamento homogêneo e quantificável das amostras durante o processo de criopreservação em vapor de nitrogênio líquido, favorecendo uma melhor reprodutibilidade intra- e inter-laboratorial, seja de amostras obtidas por masturbação, extrações aspirativas do epidídimo ou cirúrgicas dos

testículos. Outras cinéticas de resfriamento e modos de fixação de amostras podem ser facilmente desenvolvidas para necessidades específicas, modificando a arquitetura do protótipo.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foram testadas duas estratégias para preservação da fertilidade que podem atender a pacientes oncológicos. Para preservar a fertilidade de mulheres foi proposto o cultivo de folículos ovarianos isolados com a suplementação de lisado de plaquetas humanas. Concluimos que a utilização do lisado de plaquetas humanas PLTM no cultivo de folículos murinos pré-antrais, nas concentrações de 5% e 10%, demonstrou um desempenho inferior ao uso de HSA, embora tenha evidenciado um potencial para a manutenção da viabilidade das células foliculares.

Para a preservação da fertilidade masculina foi desenvolvido um protótipo como suporte de palhetas que pudesse suportar as etapas de criopreservação seminal. O protótipo criado para este fim teve sua eficiência comprovada, verificada pelas taxas de recuperação da viabilidade espermática após o descongelamento. O protótipo em ABS comprovou sua resistência física a exposição ao N₂L e a higienização, além de ser de uso prático e seguro. Foi possível determinar o gradiente de resfriamento das amostras e sua constância. Todas as características demonstradas certificam que o protótipo criado pode ser utilizado com confiança na criopreservação seminal de forma reprodutível.

6 REFERÊNCIAS

- Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA. The effects of different concentrations of sodium selenite on the in vitro maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. *J Assist Reprod Genet.* 2008 Sep-Oct;25(9-10):483-488.
- Akasha AM, Woodruff TK. Oncofertility: Preservation of Ovarian Function After a Cancer Diagnosis. In: Leung PCK, Adashi EY. *The Ovary*, editors. 3rd ed. [s.l.]: Elsevier Inc.; 2019. Chapter 31, p.501-508.
- Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ferreira JOHR, Franco RL, Cavalcante AA. et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum. Reprod.* 2004 Jun;19(6):1287-1293.
- Alonso-Camino V, Mirsch B. Rapid expansion of mesenchymal stem/stromal cells using optimized media supplemented with human platelet lysate PLTMax® or PLTGold®, suitable for cGMP expansion at large scale. *Cytotherapy* 2019 May;21(5):S85.
- Amesse LS, Srivastava G, Uddin D, Pfaff-Amesse T. Comparison of cryopreserved sperm in vaporous and liquid nitrogen. *J Reprod Med.* 2003 May;48(5):319-324.
- Andreu JAL; Fernandez PJ, Tortajada JF, Navarro I, Rodriguez-Ineba A, Muro MD. et al. Persistent altered spermatogenesis in long-term childhood cancer survivors. *Pediatric Hematology-Oncology* 2000;17(1):21–30.
- Asaduzzman M, Cui X, Zhang H, Young F. Three Dimensional in vitro Culture of Murine Secondary Follicles in a Defined Synthetic Matrix. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2018 July;9(3):244-262.
- Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction Internet.* 2003;126:91-99.
- Bandularatne E, Bongso A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. *J. Androl.* 2002;23:242-249.
- Bath LE, Critchley HO, Chambers SE, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999 Dec;106(12):1265-1272.
- Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol.* 2016 Oct;12(20):2333-2344.
- Ben-Aharon I., Shalgi R. What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? *Reprod* 2012;144:153-163.
- Benvenuti L, Salvador RA, Til D, Senn AP, Tames DR, Amaral NLL. et al. Wistar rats immature testicular tissue vitrification and heterotopic grafting. *JBRA Assist Reprod* 2018 Sep 1;22(3):167-173.

Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL. et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol.* 2021 Mar 24;19(1):56.

Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Research* 2008 Mar;75(2):128-134.

Budak O, Bostancı MS, Toprak V, Doğanay S, Köse O. Protective Effects of Platelet-rich plasma for *in vitro* Fertilization of Rats with Ovarian Failure Induced by Cyclophosphamide. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2022 Feb;44(2):161-168.

Bujan L, De Mas P. Génotoxicité des chimiothérapies et radiothérapies: Quelles sont les conséquences pour le spermatozoïde humain?. *Androl* 2002;12:284-294.

Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016 Jan;76:371-387.

Cao W, Chen HD, Yu YW, Li N, Chen WQ. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chin Med J (Engl)*. 2021 Mar 17;134(7):783-791.

Carvalho BR. Oncofertilidade: bases para a reflexão bioética. *Reprod Clim* 2015;30(3)132-139.

Cavalcante MB, Duarte ABG, Araújo DO, Teles EPB. Criopreservação de sêmen humano: comparação entre métodos de congelação e tipos de envase. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006 Dez;28(12):708-714.

Choi JK, Agarwal P, He X. In vitro culture of early secondary preantral follicles in hanging drop of ovarian cell-conditioned medium to obtain MII oocytes from outbred deer mice. *Tissue Eng Part A.* 2013 Dec;19(23-24):2626-2637.

Colagar AH, Karimi F, Jorsaraei SGA. Correlation of Sperm Parameters With Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno- and Oligoastheno- Teratospermic Men. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2013 Sep;15(9):780–785.

Cordelli E, Fresegna AM, Leter G, Eleuteri P, Spano M, Villani P. Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation. *Radiat. Res.* 2003;160:443-451.

Covelli A, Facey M, Kennedy E, Brezden-Masley C, Gupta AA, Greenblatt E. et al. Clinicians' Perspectives on Barriers to Discussing Infertility and Fertility Preservation With Young Women With Cancer. *JAMA Netw Open.* 2019 Nov 1;2(11):e1914511.

Creemers E, Nijs M, Vanheusden E, Ombelet W. Cryopreservation of human sperm: efficacy and use of a new nitrogen-free controlled rate freezer versus liquid nitrogen vapour freezing. *Andrologia* 2011 Dec;43(6):392-397.

Dadashzadeh A, Moghassemi S, Shavandi A, Amorim CA. A review on biomaterials for ovarian tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 2021;135:48-63.

Dalzell LH, Thompson-Cree ME, McClure N, Traub AI, Lewis SE. Effects of 24-hour incubation after freeze-thawing on DNA fragmentation of testicular sperm from infertile and fertile men. *Fertil Steril*. 2003 Jun;79 Suppl 3:1670-1672.

Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* 2005;130:147-156.

Demeestere I, Delbaere A, Gervy C, Van Den Bergh M, Devreker F, Englert Y. Effect of preantral follicle isolation technique on in vitro follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. *Human Reproduction* 2002;17:2152-2159.

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.

Desai N, Abdelhafez F, Calabro A, Falcone T. Three dimensional culture of fresh and vitrified mouse pre-antral follicles in a hyaluronan-based hydrogel: a preliminary investigation of a novel biomaterial for in vitro follicle maturation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Jun 13;10(1):29.

Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv. Urol*. 2012;854837.

Dolmans MM, Amorim CA. Fertility Preservation: Construction and use of artificial ovaries. *Reproduction*. 2019 Nov;158(5):F15-F25.

Dolmans MM, Falcone T, Patrizio P. Importance of patient selection to analyze in vitro fertilization outcome with transplanted cryopreserved ovarian tissue. *Fertil. Steril*. 2020;114:279-280.

Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Serrano MS, Schmidt KT. et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and Sterility* 2013 May;99(6).

Duca Y, Di Cataldo A, Russo G, Cannata E, Burgio G, Compagnone M. et al. Função testicular de sobreviventes de câncer infantil: quem é pior? *J. Clin. Med*. 2019;8:2204.

Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril*. 2001 Feb;75(2):263-268.

Eini F, Kutenaei MA, Shirzeyli MH, Dastjerdi ZS, Omid M, Novin MG. Normal seminal plasma could preserve human spermatozoa against cryopreservation damages in Oligozoospermic patients. *BMC Mol and Cell Biol* 2021;22:50.

Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 1989;41:268-276.

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Hum. Reprod.* 2000;15:2173-2179.

Esteves SC, Zini A, Coward RM, Evenson DP, Gosálvez J, Lewis SEM. et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia* 2021;53:e13874.

Fabbri R, Ciotti PM, Di Tommaso B, Magrini O, Notarangelo L, Porcu E. et al. Tecniche di crioconservazione riproduttiva. *Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia* 2004;3:33-41.

Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* 2003;24:59-66.

Figueiredo JR, Cadenas J, Lima LF, Santos RR. Advances in in vitro folliculo genesis in domestic ruminants. *Animal Reproduction (AR)* 2019;16(1):52-65.

Figueiredo JR, Lima LF. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. *R. bras. Reprod. Anim.* 2017 Jan-Mar;41(1):248-253.

Findlay JK, Kerr JB, Britt K, Liew SH, Simpson ER, Rosairo D. et al. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Anim. Reprod.* 2009 Jan-Mar;6(1):16-19.

Fortunato TM, Beltrami C, Emanuelli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. *Sci Rep* 2016;6:25326.

Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L. et al. Effect of chemo-or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Hum Reprod.* 2006 Nov;21(11):2882-2889.

Ghezelayagh Z, Khoshdel-Rad N, Ebrahimi B. Human ovarian tissue in-vitro culture: primordial follicle activation as a new strategy for female fertility preservation. *Cytotechnology* 2022 Feb;74(1):1-15.

Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod.* 2001 Sep;16(9):1922-1930.

Gonçalves V, Quinn GP. Fertility support for patients with gynaecological cancers - a vital but neglected issue. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;19:147-148.

Gonsálvez J, Cortés-Gutierrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 2009;92:170-173.

Graham JK. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1996;12(1):131-147.

Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK, Talevi R. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants* 2021 Feb 24;10(3):337.

Gupta S, Agarwal A, Sharma R, Ahmady A. Recovery, Preparation, Storage and Utilization of Spermatozoa for Fertility Preservation in Cancer Patients and Sub-Fertile Men. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility* 2010;1(2):150-168.

Guzel Y, Oktem O. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from *in vitro*-grown follicles in human? *Mol Reprod Dev.* 2017 Jul;84(7):544-559.

Heiligentag M, Eichenlaub-Ritter U. Preantral follicle culture and oocyte quality. *Reproduction, Fertility and Development* 2018;30:18-43.

Herta AC, Lolicato F, Smitz JEJ. *In vitro* follicle culture in the context of IVF. *Reproduction.* 2018 Jul;156(1):F59-F73.

Hinting A, Agustinus A. Recent updates of sperm cryopreservation technique: a literature review. *Indonesia Journal of Biomedical Science* 2020;14:92.

Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology.* 2005 Jan 15;63(2):370-382.

Huang C, Gan R-X, Hu J-L, Liu F, Hong Y, Zhu WB. et al. Clinical benefit for cryopreservation of single human spermatozoa for ICSI: A systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2022;10:82-91.

Huang CJ, Sun YC, Christopher K, Pai AS, Lu CJ, Hu FR. et al. Comparison of corneal epitheliotropic capacities among human platelet lysates and other blood derivatives. *PLoS One.* 2017 Feb 2;12(2):e0171008.

Huang WJ, Zhang D, Hong ZW, Chen ZB, Dong LH, Zhang Y. et al. Sequential interval micro-droplet loading in closed hemi-straw carrier system: A convenient and efficient method for ultra-rapid cryopreservation in extreme oligozoospermia. *Cryobiology* 2020 Apr;93:75-83.

Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F. et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol. Reprod.* 2004;71:1167-1173.

Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta ELA, Serafini PC. et al. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 2010 Dez 1; 94(7):2626–2630.

Jayasinghe YL, Wallace WHB, Anderson RA. Ovarian function, fertility and reproductive lifespan in cancer patients. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2018 May;13(3):125-136.

Jin SY, Lei L, Shikanov A, Shea LD, Woodruff TK. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertility and Sterility* 2010 May

15;93(8):2633-2639.

Jones ASK, Shikanov A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *Journal of Biological Engineering* 2019;3:1-12.

Kakudo N, Morimoto N, Ma Y, Kusumoto K. Differences between the Proliferative Effects of Human Platelet Lysate and Fetal Bovine Serum on Human Adipose-Derived Stem Cells. *Cells* 2019 Oct;8(10):1218.

Kim EJ, Lee J, Youm HW, Kim SK, Lee JR, Suh CS. et al. Comparison of Follicle Isolation Methods for Mouse Ovarian Follicle Culture In vitro. *Reprod Sci.* 2018 Aug;25(8):1270-1278.

Kim S, Lee GS, Lee SH, Kim HS, Jeong YW, Kim JH. et al. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2005 Sep;72(1):88-97.

Kobayashi H, Tamura K, Tai T, Nagao K, Nakajima K. Semen cryopreservation as an oncofertility treatment in 122 Japanese men with cancer: A decade-long study. *Reprod Med Biol.* 2017 Jul 7;16(4):320-324.

Krouwel EM, Kramer Z, Gordijn R, Nicolai MPJ, Osanto S, Putter H. et al. Sexual and fertility-related adverse effects of medicinal treatment for cancer; a national evaluation among medical oncologists. *Support Care Cancer* 2022 May;30(5):4035-4047.

Lee CY, Lee CT, Wu CH, Hsu CS, Hsu MI. Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* 2012 May;44(Suppl 1):81-86.

Levine J. Gonadotoxicity of Cancer Therapies in Pediatric and Reproductive-Age Females. In: Garcia C, Woodruff T (editors). *Oncofertility Medical Practice*. New York, NY: Springer; 2012.

Li M-L, Zhou Q, Ge Y-F, Shao Y, Zeng R, Yao B. Effects of sperm DNA fragmentation index on semen parameters and pregnancy outcomes in intrauterine insemination. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2021;27:904-908.

Li Y, Zhang J, Zhang H, Liu B, Wang G, Cao M. et al. Importance and safety of autologous sperm cryopreservation for fertility preservation in young male patients with cancer. *Medicine (Baltimore)* 2020 Apr;99(15):e19589.

Li Y-X, Zhou L, Lv M-Q, Ge P, Liu Y-C, Zhou D-X. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2019;233:84-92.

Lim YS, Izhar TNT, Zakarya IA, Yusuf SY, Zaaba SK, Mohamad MA. Life cycle assessment of expanded polystyrene. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2021 Nov;920(1):012030.

Lin EM, Aikin JL, Good BC. Premature Menopause After Cancer Treatment. 1999;7(3):114-121.

Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Haag KT, Wischral A, Gastal MO, Jones KL. et al. Long-term in vitro culture of ovarian cortical tissue in goats: effects of FSH and IGF-I on preantral follicular development and FSH and IGF-I receptor mRNA expression. *Cell Tissue Res* 2012 Dec;350(3):503-511.

Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis Development. *Endocr Rev.* 2019 Aug 1;40(4):857-905.

Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014 Dec 2;12(1):121.

Martins AD, Agarwal A, Henkel R. Criopreservação de Espermatozóides. *Fertilização in vitro* 2019;625-642.

Martins FS, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim* 2008;32(1):36-49.

McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multistep culture system. *Molecular Human Reproduction* 2018;24(3):135-142.

Monsalve DB, Zamudio WH, Tiria LC, Durán SM. Effect of expanded polystyrene waste in the creation of waterproofing paint. *Journal of Physics: Conference Series* 2019 Nov;1386(1):012075.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Embriologia clínica*. 10th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary?. *Human Reproduction Update* 2012 Sep./Oct;18(5):525-535.

Moura BVCS, Penna LVS, Lopes MHC, Soares W, Souza JHK. Métodos de preservação de fertilidade: revisão de literatura. *BJSCR* 2016;13(3):56-64.

Moura GA, Monteiro PB. Atividade citotóxica dos tratamentos antineoplásicos na fertilidade: Uma revisão sistemática. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2020;42(11):759-768.

Murase T, Iwase A, Komatsu K, Bayasula, Nakamura T, Osuka S. et al. Follicle dynamics: visualization and analysis of follicle growth and maturation using murine ovarian tissue culture. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Feb;35(2):339-343.

Nallella KP, Rakesh KS, Shyam SRA, Nabil A, Ashok A. Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility* 2004;82(4):913-918.

Ngamwuttiwong T, Kunathikom S. Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to

liquid nitrogen vapour method (I). *J Med Assoc Thai*. 2007 Feb;90(2):224-228.

Nikiforov D, Russo V, Nardinocchi D, Bernabò N, Mattioli M, Barboni B. Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method. *J Ovarian Res* 2018;11:65.

Nikitkina EV, Dementieva NV, Shcherbakov YS, Atroshchenko MM, Kudinov AA, Samoylov OI. et al. Genome-wide association study for frozen-thawed sperm motility in stallions across various horse breeds. *Anim Biosci*. 2022 Dec;35(12):1827-1838.

Oberoi B, Kumar S, Talwar P. Study of human sperm motility post cryopreservation. *Medical Journal Armed Forces India* 2014;70(4):349-353.

O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod* 2003;68:1682-1686.

Okada K, Fujisawa M. Recovery of Spermatogenesis Following Cancer Treatment with Cytotoxic Chemotherapy and Radiotherapy. *World J Mens Health* 2019 May;37(2):166-174.

Oliveira KD, Oselame GB, Neves EB. Infertilidade após o tratamento oncológico. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília* 2014;3(1).

Ortiz I, Dorado J, Morrell J, Gosálvez J, Crespo F, Jiménez J. et al. New approach to assess sperm DNA fragmentation dynamics: Fine-tuning mathematical models. *J Animal Sci Biotechnol* 2017;8(23).

Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Aug;25(8):403-411.

Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ. et al. Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2004;71(6):1828-1837.

Paoli D, Pelloni M, Lenzi A, Lombardo F. Cryopreservation of Sperm: Effects on Chromatin and Strategies to Prevent Them. In: Baldi E, Muratori M (editors). *Genetic Damage in Human Spermatozoa*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1166. Nova York, NY: Springer; 2019. p. 149-167.

Paras L, Freisinger J, Esterbauer B, Schmeller N, Szlauer R, Jungwirth A. Cryopreservation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing. *Andrologia* 2008 Feb;40(1):18-22.

Pazoki H, Eimani H, Farokhi F, Shahverdi A, Ebrahimi B, Tahaei LS. Considering the effective of Blood Platelet Extraction (Platelet laset) on growth and survival of oocytes from prepubertal NMRI mouse pre-antral follicles. *SSU Journals* 2014;22(3):1265-1273.

Pazoki H, Eimani H, Farokhi F, Shahverdi A, Tahaei LS. The effects of platelet lysate on maturation, fertilization and embryo development of NMRI mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Reprod Med Biol* 2015 Aug;15(2):115-120.

Pazoki H, Eimani H, Farokhi F, Shahverdi A, Yazdi RS, Tahaei LS. Comparing the growth and the development of mouse pre-antral follicle in medium with PL (Platelet Layset) and with FBS. *Middle East Fertility Society Journal* 2015;20(4):231-236.

Piazza MJ, Urbanetz AA, Carvalho NS. Radiotherapy and chemotherapy impact on female genital apparatus. *FEMINA* 2011;39(3).

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 Apr 9;3(1):pkz008.

Prentice JR, Anzar M. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Veterinary Medicine International* 2011:1-11.

Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis: The Role of Testicular Immunology. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(4):957.

Raad G, Lteif L, Lahoud R, Azoury J, Azoury J, Tanios A. et al. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology* 2018 Nov;6(6): 836-845.

Rajabzadeh A, Jahanpeyma F, Talebi A, Moradi F, Hamidieh AA, Eimani H. Fibrin Scaffold Incorporating Platelet Lysate Enhance Follicle Survival and Angiogenesis in Cryopreserved Preantral Follicle Transplantation. *Galen Med J.* 2020 Jul 8;9:e1558.

Rajabzadeh AR, Eimani H, Koochesfahano HM, Shahvardi A-H, Fathi R. Morphological Study of Isolated Ovarian Preantral Follicles Using Fibrin Gel Plus Platelet Lysate after Subcutaneous Transplantation. *Cell J* 2015 Spring;17(1):145-152.

Rex AS, Aagaard J, Fedder J. DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 2017;5(4):622-630.

Rios A, Botella I. Causes and Impact of Cryopreservation-Associated Damage on Different Parameters of Human Spermatozoa and its Clinical Impact. *EMJ Repro Health* 2019;5:100-109.

Rios PA, Gascón A, Martínez JV, Balasch S, Botella IM. Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Feb;35(2):237-245.

Riva NS, Ruhlmann C, Iaizzo RS, Lopez CAM, Martinez AG. Análise comparativa entre congelamento lento e ultra-rápido para criopreservação de sêmen humano. *JBRA Assist Reprod* 2018;22:331-337.

Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 2012 Oct 1;27(10):2908–2917.

Rodrigues GQ, Bruno JB, Faustino LR, Silva CMG, Figueiredo JR. Suplementação proteica no meio de cultivo in vitro de folículos pré-antrais *Acta Scientiae Veterinariae* 2010;38(4):341-349.

Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines. *Cancer Management and Research* 2014;6:105-117.

Roness H, Kashi O, Meirou D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):20-29.

Rossetto R, Lima IMT, Saraiva MVA, Lima-Verde ETS, Figueiredo JR. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. *Act Vet Bras* 2011;5(1):15-23.

Ruiter-Ligeti J, Agbo C, Dahan M. The impact of semen processing on sperm parameters and pregnancy rates with intrauterine inseminations. *Minerva ginecológica* 2017 Jun;69(3):218–224.

Sadler TW. *Langman Embriologia Médica*. 9th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2005.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 2010;93(4):1027-1036.

Salama M, Woodruff TK. From bench to bedside: Current developments and future possibilities of artificial human ovary to restore fertility. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2019;98(5):659-664.

Saleh R, Assaf H, Abd El Maged WM, Elsuity M, Fawzy M. Increased cryo-survival rate in ejaculated human sperm from infertile men following pre-freeze in vitro myo-inositol supplementation. *Clin Exp Reprod Med*. 2018 Dec;45(4):177-182.

Santos SCNDS, Sigurjonsson ÓE, Custódio CA, Mano JFCDL. Blood plasma derivatives for tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 2018 Oct 05;24(6):454-462.

Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(3):444-467.

Schrader M, Muller M, Straub B, Miller K. The impact of chemo-therapy on male fertility: a survey of biological basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol* 2001;15(6):611-617.

Sedó CA, Bilinski M, Lorenzi D, Uriondo H, Noblía F, Longobucco V. et al. Effect of sperm DNA fragmentation on embryo development: clinical and biological aspects. *JBRA Assisted Reproduction* 2017;21(4):343–350.

Shalet SM, Tsatsoulis A, Whitehead E, Read G. Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J Endocrinol.* 1989;120:161-165.

Shea LD, Woodruff TK, Shikanov A. Bioengineering the Ovarian Follicle Microenvironment. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2014;16(1):29-52.

Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Molecular Human Reproduction* 2012;18(2):59-67.

Silva AFB, Lima LF, Figueiredo Jr de. Estratégias para melhorar a eficiência do cultivo folicular *in vitro*: Importância da suplementação do meio e estudo das alterações epigenéticas. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento* 2021;10(9):e22910918022.

Sonigo C, Beau I, Binart N, Grynberg M. The Impact of Chemotherapy on the Ovaries: Molecular Aspects and the Prevention of Ovarian Damage. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 27;20(21):5342.

Ståhl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E. et al. The impact of testicular carcinoma and its treatment on sperm DNA integrity. *Cancer* 2004;100(6):1137-1144.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.

Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille M-C. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2020;18:17.

Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil. Steril.* 2013;99:1523-1533.

Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang J-A, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction* 2009 Sep 1;24(9):2061–2070.

Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters* 2002;23:255-262.

Tiersch NJ, Paulsen J, Liu Y, Tiersch TR. A 3-D printed vitrification device integrated with French straws. *HardwareX.* 2022 Oct 4;12:e00366.

Tongdee P, Sukprasert M, Satirapod C, Wongkularb A, Choktanasiri W. Comparison of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on Motility, Morphology and DNA Integrity. *J. Med. Assoc. Thai.* 2015;98(Suppl 4):S33-42.

Turner A. Foamed Polystyrene in the Marine Environment: Sources, Additives, Transport, Behavior, and Impacts. *Environmental Science & Technology* 2020 Sep 1;54(17):10411–10420.

Vanacker J, Amorim CA. Alginate: A Versatile Biomaterial to Encapsulate Isolated Ovarian Follicles. *Annals of Biomedical Engineering* 2017 Jul;45(7):1633-1649.

Vishwakarma SK, Pandey P, Gupta NK. Characterization of ABS Material: A Review. *Journal of Research in Mechanical Engineering* 2017;3(5):13-16.

Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*. 2010 Jan 27;5(1):e8772.

Wallace WHB, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod*. 2003 Jan;18(1):117-121.

Wang W, Pei C, Isachenko E, Zhou Y, Wang M, Rahimi G. et al. Automatic Evaluation for Bioengineering of Human Artificial Ovary: A Model for Fertility Preservation for Prepubertal Female Patients with a Malignant Tumor. *International Journal of Molecular Sciences* 2022 Oct 17;23(20):12419.

Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction*. 2011 Feb;141(2):183-191.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000 Jul;60-61:481-492.

Wongkularb A, Choktanasiri W, Rojanasakul A. A Comparison of the Cryodamage on Human Sperm in Vapor and Slow Freezing. *Ramathibodi Medical Journal* 2011;34(2):84-91.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 11th ed. Geneva: WHO Press; 2021.

Xiao S, Zhang J, Romero MM, Smith KN, Shea LD, Woodruff TK. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci Rep*. 2015;5:17323.

Xu F, Lawson MS, Bean Y, Ting AY, Pejovic T, De Geest K. et al. Matrix-free 3D culture supports human follicular development from the unilaminar to the antral stage in vitro yielding morphologically normal metaphase II oocytes. *Hum Reprod*. 2021;36(5):1326-1338.

Xu J, Bernuci MP, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB. et al. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young and older adult, rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional (3D) culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction*. 2010;140:685-697.

Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Molskness TA, Ting AY, Stouffer RL. et al. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Human Reproduction* 2013;28(8):2187-2200.

Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biol Reprod*. 2009 Sep;81(3):587-594.

Yang Q, Zhu L, Jin L. Human Follicle in vitro Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Aug;11:548.

Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology* 2009;30(3):219-229.

Zribi N, Chakroun NF, Euch HE, Gargouri J, Bahloul A, Keskes LA. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil. Steril.* 2010;93:159-166.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Questionário realizado com embriologistas via on-line

Criopreservação seminal

Se você é um profissional que trabalha com a criopreservação seminal e gosta de inovação, peço a sua ajuda para responder as 4 perguntas abaixo 😊.

Você trabalha com a criopreservação seminal através da rampa manual de resfriamento em vapor de nitrogênio? *

Sim

Não

O suporte utilizado para as palhetas, é feito manualmente? *

Sim

Não

O suporte, é feito de qual material? *

Isopor

Metal

Polipropileno

Outro

Você teria interesse em adquirir um suporte para as palhetas se ele fosse atóxico, apirogênico e de fácil higienização? *

Sim

Não

Talvez

Apêndice 2 – Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVALI



PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNIVALI

Protocolo: 017/18	Data: 04/05/18
Título: Estudo da viabilidade do transplante de tecido ovariano vitrificado de camundongos pré-púberes em matriz de alginato e lisado plaquetário	
Coordenador do Projeto: Tiago Goss dos Santos	
Executores: Vera Lucia Lângaro Amaral	
Colaboradores:	
Objetivos	
Objetivo Geral: Analisar a eficiência da vitrificação de tecido ovariano de fêmeas de camundongos em idade pré-púbere após reimplante autólogo e heterotópico com alginato e lisado de plaquetas.	
Objetivos Específicos	
<ul style="list-style-type: none"> • Determinar da melhor concentração de lisado plaquetário no cultivo de folículos pré-antrais; • Avaliar a eficiência do transplante do tecido ovariano criopreservado na ausência ou presença da matriz de alginato com lisado de plaquetas; • Avaliar os aspectos histomorfológicos do tecido transplantado; • Acompanhar o retorno da função ovariana através da citologia vaginal; • Investigar a apoptose celular dos tecidos transplantados através do ensaio TUNEL; 	
Averiguar a angiogênese por meio da expressão imunohistoquímica do marcador de células endoteliais CD31.	

I. RESUMO: O avanço dos tratamentos oncológicos tem demonstrado de maneira positiva um grande impacto na taxa de sobrevivência de pacientes com câncer. Contudo, a sobrevivência pode ter sua qualidade diminuída pela ocorrência de falência funcional precoce das gônadas e, conseqüentemente, infertilidade. Nesse contexto, surgem estratégias para preservação da função gonadal e/ou de gametas e, por conseguinte, da fertilidade. A criopreservação de tecido ovariano ganha cada vez mais notoriedade por propor a recuperação ou manutenção da função endócrina e reprodutiva deste órgão, de maneira praticamente fisiológica. A técnica de vitrificação é apontada como um método alternativo ao tradicional congelamento lento, uma vez que o tecido é criopreservado sem que haja a formação de cristais de gelo. Apesar da técnica ter resultados encorajadores, o período inicial de hipóxia, após o enxerto avascular é ainda um dos principais obstáculos ao sucesso do transplante de tecido ovariano. Estudos com a utilização de biomateriais têm sido propostos para favorecer a hipóxia de enxertos. Este estudo pretende investigar a eficiência da vitrificação de tecido ovariano de fêmeas de camundongos em idade pré-púbere, com transplante autólogo e heterotópico dos fragmentos em matriz de alginato e lisado de plaquetas (LP). Serão utilizadas 70 fêmeas de camundongos Swiss, divididas em oito grupos de oito animais. O estudo será dividido em 3 etapas. A primeira irá utilizar 3 animais para estudo in vitro da viabilidade das células foliculares em matriz de alginato e LP, em três concentrações (5%, 15% e 30%). A segunda etapa avaliará o efeito da vitrificação e da matriz de alginato e LP no enxerto autólogo e ectópico no subcutâneo do pavilhão auricular. A vitrificação dos fragmentos ovarianos será realizada em solução de 7,5% etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 10 minutos, posteriormente transferidos para solução de 15% EG, 15% DMSO e 0,5 M sacarose por 2 minutos



e imersos em nitrogênio líquido. Os fragmentos do tecido ovariano serão desvitrificados à temperatura ambiente e colocados, imediata e sequencialmente, em meios contendo 1M, 0,5M e 0,25M de sacarose por 5 minutos em cada. Será realizada uma avaliação histológica qualitativa e quantitativa dos folículos primordiais, primários e secundários, corpos lúteos e degeneração estrutural antes e após o reimplante do tecido criopreservado. Será efetuado o controle do ciclo estral, através de citologia vaginal dos grupos de transplante vitrificados e frescos e dos grupos das fêmeas ooforectomizadas e inteiras. Na terceira etapa serão realizadas as mesmas técnicas de vitrificação e transplante com alginato e LP para um grupo, um segundo grupo apenas vitrificado e um terceiro grupo com transplante do tecido fresco. As fêmeas serão eutanaziadas no terceiro dia após o transplante para estudo da apoptose folicular através do ensaio TUNEL e avaliada a angiogênese pelo marcador endotelial CD31. Para comparação dos grupos experimentais dos folículos isolados, será utilizado o teste estatístico Qui-quadrado utilizando $p < 0,05$ como critério de significância e comparação histológica e imunohistoquímica pelo teste de Mann-Whitney.

II. ANÁLISE:

- Data de início e término: ADEQUADO
- Qualificação da equipe e treinamento: ADEQUADO.
- Justificativa do projeto: ADEQUADO
- Detalhamento dos procedimentos experimentais: ADEQUADO.
- Condições de manutenção: ADEQUADO.
- Número de animais solicitados e planejamento estatístico: ADEQUADO.
- Espécie, linhagem e sexo: ADEQUADO.

III. PARECER: *Ad referendum*

Item 15.2 Justificar a escolha do método de eutanásia.

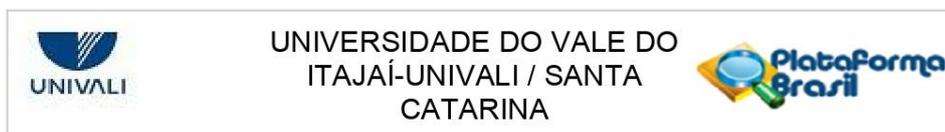
De acordo com todos os itens acima descritos, o projeto fica PENDENTE – *Ad referendum*, para que todos os pontos abordados sejam respondidos pelos autores do projeto.

IV. REANÁLISE: Todas as pendências foram respondidas

V. PARECER FINAL: APROVADO


David Til
Coordenador CEUA/UNIVALI

Apêndice 3 – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: EFICIÊNCIA DE UM SUPORTE PARA PALHETAS E CRIOTUBOS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

Pesquisador: Vera Lucia Lângaro Amaral

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 4

CAAE: 39941420.2.0000.0120

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Itajaí

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

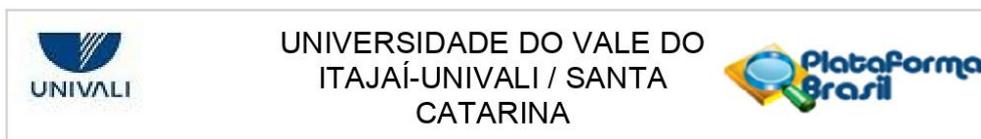
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.393.194

Apresentação do Projeto:

O projeto tem como objetivo avaliar a eficácia de um suporte para palhetas e criotubos livre de contaminação, atóxico e com posicionamento exato. Serão utilizadas 20 amostras seminais cedidas por laboratórios da região mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para Biorrepositório. As amostras serão criopreservadas em palhetas e criotubos e divididas em 2 grupos: um grupo controle onde a criopreservação será realizada com o suporte rotineiramente utilizado (isopor), e o grupo teste em que as amostras serão criopreservadas utilizando o protótipo. Após o descongelamento serão analisados os parâmetros espermáticos que indicam sua motilidade e vitalidade. A análise estatística dos dados obtidos será realizada utilizando o teste ANOVA e o teste Tukey com nível de significância de 5%. Está sendo solicitada a aprovação para acrescentar 40 amostras seminais ao projeto para realização dos devidos controles, pois o sêmen possui uma variabilidade muito grande quanto a recuperação da sua

Endereço: Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114
Bairro: CENTRO **CEP:** 88.302-901
UF: SC **Município:** ITAJAÍ
Telefone: (47)3341-7738 **Fax:** (47)3341-7744 **E-mail:** etica@univali.br



Continuação do Parecer: 5.393.194

viabilidade após a criopreservação, e há necessidade de aumentar a amostra para que o resultado estatístico seja relevante

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário-Avaliar a eficácia de um suporte de palhetas e criotubos na criopreservação seminal humana.

Objetivo Secundário:

- Projetar e desenvolver um protótipo de suporte para palhetas e criotubos de criopreservação; • Verificar a durabilidade do material quando submerso em nitrogênio líquido; • Examinar a resistência do material utilizado quanto a higienização com produtos bactericidas. • Averiguar a segurança no posicionamento das palhetas e criotubos quando em vapor de nitrogênio líquido no processo de criopreservação; • Avaliar os parâmetros espermáticos (motilidade e vitalidade) antes e após a criopreservação das amostras seminais• Avaliar as taxas de recuperação da viabilidade seminal após a criopreservação• Comparar os resultados com a literatura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores apresentaram os riscos associados a proposta de pesquisa, bem como suas medidas mitigatórias, estando os riscos em uma proporção razoável aos benefícios diretos e indiretos para os participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Proposta de pesquisa apresentada com clareza e objetividade. Os pesquisadores apresentaram todo o percurso metodológico para desenvolvimento da mesma, estando todas as etapas condizentes com as prerrogativas da resolução CNS n.466/2012 e suas complementares

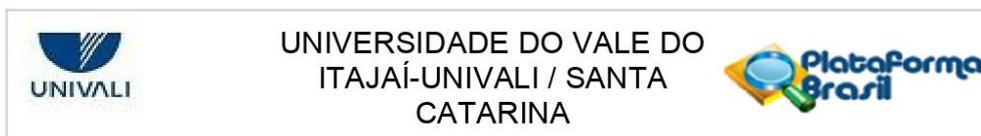
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória estão em conformidade e anexados na Plataforma Brasil, com as devidas assinaturas (quando aplicável).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo está APROVADO, por estar em acordo com as prerrogativas éticas exigidas nas resoluções CNS 466/12 e suas complementares.

Endereço: Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114
Bairro: CENTRO **CEP:** 88.302-901
UF: SC **Município:** ITAJAI
Telefone: (47)3341-7738 **Fax:** (47)3341-7744 **E-mail:** etica@univali.br



Continuação do Parecer: 5.393.194

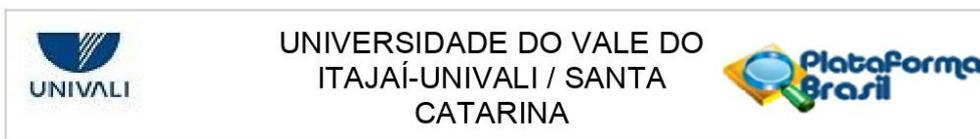
Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/12 VII. 13 cabe ao CEP: d) acompanhar o desenvolvimento dos projetos através de relatórios anuais dos pesquisadores. Deste modo, os pesquisadores devem informar o CEP sempre que houver mudanças no protocolo, por meio de submissão para análise da Emenda de protocolo, e devem apresentar relatórios parciais periodicamente e relatório final após conclusão do trabalho.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_191514_4_É1.pdf	17/03/2022 17:13:51		Aceito
Outros	Emenda.pdf	17/03/2022 17:10:45	Vera Lucia Lângaro Amaral	Aceito
Parecer Anterior	TermodeCienciaeAquienciaassinado.pdf	05/03/2021 15:12:13	GABRIELA REIF	Aceito
Parecer Anterior	ModelodeCartapararespostasapendencias.doc	05/01/2021 17:04:01	GABRIELA REIF	Aceito
Parecer Anterior	ModelodeCartapararespostasapendencias1.doc	05/01/2021 17:03:52	GABRIELA REIF	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeCienciaeAquienciaparaBiorrepositorio.pdf	05/01/2021 16:21:48	GABRIELA REIF	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoLivreeEsclarecidoparaBIORREPOSIToRIO.pdf	05/01/2021 16:21:32	GABRIELA REIF	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCrioGabriela.pdf	04/11/2020 16:32:05	GABRIELA REIF	Aceito
Cronograma	CronogramaAtualizado.pdf	04/11/2020 10:36:51	GABRIELA REIF	Aceito
Outros	AceitedeOrientacaoTICTGABRIELA.pdf	03/11/2020 10:44:44	GABRIELA REIF	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoLivreeEsclarecidopara_BIORREPOSIToRIO.pdf	18/09/2020 13:13:32	GABRIELA REIF	Aceito
Declaração de concordância	TermodeConformidadeentreosDocumentos.pdf	18/09/2020 13:11:18	GABRIELA REIF	Aceito
Declaração de Manuseio Material	TermodeUtilizacaodedadosparacoletadedadosdepesquisaenvolvendosere	18/09/2020 13:08:54	GABRIELA REIF	Aceito

Endereço: Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114
Bairro: CENTRO **CEP:** 88.302-901
UF: SC **Município:** ITAJAI
Telefone: (47)3341-7738 **Fax:** (47)3341-7744 **E-mail:** etica@univali.br



Continuação do Parecer: 5.393.194

Biológico / Biorepositório / Biobanco	shumanos.pdf	18/09/2020 13:08:54	GABRIELA REIF	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	18/09/2020 13:01:49	GABRIELA REIF	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	18/09/2020 12:33:08	GABRIELA REIF	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ITAJAI, 06 de Maio de 2022

Assinado por:
Pollyana Bortholazzi Gouvea
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Uruguai, 458, Bloco B7, sala 114
Bairro: CENTRO **CEP:** 88.302-901
UF: SC **Município:** ITAJAI
Telefone: (47)3341-7738 **Fax:** (47)3341-7744 **E-mail:** etica@univali.br