

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

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

**Transplante heterotópico autólogo de tecido ovariano pré-púbere criopreservado em ratas ooforectomizadas**

**Cristina Botelho Messias**

Porto Alegre, 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

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

**Transplante heterotópico autólogo de tecido ovariano pré-púbere criopreservado em ratas ooforectomizadas**

**Cristina Botelho Messias**

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima

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

Porto Alegre, 2016

## CIP - Catalogação na Publicação

Botelho Messias, Cristina  
Transplante heterotópico autólogo de tecido  
ovariano pré-púbere criopreservado em ratas  
ooforectomizadas / Cristina Botelho Messias. --  
2016.  
82 f.

Orientadora: Elizabeth Obino Cirne Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Modelo animal. 2. Transplante Autólogo. 3.  
Transplante ovariano. 4. Fertilidade. I. Obino Cirne  
Lima, Elizabeth , orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

“Ao meu filho Eduardo que é minha principal e maior motivação, aos meus pais e demais familiares, pela dedicação e exemplo; à minha orientadora Elizabeth Obino Cirne Lima, por acreditar na minha competência; aos meus colegas e amigos, pelo apoio e incentivo; e ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, por possibilitar a realização do meu trabalho e permitir que eu possa fazer o que gosto: pesquisar e aprender.”

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima, obrigada primeiramente pela confiança depositada a mim, pelo exemplo de figura humana que és. Sempre admirei pessoas com inteligência, sabedoria, serenidade e sobriedade, mas a senhora vai muito, além disso. Nunca conseguirei transmitir em palavras, sejam elas escritas ou faladas, o quanto a admiro e quero bem, nem tampouco, retribuir tudo que já me proporcionou. Sei que tenho muita sorte por tê-la como orientadora não só pela qualidade técnica que todos nós já conhecemos; porém, o que me deixa realmente envaidecida e orgulhosa, não é o título que estas me ajudando a conquistar, mas o fato de saber que posso contar com a senhora sempre e em todos os seguimentos da minha vida.

Ao estimado Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos por ter aberto as portas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular.

Aos meus pais e demais familiares, pelo amor, incentivo, estímulo, educação e valores éticos e morais.

À minha grande amiga, Dra. Paula Barros Terraciano, ou simplesmente “Pulinha”, o meu muito obrigado por ter me proporcionado uma das amizades mais sinceras, ternas e valiosas que tenho. Estou certa de que você é um dos meus anjos da guarda encarnado. Agradeço pela acolhida tão carinhosa em sua casa, por todas as conversas sobre os mais diversos assuntos, pelos ensinamentos e companhia alegre no nosso “bonde do madrugada”. E como não podia deixar de citar, obrigada por essa afinidade imensa que temos.

Às minhas queridas colegas de laboratório, Fernanda B.A., Bel, Cris Kuhl, Silvana, Bina, Tuane, Laura, Karina, Priscilla, Kiki, Débora, Kamila, Victória, Raquel, Martina, Nicole, Ise e Luciana, que auxiliaram diretamente no meu experimento. Recebam o meu muito obrigado por toda ajuda durante a execução deste trabalho, bem como pela paciência nos momentos difíceis. Espero poder retribuir à altura todo o auxílio que me deram.

Aos técnicos e funcionários da Unidade de Experimentação Animal e Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Martha, Fernanda, Tuane, Rosa, Karen, Bruno, Flavinha, Dra. Francine e Seu Jorge, obrigada pela acolhida sempre fraterna que me deram e por toda a ajuda e auxílio que prestaram durante a execução do meu projeto.

Por fim, agradeço ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Prof. Dr. Edison Capp, bem como colegas e demais Professores, que me estimularam e proporcionaram todas as condições para o meu crescimento e desenvolvimento científico.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2.REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 ESQUEMA DE BUSCA NA LITERATURA .....	14
2.2 MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO.....	16
2.3 CÂNCER.....	17
2.4 CÂNCER EM CRIANÇAS E ADOLESCENTE.....	19
2.5 CONSEQUÊNCIAS DAS TERAPIAS ONCOLÓGICAS NA CAPACIDADE REPRODUTIVA ..	21
2.6 INFERTILIDADE .....	23
2.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO .....	25
2.8 TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO.....	27
<b>3.JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.HIPÓTESES .....</b>	<b>31</b>
4.1 HIPÓTESE NULA.....	31
4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA .....	31
<b>5.OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 OBJETIVO GERAL.....	32
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>
<b>6.ARTIGO .....</b>	<b>42</b>
<b>7.MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>47</b>
7.1 Ethical Aspects.....	47
7.2 Animals .....	47

7.3	<b>Experimental Design</b> .....	<b>48</b>
7.4	<b>Anesthetic</b> .....	<b>48</b>
7.5	<b>Oophorectomy</b> .....	<b>49</b>
7.6	<b>Transplant</b> .....	<b>49</b>
7.7	<b>Ovarian tissue cryopreservation</b> .....	<b>49</b>
7.8	<b>Ovarian tissue thawing</b> .....	<b>50</b>
7.9	<b>Macroscopic evaluation of Sexual Maturity</b> .....	<b>50</b>
7.10	<b>Estrous cycle detection</b> .....	<b>50</b>
7.11	<b>Histological Analysis</b> .....	<b>51</b>
7.12	<b>Follicular Classification</b> .....	<b>52</b>
7.13	<b>Statistical Analysis</b> .....	<b>53</b>
	<b>8.RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>54</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>76</b>
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>77</b>



## RESUMO

**Introdução:** A técnica de criopreservação de tecido ovariano tem sido vista como tratamento promissor e se apresenta como a principal maneira de preservar a fertilidade em pacientes pré-púberes e em mulheres que necessitam de tratamento do câncer de imediato. Contudo, atualmente, ainda existem obstáculos em relação ao autotransplante de tecido ovariano criopreservado, devido a fatores como lesão isquêmica, assim como danos causados pelo processo durante o congelamento, bem como a escolha do melhor local para o enxerto.

**Objetivo:** Verificar a possível restauração da função ovariana, analisando a histologia do ovário transplantado em ratas adultas estéreis, após transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado em fase pré-púbere.

**Métodos:** Foram utilizadas 45 ratas Wistar com 30 dias de idade, que foram divididas aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (n = 15), férteis normais; Sham (n = 15), submetidas à ooforectomia bilateral; Transplante (n = 15), submetidas à ooforectomia bilateral, seguida de transplante autólogo na região dorsal entre as escápulas. A partir do d<sub>35</sub>, foram realizadas observações quanto à maturidade sexual, através da análise da abertura vaginal e de esfregaços vaginais, para avaliação do ciclo estral. Após observação da fase do ciclo estral, os animais foram eutanasiados. E, amostras de tecidos foram coletadas e processadas para avaliação histológica dos implantes ovarianos; considerando: organização estrutural do tecido transplantado e adjacente, bem como o desenvolvimento folicular.

**Resultados:** Quanto às avaliações de maturidade sexual, através das análises de abertura vaginal e da análise microscópica do material obtido dos esfregaços vaginais, foi possível observar que os animais do Grupo Controle, que eram férteis ciclaram normalmente. As ratas do Grupo Sham e Transplante não apresentaram ciclo regular, permanecendo em diestro. As avaliações histológicas das amostras de tecido de ovário pré-púbere, implantados em fêmeas adulto jovens, evidenciaram degeneração ovariana; uma vez que estes apresentaram fibrose e

áreas de necrose, o que provavelmente impossibilitou o desenvolvimento folicular, nas ratas que receberam o transplante.

**Conclusão:** A técnica de transplante de tecido ovariano em ratas é uma técnica relativamente simples de ser executada, e se mostrou eficaz na manutenção da massa corporal dos animais durante o período observado. Este achado sugere que houve produção hormonal, oriunda do ovário transplantado, fato este que encoraja as pesquisas neste sentido, a fim de se obter uma técnica que restaure a produção de folículos viáveis em pacientes estéreis. Apesar de ter apresentando indícios de falência do enxerto e isquemia no tecido transplantado, os resultados preliminares desta investigação precisam ser complementados com estudos adicionais, a fim de buscar as melhores condições para a obtenção de maior eficácia dos transplantes autólogos de tecido ovarianos criopreservados.

**Palavras-chave:** Modelo animal, Transplante Autólogo, Transplante ovariano, Fertilidade.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Ovarian tissue cryopreservation is a promising treatment and it is presented as the main way to preserve fertility in prepubertal patients and women who need cancer treatment immediately. However still remain obstacles related to the ovarian tissue cryopreserved autograft due to ischemic injury, damage caused by the freezing process and selecting the best location for the graft.

**Objective:** Investigate a possible restoration of the ovarian function by analyzing the histology of the ovary transplanted into sterile adult rats after autologous transplantation of ovarian tissue cryopreserved in prepubertal phase.

**Methods:** 45 Wistar rats, 30 days old, which were randomly divided into three groups: control group (n = 15), normal fertile; Sham group (n = 15), underwent bilateral oophorectomy; Transplantation group (n = 15), underwent bilateral oophorectomy followed by autologous transplantation in the scapular area. From the d35, sexual maturity was observed by examining the vaginal opening and vaginal smears, for evaluation of the estrous cycle. After observing the phase of the estrous cycle, the animals were euthanized. The tissue samples were collected and processed for histological evaluation of ovarian implants; where structural organization of the transplanted tissue and adjacent as well as follicular development were analyzed.

**Results:** Regarding sexual maturity evaluations, observed by vaginal opening analysis and microscopic analysis of material obtained from vaginal swabs, we could observe that the animals in the control group cycled normally. The rats of Sham and Transplant Group showed no regular cycle, staying in diestrus phase. The histological assessments of prepubertal ovarian tissue samples implanted in young adult females showed ovarian degeneration, since

they had areas of necrosis and fibrosis, which probably impeded the follicular development in these rats.

**Conclusion:** The ovarian tissue transplantation technique in rats is a relatively simple technique, and is effective in body mass maintenance of animals during the observed period. This finding suggests that there were hormone production originated from the transplanted ovaries, and this, encourages research in order to obtain a technique to restore the production of viable follicles in sterile patients. Despite presenting evidence of graft failure and ischemia in the transplanted tissue, the preliminary results of this investigation need to be supplemented with additional studies in order to get the best conditions for achieving greater effectiveness of autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue.

**Keywords:** *Animal model, Autologous Transplantation, Ovarian transplantation, Fertility*

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Célsius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional Controle de Experimentação Animal
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
d	Dia
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
EG	Etileno Glicol
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
FOP	Falência Ovariana Precoce
C	Grupo controle
Sham	Grupo ooforectomizado sem transplante
Tx	Grupo ooforectomizado com transplante
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina
I.M	Intramuscular
I.P	Intraperitoneal
L/min	Litros/minuto
M	Molar
mg/kg	Miligrama/quilograma
mm	milímetro

PBS	Tampão Fosfato-Salino
T	Transplantado
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UPE	Unidade de Patologia Experimental

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, LILACS, Scielo e Periódicos CAPES.....	14
Tabela 02. Resultado do cruzamento de busca de referências bibliográficas na base de dados PubMed. .....	15
Table 3: Body Mass in grams.....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Animals Body mass gain. ....	56
Figura 2: sexual maturity rating.....	58
Figura 3: photomicrograph showing the four stages of the estrous cycle .....	60
Figure 4: Photomicrograph of vaginal lavage cytology .....	61
Figure 5: Body Count follicles Luteum.....	63
Figure 6: Count primordial follicles.....	63
Figure 7: Count Degenerated follicles.....	64
Figure 8: Count Primary follicles.....	64
Figure 9: Primary multilaminar follicle count.....	65
Figure 10: Count of secondary follicles.....	66
Figure 11: Count Tertiary follicles.....	66
Figure 12 Ovarian tissue with: .....	68



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema global crescente. Muitas pesquisas estão sendo realizadas para compreender os mecanismos da doença e desenvolver tratamentos eficazes (Luyckx, 2014). Estima-se que no Brasil, no ano de 2014, ocorreram, aproximadamente, 11.840 casos novos de câncer em crianças e adolescentes (Santos, 2015). As regiões Sudeste e Nordeste apresentaram os maiores números de casos novos, 5.600 e 2.790, respectivamente, seguidas pelas regiões Sul (1.350 casos novos), Centro-Oeste (1.280 casos novos) e Norte do país (820 casos novos). O câncer infanto-juvenil ocorre em indivíduos abaixo de 19 anos e representa de 2 a 3% de todos os tumores malignos; o óbito por neoplasias nessa faixa etária está entre as primeiras causas de morte no Brasil (INCA, 2014).

Os tratamentos para o câncer infanto-juvenil incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, realizados individualmente ou em associação (Cicogna, 2010). Os avanços na compreensão da biologia molecular e da ressonância magnética possibilitaram melhora significativa na escolha de planos terapêuticos eficazes, favorecendo a elaboração dos prognósticos de cânceres infantis (Kanda, 2014), o que possibilitou maiores índices de cura e aumento da qualidade de vida (De Oliveira, 2014). Em contrapartida, foi levantada uma questão a ser discutida no que tange aos efeitos causados pelo tratamento em relação à fertilidade (Vairoletti, 2010). Estes tratamentos não são isentos de toxicidade, causando frequentemente infertilidade, pois atingem não só as células tumorais como órgãos ao redor, danificando outros sistemas, como por exemplo, o sistema reprodutor (Dittrich, 2010).

Enfrentar um câncer sabendo da probabilidade de se tornar infértil, torna a doença ainda mais dolorosa, principalmente porque os pacientes têm que lidar com a infertilidade em um momento crítico da sua vida, onde muitas vezes não lhe sobram tempo nem condições financeiras para seguir com algum tipo de procedimento para a preservação da fertilidade (Moraes, 2010). Sendo assim, abordagens que visam preservar a fertilidade e proporcionar aos

pacientes informações relevantes sobre a questão, devem se tornar um componente integral do tratamento oncológico em jovens em idade pré-púberes (Donnez, 2013; Dittrich, 2010). Embora o tratamento e a sobrevivência sejam o foco principal dos profissionais de saúde e também dos pacientes com câncer, é conveniente considerar a sua qualidade de vida após o tratamento, incluindo a possibilidade de ter filhos (Oehninger, 2005; Su, 2008).

O interesse e a preocupação em preservar a fertilidade são similares para homens e mulheres (Jeruss, 2009). A preservação da fertilidade em homens envolve o congelamento do esperma, já em mulheres, opções diferentes para a preservação da fertilidade são comumente propostas, como por exemplo, a criopreservação de embriões e de oócitos maduros, procedimentos, que já estão bem estabelecidos para preservar a fertilidade em mulheres em idade reprodutiva (Luyckx, 2014). A criopreservação de tecido ovariano seguida de autotransplante se apresenta como a única maneira possível de preservar a fertilidade em pacientes pré-púberes e em mulheres que necessitam de tratamento do câncer de imediato (Donnez, 2013).

A técnica de criopreservação de tecido ovariano tem sido vista como tratamento promissor, visto que, tanto em animais, como suínos, ovinos e ratos apresentaram bons resultados (Ting, 2011). Segundo Silva (2014) o rato constitui um importante modelo experimental para estudos referentes ao controle do ciclo ovariano de mamíferos após autotransplante, por tratar-se de um animal que apresenta ovulação espontânea e por evoluir com perfil de variações de gonadotrofinas e esteroides gonodais semelhantes ao da mulher. Em humanos, o transplante de tecido ovariano, tem sido descritos com bons resultados (Ting, 2011; Hovatta, 2005), já tendo sido reportados 24 nascidos vivos no mundo, após congelamento de tecido ovariano e posterior autotransplante (Donnez, 2011; Meiorow, 2005; Donnez, Ernest, 2010).

Contudo, atualmente, ainda existem obstáculos em relação ao autotransplante de tecido ovariano criopreservado, devido a fatores como lesão isquêmica, assim como danos causados pelo processo durante o congelamento lento (Soleimani et al, 2010; Damazio, 2011). A maior preocupação em investir no autotransplante é a reinsertão de células malignas de volta às pacientes após o tratamento de câncer (Sonmezer, 2010). Ao considerar essa possibilidade, seria recomendável a maturação de folículos *in vitro* após a criopreservação do tecido ovariano. Essa técnica, porém, ainda é considerada bastante experimental (Marinho, 2013). Portanto, ainda são necessários extensos estudos para que esta possa ser de fato estabelecida rotineiramente e oferecida às pacientes (Marinho, 2013).

## 2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

### 2.1 ESQUEMA DE BUSCA NA LITERATURA

A revisão da literatura centrou-se nas seguintes palavras-chave: *Model animal*, *Autologous Transplant*, *Ovarian Transplant e fertility*. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS, Scielo e CAPES.

Em relação ao termo *Autologous Transplantation* foram encontrados 65.337 artigos no PubMed, 1.031 artigos no LILACS, 204 artigos no Scielo e 10.453 artigos no Periódicos CAPES, *Ovarian Transplantation* foram encontrados 6.024 artigos no PubMed, 7 no Scielo, 1.337 Periódicos CAPES e 415 no LILACS. Usando o termo *Animal Model* foram encontrados 619.324 no PubMed, 2.396 no Scielo, 540.323 no Periódicos CAPES e 3.181 no LILACS. Com a palavra *Fertility* foram encontrados 987.749 no PubMed, 2.463 no Scielo, 164.336 Periódicos CAPES e 3.103 no LILACS.

A tabela 1 sumariza a estratégia de busca das referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos do estudo.

Tabela 01. Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, LILACS, Scielo e Periódicos CAPES.

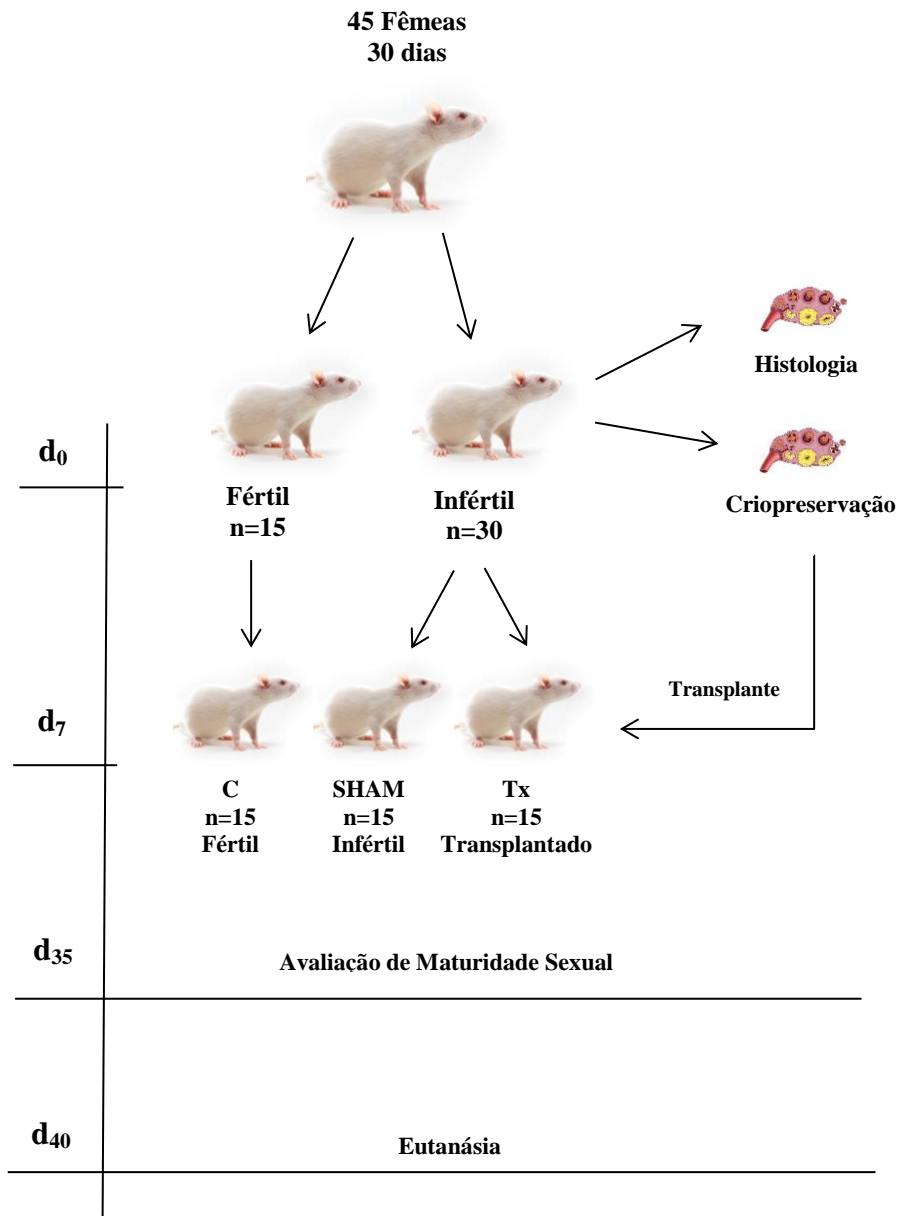
<b>Palavras-chave</b>	<b>PubMed</b>	<b>Lilacs</b>	<b>Scielo</b>	<b>Periódicos CAPES</b>
Ovarian Transplantation	6.024	415	7	1.337
Autologous Transplantation	65.337	1.031	204	10.453
Animal Model	619.324	3.181		540.323

			2.396	
Fertility	987.749	3.103	2.463	164.336

Tabela 02. Resultado do cruzamento de busca de referências bibliográficas na base de dados PubMed.

<b>Palavras-chave</b>	<b>PubMed</b>	<b>Lilacs</b>	<b>Scielo</b>	<b>Portal CAPES</b>
<i>Ovarian Transplantation e Animal Model</i>	836	45	0	21
<i>Ovarian Transplantation e Fertility</i>	1.148	68	1	189
<i>Ovarian Transplantation e Autologous Transplantation</i>	197	83	2	193
<i>Autologous Transplantation e Animal Model</i>	293	2.668	1	1.329
<i>Autologous Transplantation e Fertility</i>	15	168	1	229
<i>Fertility e Animal Model</i>	2.524	2.149	34	2.165

## 2.2 MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO



Os animais foram divididos em três grupos  $n = 15$  animais/grupo, sendo: Grupo Controle, no qual os animais não foram submetidos às cirurgias de ooforectomia ou transplante. Grupo Sham, no qual animais foram ooforectomizados, e não foram submetidos à cirurgia de transplante ovariano; e, Grupo Transplante (Tx), no qual os animais foram ooforectomizados e submetidos à transplante autólogo de ovário. Os ovários retirados dos

animais do Grupo Tx,, no momento da ooforectomia, foram criopreservados. Sendo um ovário de cada animal criopreservado e o contra lateral processado para as avaliações histomorfométricas. Após sete dias da cirurgia de ooforectomia bilateral, os animais do Grupo Tx foram submetidos à cirurgia de transplante de ovário, que foi previamente criopreservado, na região dorsal entre as escápulas.

Após o 28º dia depois do transplante, todos os grupos foram avaliados macroscopicamente quanto a sua maturidade sexual através da análise de abertura vaginal. Uma vez detectada a abertura vaginal, este indivíduo foi submetido aos procedimentos de coleta e análise dos lavados vaginais, para a determinação do ciclo estral destes, que posteriormente foram submetidos à eutanásia e os ovários transplantados foram coletados para avaliações histológicas.

### 2.3 CÂNCER

Câncer é o nome dado às doenças que têm em comum o crescimento desordenado e maligno de células (Andrade, 2015). Essas células tendem a ser agressivas, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2014), por meio da corrente sanguínea ou linfática (da Paz, 2015).

O câncer é uma doença crônica, considerada uma das doenças mais temidas pelos indivíduos, justamente pelo fato de ser muito associado popularmente a um prognóstico negativo (Rezende, 2011). Além disso, pode causar grande impacto na vida das pessoas, devido ao longo período de tratamento, bem como ao estigma de morte e também de dor (Rezende, 2011). Vale mencionar que nem todos os tumores são câncer; os tumores que não são cancerosos são denominados benignos, podendo causar problemas, como o crescimento em demasia e pressão em outros órgãos e tecidos saudáveis (Instituto Oncoguia, 2014).

Estudos mostram que novos casos de câncer têm aumentado a cada ano e a média anual entre homens e mulheres tem sido de 2,1% e 1,5% respectivamente (Rodriguez, 2014). Segundo o INCA (2014) no Brasil, nos anos de 2014 e 2015, a ocorrência foi de aproximadamente 576 mil novos casos, sendo que o câncer de pele (tipo não melanoma) atingiu cerca de 189 mil brasileiros; em segundo lugar, estão os tumores de próstata que atingiram 69 mil pacientes; seguidos de 57 mil novos casos de câncer de mama feminina; 27 mil de câncer no reto; em quinto lugar, destaca-se o câncer pulmonar, que atingiram cerca 27 mil pessoas; em penúltimo, está o de estômago, que atingiu 20 mil; e, por fim, 15 mil novas mulheres desenvolveram o câncer no colo do útero.

Segundo a OMS, estima-se que, para 2030, ocorram 27 milhões de novos casos; 15 milhões de mortes causadas pelo câncer e 75 milhões de pessoas doentes de câncer. De acordo com Almeida (2005) e citado por da Paz (2015) existem quase 200 tipos diferentes de câncer, os quais são diferenciados pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes e seu desenvolvimento afeta tanto crianças, quanto adultos. Estes autores relacionam este fato à exposição da população a diversos fatores de riscos ambientais (agentes químicos, físicos e biológicos) e, também, fatores relacionados às disparidades sociais (Andrade, 2015).

A incidência do câncer muda de acordo com a idade, sendo predominantes os casos no sexo masculino nos primeiros anos de vida e, no sexo feminino, a predominância ocorrendo na faixa de 40 a 45 anos (Bleyer, 2002). Andrade (2015) relata que mulheres mais novas possuem duas vezes mais riscos de desenvolver câncer que homens jovens e que, geralmente, o prognóstico de jovens adultos com câncer é bom, mas que a doença continua sendo a maior causa de morte em mulheres jovens e a terceira principal causa (depois da morte por acidente e suicídio) entre homens jovens, o que acaba tornando o câncer, hoje, uma das principais preocupações da agenda global de saúde (INCA, 2014).



## 2.4 CÂNCER EM CRIANÇAS E ADOLESCENTE

A cada ano um número maior de jovens terá diagnóstico de câncer (Marinho, 2013). O diagnóstico de câncer em jovens adultos afeta o corpo em pleno desenvolvimento, causando modificações em sua rotina, aliado ao impacto emocional do diagnóstico da doença (Andrade, 2015). Os jovens adultos encontram-se em uma fase de transição e, além das novas responsabilidades e as dúvidas próprias do período, terão que lidar com a adaptação à doença, o afastamento de suas atividades, além da incerteza de futuro e o convívio social e familiar (Iamin, 2011; Evan, 2006). Ainda, vale ressaltar que a maioria das neoplasias diagnosticadas atualmente, em jovens, não são conhecidas por fatores genéticos ou ambientais, mas, sim, por tumores esporádicos que afetam em sua maioria, indivíduos sem histórico familiar de câncer (Santos et al., 2013).

Assim como em países desenvolvidos, no Brasil, o câncer já representa a primeira causa de morte (7% do total) entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos (INCA, 2014). Segundo estima o INCA (2014), ocorrerão cerca de 12.600 casos novos de câncer em crianças e adolescentes no Brasil, por ano, em 2016 e em 2017. As regiões Sudeste e Nordeste apresentarão os maiores números de casos novos, 6.050 e 2.750, respectivamente, seguidas pelas regiões Sul (1.320), Centro-Oeste (1.270) e Norte (1.210).

Segundo Garcia (2015), as neoplasias infantis representam hoje um problema de saúde pública ainda maior do que no passado. Segundo Santos et al. (2013), alguns tipos de câncer frequentemente mostram menor sobrevida em adolescentes (15-19 anos) em comparação com outras idades, dentre eles: Câncer de Mama, Câncer Colorretal, Sarcoma de Partes Moles, Linfoma de Não-Hodgkin e Leucemia. Sabe-se ainda que, do ponto de vista clínico-evolutivo, os tumores infantis tendem a apresentar menores períodos de latência e quase sempre crescem rapidamente (Garcia, 2015).

Durante as últimas décadas, a taxa de cura em jovens que foram tratados para uma doença maligna aumentou substancialmente, em parte, como resultado de tratamentos mais eficazes (Tanbo, 2015). O diagnóstico precoce do câncer infanto-juvenil é importante para aumentar o índice de cura da doença (Garcia, 2015). Hoje, em torno de 70% das crianças e adolescentes acometidos de câncer podem ser curados, se diagnosticados precocemente e tratados em centros especializados (INCA, 2014).

A escolha do tratamento depende do tipo de câncer. Tem-se a cirurgia, com a finalidade de remover o tumor ou tecido que o circunde; o transplante de medula óssea; a radioterapia onde é utilizada radiação ionizante (De Oliveira, 2015) e a quimioterapia apontada como bem sucedida no que diz respeito às altas taxas de sobrevivência, mas que devido a sua ação citotóxicas, torna-se potencialmente causadora de infertilidade (Garcia, 2015). O fato é que, os tratamentos com quimioterapia e radioterapia trazem esperança para muitos pacientes com câncer, mas ainda não são capazes de poupar as células não tumorais (Moraes, 2010).

Com o aumento da incidência de câncer em adolescentes e jovens adultos, os diagnósticos precoces e os sucessos dos novos tratamentos possibilitaram o elevado número de sobreviventes em idade reprodutiva, que irão sofrer os efeitos deletérios relacionados ao tratamento da patologia (De Oliveira, 2015). O risco de infertilidade, hoje em dia, apresenta-se como uma das principais preocupações das pacientes com câncer, mas, geralmente, tal complicação, só se manifesta após o término do tratamento. Isto acontece porque a primeira preocupação do paciente e de seu médico é vencer o câncer, deixando de lado as possíveis complicações que o tratamento pode trazer (Moraes, 2010).

## 2.5 CONSEQUÊNCIAS DAS TERAPIAS ONCOLÓGICAS NA CAPACIDADE REPRODUTIVA

Sabe-se que a mulher tem uma reserva de folículos primordiais definidas e que irá valer-se desta reserva ao longo de sua vida reprodutiva. O maior número de folículos primordiais é detectado ainda na vida intrauterina, próximo à 20ª semana de gestação, valor esse em torno de 7 milhões de folículos (Freitas, 2011). Ao nascimento esse valor reduz-se para 2 milhões e continua a reduzir-se em um processo de atresia, chegando à época da menarca aos 500 mil (Faddy, 2000). Ferreira (2011) descreve que a cada ciclo menstrual esse número segue em ritmo decrescente, chegando à 25 mil folículos em mulheres com 38 anos de idade e somente aos 100 à época da menopausa.

Os efeitos da quimioterapia e da radioterapia dependem de vários fatores como: tipo de câncer, tipo de droga ou irradiação administrada, sexo e idade do paciente, tempo de tratamento e da via de administração (Moraes, 2010). Os medicamentos citotóxicos têm alto poder de lesão sobre as células reprodutivas, principalmente sobre os ovários (De Oliveira, 2015).

A quimioterapia é um dos tratamentos mais usados, pois atua de forma sistêmica (Gerreiro, 2015). A maioria dos agentes quimioterápicos atua afetando o ciclo de divisão celular e dessa forma, são afetados os, ovócitos, que entram na fase de maturação (Henriques, 2015). Este mecanismo explica a cessação da menstruação nas mulheres pós-púberes durante e logo após a quimioterapia, e também a disfunção nos níveis hormonais (Levine, 2012). Agentes alquilantes constituem as drogas que mais causam falência ovárica prematura (Lopes, 2010). E, quanto maior a dose destes agentes, maiores serão as chances para desenvolver a falência ovárica prematura (FOP) (Lopes, 2010). No câncer de mama, um agente alquilante muito utilizado é a ciclofosfamida, que quando administrado numa dose superior a 300 mg/Kg desencadeia disfunção ovulatória em 80% dos casos (Ferreira, 2011). O seu

mecanismo de ação não é completamente conhecido, mas podem lesar os ovócitos em fase de maturação assim como os ovócitos quiescentes imaturos, causando depleção do *pool* de folículos ovários (Levine, 2012; De Vos 2014). De um modo geral, estima-se que 1/3 das mulheres expostas à quimioterapia irão desenvolver FOP (Henriques, 2015).

O tratamento de radioterapia craniana pode levar a amenorreia e infertilidade como consequência de sua ação sobre o hipotálamo e hipófise, pois originam hipogonadismo hipogonadotrófico (Lopes, 2010). Em casos de câncer na região pélvica, por exemplo, um dos órgãos mais afetados pela radiação é o útero (Moraes, 2010). A dose total de radiação necessária para causar esterilização é 18,4Gy aos 10 anos, 16,5Gy aos 20 anos e 14,3Gy aos 30 anos (Ross, 2014; Coccia, 2014). No entanto, estima-se que uma dose de 2Gy pode reduzir o *pool* de ovócitos pela metade, visto que estes são extremamente sensíveis à radiação (Linkeviciute, 2014; Ross, 2014; Levine, 2012). Doses elevadas de radiação, além de diminuir a reserva ovárica, causam também lesões na musculatura uterina e estruturas vasculares, o que limita a capacidade do útero de levar uma gravidez à termo (Linkeviciute, 2014; Ross, 2014; Coccia, 2014; Levine, 2012).

A cirurgia é um tratamento eficaz para o doente com neoplasia, visto que torna possível a recuperação através da remoção completa do tumor (Henriques, 2015). No entanto, a cirurgia oncológica pode ter um impacto negativo em termos de fertilidade caso sejam removidos os órgãos reprodutivos ou quando são lesadas as estruturas necessárias para a reprodução (Rodriguez, 2013). Nas mulheres, para tratar uma lesão pré-maligna no colo do útero, por exemplo, mesmo em estágio precoce, é necessário realizar uma conização (Henriques, 2015). Esta intervenção pode diminuir a fertilidade da paciente na medida em que afeta o normal funcionamento do colo do útero (Ross, 2014; Henriques, 2015).

## 2.6 INFERTILIDADE

A infertilidade é a incapacidade de se obter uma gravidez, após um ano de tentativas com relações sexuais sem a utilização de proteção (Carvalho, 2010). Nas mulheres, a função reprodutiva está intimamente ligada ao bom funcionamento dos ovários e ao número de folículos, assim como à manutenção da anatomia e ao funcionamento normal do útero, caracterizado pela alternância de fases de crescimento e de regressão, as quais envolvem tanto as estruturas foliculares, quanto as luteínicas (Pereira, 2012).

O interesse e a preocupação em preservar a fertilidade são similares para homens e mulheres (Moraes, 2010). No entanto, as oportunidades para a intervenção diferem consideravelmente (Jerus, 2009). A preservação da fertilidade em homens envolve o congelamento do esperma; já em mulheres, existem métodos bem estabelecidos, como por exemplo, o congelamento de embriões, mas há ainda muitos desafios a serem superados (Santos, 2008; Moraes, 2010).

As taxas de infertilidade permanente e de fertilidade comprometida depois do tratamento contra o câncer variam e dependem de muitos fatores, como o tipo e a dose da droga utilizada, o tamanho e/ou a localização do tumor, o tipo de câncer, a idade e o sexo do paciente, até mesmo a forma de administração dos medicamentos (via oral ou intravenosa) (Lee, 2006; Moraes, 2010), como já comentado anteriormente. Desta forma é fundamental que todas as mulheres sejam informadas sobre o risco da diminuição ou da perda da fertilidade, após a utilização de terapêutica oncológica (Freitas, 2011).

É requerida então, uma abordagem multidisciplinar e devem ser dadas informações sobre as técnicas disponíveis, as evidências científicas existentes, os potenciais riscos e benefício, bem como devem ser levadas em consideração as preferências do paciente ou seu

responsável, de forma a ocorrer uma decisão informada e partilhada, visto que cada caso clínico apresenta variações individuais em cada paciente (Henriques, 2015).

O aconselhamento sobre preservação da fertilidade aos pacientes com doença oncológica deve ocorrer logo após o diagnóstico da neoplasia e antes do início de qualquer tratamento (Moraes, 2010). No caso de crianças ou menores de idade, a questão do aconselhamento da preservação da fertilidade deve ser discutida também com os pais ou com os responsáveis pela guarda legal e só poderá ser realizada com o consentimento destes (Henriques, 2015).

Algumas mulheres descrevem a perda da fertilidade subsequente ao tratamento do câncer, como evento tão dramático quanto o diagnóstico do câncer em si (Niemasik et al., 2014). Quase 75% das mulheres sem filhos, no momento do diagnóstico do câncer, desejam engravidar futuramente, 81% dos adolescentes e 93% dos pais destes pacientes se interessam pela preservação da fertilidade, mesmo que os tratamentos ainda sejam experimentais (Donnez, et al., 2014).

Entretanto, por se tratar de momento crítico, com muitas decisões a serem tomadas em curto período de tempo, essa conduta não é frequentemente seguida pelos oncologistas (Marinho, 2013). Niemasik et al. (2012) avaliaram a maioria das mulheres sobreviventes a neoplasias malignas sobre os riscos de infertilidade relacionados ao tratamento no momento do seu diagnóstico, uma vez que estas talvez viessem a ser submetidas ao uso de agentes citotóxicos, que possam vir a interferir negativamente na fertilidade. E, concluíram que a metade destas mulheres não se lembravam a respeito do aconselhamento sobre reprodução e preservação da fertilidade (Niemasik, 2012).

## 2.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

Nos últimos anos, a criotecnologia tem conquistado grande destaque tanto na medicina reprodutiva humana quanto na reprodução animal, seja através da criopreservação de embriões (Kumar, 2010); células germinativas masculinas (Caleghiani, 2008) ou femininas (Mahmoud, 2010); ou mesmo através da criopreservação de tecido gonadal, como ovário (Rodrigues, 2004).

A primeira tentativa de criopreservação de tecido ovariano de animais foi realizada no início dos anos 50, com o objetivo primário de restaurar a função endócrina de ratas ooforectomizadas (Parks & Smith, 1953; Conera, 2014). Na década seguinte, Parrot et al. (1960) relataram o primeiro nascimento de animais de laboratório a partir do transplante de tecido ovariano criopreservado. Somente três décadas mais tarde foi reportado por Gosden et al. (1994), o primeiro nascimento de animais de produção (ovinos), com aplicação desta técnica e que impulsionaram, não somente outras equipes a obterem resultados satisfatórios nessa mesma espécie (Salle et al., 2002, 2003), como também em outras espécies como suínos, coelhos e ratos (Souza, et al 2010, Damásio, 2011), além da espécie humana (Donnez et al., 2004).

O objetivo geral da criopreservação é a obtenção da integridade do enxerto por meio da manutenção da viabilidade anatômica e funcional das estruturas celulares (Silva, 2014). Porém, as células e tecidos são extremamente sensíveis às baixas temperaturas e para que não haja danos letais às células, é necessária a utilização de compostos orgânicos na composição da solução de criopreservação, a fim de proteger as células dos danos provocados pela redução da temperatura fisiológica para a criogênica, cuja concentração depende do método de criopreservação empregado (Castro, 2011; Conera, 2014).

Comumente, as amostras são congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, em uma temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Rubinsky, 2003; Cornera, 2014; Durli, 2014). Nessa temperatura todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares estão. Ao que indica, suspensas; portanto, teoricamente, uma célula ou tecido podem ser mantidos criopreservados indefinidamente (Sheikhi et al., 2011; Castro, 2011; Conera, 2014).

Os métodos de criopreservação de tecido reprodutivo mais utilizados são, a congelação lenta e a vitrificação (Castro, 2011; Conera, 2014). Segundo Castro (2011) os métodos de criopreservação divergem entre em si, principalmente, quanto à taxa de redução de temperatura empregada. Para o resfriamento lento, o material biológico geralmente é congelado sob o controle de um freezer programável, onde ocorre a redução gradual da temperatura, na presença de baixas concentrações de agentes crioprotetores, caracterizadas por uma curva com redução de aproximadamente  $0,3^{\circ}\text{C}$  por min, com o intuito de proporcionar tempo suficiente para uma adequada desidratação da célula ou tecido (Paynter, 2000; Durli, 2014). Durante o resfriamento gradual promovido pelo freezer programável, à medida que as células são resfriadas a temperaturas entre  $-5$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ , ocorre, primeiramente, a desidratação seguida da formação de gelo no meio extracelular (Castro, 2011; Durli, 2014).

Por outro lado, a vitrificação consiste no método de criopreservação na qual a redução de temperatura ocorre de forma brusca, cujo objetivo é a obtenção de um sólido amorfo ou em estado vítreo, que difere do sólido cristalino por não haver formação de cristais de gelo no interior dos compartimentos celulares (Yamasaki, 2002; Castro, 2011; Durli, 2014).

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica promissora para a preservação da fertilidade de mulheres jovens, que venham submeter-se a algum procedimento cirúrgico ou terapêutico, que poderá interferir negativamente na fertilidade (Courbiere, B; et al; 2005; Ernst, E; et al; 2010). O congelamento de tecido ovariano, retirado da paciente antes do início



do tratamento e o posterior autotransplante é ainda considerado um procedimento experimental e necessita de pesquisas adicionais (Ferreira, 2011).

## 2.8 TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO

O termo “Transplantar” deriva do latim tardio “trānsplantāre” ou latim moderno “translatio” e significa “transferir” ou “transportar” (Silva & Montagner, 2009; Cunha, 2010). Essa técnica envolve a transferência de um órgão funcional ou parte dele, de um indivíduo, para ele mesmo ou outro, com ou sem reestabelecimento da continuidade vascular (Macedo, 2011). O transplante de órgãos não reprodutivos vem sendo praticado com taxas variáveis de sucesso em todo o mundo há muitas décadas e as técnicas cirúrgicas estão bem estabelecidas para muitos órgãos sólidos, como rins, pâncreas, fígado, coração, pulmões e medula óssea (Bedaiwy et al., 2008).

Os transplantes são classificados levando-se em consideração a espécie receptora como: autotransplante, quando doador (a) e receptor (a) são o mesmo indivíduo; isotransplante, se o transplante ocorre entre indivíduos geneticamente idênticos; alotransplante, quando o(a) receptor(a) é outro indivíduo da mesma espécie e o xenotransplante, para doador(a) de uma espécie e receptor de outra (Macedo, 2011). A outra forma de classificação, descrita por Kronh (1977), citada por Macedo (2011), diz respeito à localização do tecido transplantando, sendo: ortotópico, quando o tecido é transplantado para um local próximo à posição anatômica de origem ou; heterotópico, se este for transferido a um sítio receptor anatomicamente distante do original.

O transplante autólogo de tecido ovariano, como um meio de preservar a fertilidade em meninas em idade pré-púberes e mulheres em idade reprodutiva, que precisam se submeter ao tratamento gonadotóxico, foi desenvolvido durante o final do século XX (Tanbo, 2015). A técnica de transplante ovariano foi descrita em humanos pela primeira vez em 1996,

em paciente que já havia sido submetida à quimioterapia. São relatados casos e pequenas séries desde então, com o replante do tecido ovariano no local original (ortotópico) (Oktay, et al; 2000; Tryde et al; 2004), ou em localizações diversas, como parede abdominal ou antebraço (Oktay, et al; 2001, Oktay, et al; 2003), heterotópico.

Em 2004, na Bélgica, foi descrita a primeira gestação espontânea após transplante ortotópico (Donnez J, 2004). A relação entre esta gestação e o transplante do tecido criopreservado foi colocada em dúvida logo após a sua publicação (Oktay, et al; 2004). O debate foi retomado em 2012, após reanálise dos prontuários e de sinais de ovulação no tecido ovariano que restou na paciente, gerando o questionamento se a gravidez havia resultado do tecido transplantado ou do tecido ovariano residual (Hubinont et al; 2012). A função ovariana residual antes do transplante, que poderia levar à gestação espontânea, é questão recorrente quando se discutem os relatos de gestação (Meirow, 2005; Sheirteghem, 2012).

Outra questão relacionada aos transplantes de tecido ovariano avasculares está na qualidade dos oócitos e longevidade do transplante, uma vez que esse tecido sofre isquemia, até que ocorra a neovascularização (Macedo, 2011). A maior parte dos trabalhos que tratam dessa questão, se detém a determinar a viabilidade dos tecidos transplantados e suas células (Oktay et al., 2001) sem, contudo, detalhar a metodologia cirúrgica, nem tampouco seus aspectos, que uma vez descritos e estabelecidos como válidos, podem ser relevantes para viabilizar uma técnica e extinguir quaisquer dúvidas sobre suas possíveis aplicações (Macedo, 2011).

Entretanto, apesar dos recentes avanços nesta área, condições ótimas para o transplante ovariano ainda não foram estabelecidas, uma vez que o sucesso da técnica depende de uma série de fatores (Macedo, 2011). Portanto, ainda persistem diversas dúvidas relacionadas ao procedimento, que ainda motivam a realização de estudos na área, tais como: quantidade de tecido a ser criopreservado; melhor técnica de criopreservação; riscos de

transplantar células malignas; melhor local para o transplante; técnicas para reduzir a isquemia tecidual e melhorar a implantação e função do tecido ovariano; por quanto tempo a função ovariana é mantida; por quanto tempo o tecido pode permanecer criopreservado e qual a probabilidade de se conseguir uma gestação (Marinho, 2012).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A criopreservação de tecido ovariano, embora seja um procedimento em fase experimental, é uma alternativa promissora para a preservação da fertilidade de jovens em idade pré-puberal. Desta forma, as pesquisas com o transplante de tecido ovariano criopreservado buscam oferecer alternativas terapêuticas, para pacientes que apresentam infertilidade após tratamentos com agentes quimioterápicos.

## **4. HIPÓTESES**

### **4.1 HIPÓTESE NULA**

A não restauração da função ovariana analisada através da histologia do ovário transplantado em ratas adultas estéreis, após transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado em fase pré-púbere.

### **4.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA**

A restauração da função ovariana analisada através da histologia do ovário transplantado em ratas adultas estéreis, após transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado em fase pré-púbere.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar a possível restauração da função ovariana, analisando a histologia do ovário transplantado em ratas adultas estéreis, após transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado em fase pré-púbere.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Obter ratas estéreis, através da cirurgia de ooforectomia.

Criopreservar o tecido ovariano.

Transplantar o tecido ovariano criopreservado.

Avaliar o ciclo estral de ratas submetidas à ooforectomia, após transplante autólogo de tecido ovariano, através da análise da citologia de lavado vaginal.

Analisar os aspectos morfológicos e histomorfométricos do tecido ovariano transplantado.

Comparar o número de folículos dos ovários sadios versus os transplantados.

## REFERÊNCIAS

- Almeida VD, Leitão A, Reina LDCB, Montanari CA, Donnici, CL, & Lopes MTP. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova*, 28(1), 118-29.
- Andrade MLF. Impacto no desempenho ocupacional de jovens adultos de 18 a 25 anos em tratamento oncológico. 2015.
- Bedaiwy MA, Shahin AY, Falcone T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. *Fertility and Sterility*, v.90, n.6, p. 2031-2055, 2008.
- Bleyer WA. Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival and importance of clinical trials, *Med Pediatr Oncol*, v. 38, p. 1-10, 2002.
- Caleghiani E.C.C., Arruda R.P., Andrade A.F.C., Nascimento J, Raphael C.F. & Rodrigues P.H.M. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has no sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104: 119-131.
- Carvalho PSR. Preservação da fertilidade masculina em doentes oncológicos [Dissertação]. Lisboa, Portugal: Repositório da Universidade de Lisboa; 2010.
- Castro SV, de Andrade Carvalho A, da Silva CMG, Faustino LR, de Figueiredo JR, & Rodrigues APR. (2011). Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39(2), 1-17.
- Cicogna EC, Nascimento LC, Lima RAG. Crianças e adolescentes com câncer: experiências com a quimioterapia. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. [Internet] 2010;18(5) [acesso em 23 nov 2014]. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S010411692010000500005>
- Coccia PF, Pappo AS, Altman J, et al. Adolescent and young adult oncology, version 2.2014. *J Natl Compr Canc Netw* 2014; 12(1): 21-32.

CONERA, VII. Avanços na criopreservação de tecido ovariano de cabras e ovelhas. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 8, p. 284-291, 2014.

Courbiere B, Massardier JS, Mazoyer B, Guerin C, François-lornage JJ. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertility and Sterility*, v. 84, p. 1065–1071, 2005.

Cunha AG. Dicionário etimológico da língua portuguesa. 4aed. Rio de Janeiro: Lexicon, 2010. 744p.

da Paz C, De Oliveira, IA. (2015). Atuação do psicólogo junto ao paciente oncológico infantil e seus familiares. *Revista Científica FAEMA*, 6(1), 172-192.

Damásio LCVC. Transplante experimental, subcutâneo e intraperitoneal, de ovário em suínos: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.

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

De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation 2. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 2014; 384:1302-10.

Dittrich R., Maltaris T., Hoffmann I, Oppelt PG, Beckmann MW, Mueller A. Preservação da fertilidade em pacientes com câncer *Minerva Ginecol*, 62 (2010), pp. 63-80

Donnez J, Dolmans MM .Preservação da fertilidade em mulheres *Nat Rev Endocrinol*, 9 (2013), pp. 735-749.

Donnez, J., Dolmans, M. M., Pellicer, A., Diaz-Garcia, C., Ernst, E., Macklon, K. T., & Andersen, C. Y. (2015). Fertility preservation for age-related fertility decline. *The Lancet*, 385(9967), 506-507.

Donnez J, Dolmans MM. Preservation of fertility in females with haematological malignancy. *Br J Haematol*. 2011; 154(2):175-84.



Donnez J, Jadoul P, Pirard C., *et al.* Born alive after transplantation of frozen - thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertil Steril*, 98 (2012), pp. 720-725

Donnez, J.; Dolmans, M. M.; Demylle, D.; Jadoul, P.; Pirard, C.; Squifflet, J.; Martinez-Madrid, B.; Van Langendonck, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*, v. 364, n. 9443, p. 1405-1410, 2004.

Durli I C, Paz AHR, Terraciano PB, Passos EP, & Cirne-Lima EO. Comparative analysis of two cryopreservation systems of ovarian tissues in female Wistar rats.

Ernest E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen CY. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/ thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2010; 25(5):1280-1.

Evan EE, Zeltzer LK. Psychosocial Dimensions of Cancer in Adolescents and Young Adults, *Cancer Supplement, Canada*, v. 107, n. 7, p. 1663-1671, oct. 2006.

Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163(1-2):438.

Ferreira FP, Junior JMS, Motta ELA. Preservação da fertilidade: a importância de oferecer esta possibilidade às pacientes com doenças neoplásicas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011; 33(9):223-6.

Freitas C, Brazão K, Farinha A, Vieira J, Ferreira M. Preservação da fertilidade na mulher com doença oncológica. *Acta Med Port*. 2011; 24(S4): 881-8

Garcia SFA, Prudenciatto B, Galli, LCD LA, Lima GB. (2015). Caracterização do uso do marketing para promover o diagnóstico precoce do câncer infanto-juvenil. *Gestão e Saúde*, Pag-2094.

Gosden, R.G.; Mullan, J.; Picton, H.M.; Yin, H.; Tan, S.L. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine, *Human Reproduction*, v. 8, p. 105-110, 2002.

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restauração da fertilidade de ovelhas ooforectomizadas por transplante autólogo de ovário armazenados a -196 graus C Hum Reprod, 9 (1994), pp. 597-603

Guerreiro DD, et al. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. Reprodução & Climatério, v. 30, n. 2, p. 90-99, 2015.

Henriques, VPP. (2015). Preservação da fertilidade-estado da arte.

Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. Reprod Biomed Online. 2005; 10(6):729-34.

Hubinont, C. et al. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue transplantation. The Lancet, v. 380, n. 9837, p. 106, 2012.

Iamin SRS, Zagonel IPS. Estratégias de enfrentamento (coping) do adolescente com câncer, Revista Psicologia Argumento, v. 29, n. 67, p. 427-435, Out./Dez. 2011.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da. Incidência de Câncer no Brasil: tumores pediátricos. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 30 maio 2014.

Instituto Oncoguia. [citado em 27 de fevereiro de 2014]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>.

Jeruss J. S, Woodruff T. Preservation of Fertility in patients with cancer. New England Journal of Medicine n360:902-11, 2009

Kanda MH, et al. A percepção dos familiares cuidadores sobre o tratamento quimioterápico em crianças e adolescentes. Cogitare Enfermagem 2014; 19(1); 84-88.

Krohn PL. Transplantation of the ovary. In: ZUCKERMAN, L.; WEIR, B.J. The Ovary, v.2. 2.ed. New York, San Francisco and London: Academic Press, 1977. cap. 3, p. 101-128.

- Kumar S., Jhamb D. & Maurya S.N. 2010. Post vitrification survival of 2-cell stage IVP buffalo embryos: effect of concentration. *Indian Journal of Animal Science*. 80: 99-103.
- Kumar S., Jhamb D. & Maurya S.N. 2010. Post vitrification survival of 2-cell stage IVP buffalo embryos: effect of concentration. *Indian Journal of Animal Science*. 80: 99-103.
- Lee S J et al. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology* ; v24:n18: 2917-2927,2006.
- Levine J. Gonadotoxicity of cancer therapies in pediatric and reproductive-age females. In: Gracia C, Woodruff TK, editors. *Oncofertility medical practice: clinical issues and implementation*. New York: Springer; 2012. P.3-14.
- Linkeviciute A, Boniolo G, Chiavari L, et al. Fertility preservation in cancer patients: The global framework. *Cancer treatment reviews* 2014;40:1019-1027.
- Lopes SPF. *Preservação da fertilidade em doentes oncológicos [Dissertação]*. Porto, Portugal: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2010.
- Luyckx V, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 4, p. 1149-1156, 2014.
- Macedo, MFD. (2011). *Transplante ovariano autólogo em diferentes sítios anatômicos de ratas ovariectomizadas*.
- Mahmoud K.Gh.M., Sholkamy T.H., Ahmed Y.F., Seidel G.E. & Nawito M.F. 2010. Effect of different combination of cryoprotectantes on *in vitro* maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reproduction in Domestic Animals*. 45: 565-571.
- Marinho, R. M., Rodrigues, J. K, Lamaita, R. M., Cota, A. M. D. M., Wainstein, A. J. A., Wainstein, APDL, Caetano JPJ. (2013). *Preservação da fertilidade em mulheres com câncer: atualização e perspectivas*. *Revista Médica de Minas Gerais*, 23(4), 510-517.

Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med.* 2005; 353:318-21.

Moraes, IG. Preservação da fertilidade em pacientes portadoras de neoplasias malignas. *Rev. Med. Res.* 2010;12(1):35-44.

Niemasik EE, et al. Patient perceptions of reproductive health counseling at the time of cancer diagnosis: a qualitative study of female California cancer survivors. *Journal of Cancer Survivorship*, v. 6, n. 3, p. 324–332, 2014.

Niemasik EE, Letourneau J, Dohan D, Katz A, Melisko M, Rugo H, et al. Patient perceptions of reproductive health counseling at the time of cancer diagnosis: a qualitative study of female California cancer survivors. *J Cancer Surviv.* 2012 Sep;6(3):324-32.

Oehninger, S. (2005). Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 12(4), 222-231.

Oktay K, Karlikaya G. Ovarian Function after Transplantation of Frozen, Banked Autologous Ovarian Tissue. *The New England Journal of Medicine*, v. 342, n. 1919, 2000.

Oktay K, Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *The Lancet*, v. 364, n. 9451, p. 2091–2092, 2004.

Oktay K. et al. Endocrine Function and Oocyte Retrieval After Autologous Transplantation of Ovarian Cortical Strips to the Forearm. *JAMA*, v. 286, n. 12, p. 1490–1493, 2001.

Oktay K.; Buyuk E.; Rosenwaks Z R, James A. Technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertility and Sterility*, v. 80, n. 1, p. 193–198, 2003.

Parkes A S, Smith AU. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 140, n. 901, p. 455-470, 1953.

- Parrot, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil*, v 1, p. 230-241, 1960.
- Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Update*, v.6, p.449-456, 2000.
- Pereira, M H. Preservação da fertilidade em crianças e adolescentes com cancro. 2012.
- Rezende, A.M. Compreendendo o adolescente com câncer: vivências da doença. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2011.
- Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004a.
- Rodriguez-Wallberg, Kenny A., and Kutluk Oktay. "Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines." *Cancer management and research* 6 (2014): 105.
- Ross L, Chung K, Macdonald H. Fertility preservation in the female cancer patient. *J SurgOncol* 2014; 110:907-911.
- Rubinsky, B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews*, v. 8, n. 3, p. 277-284, 2003.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R. C., Guerin, J. F. And Lornage, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility*, v. 77, n. 2, p. 403-408, 2002.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Berthollet, C.; Lornage, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*, v. 80, n. 1, p. 172-177, Jul 2003.
- Steirteghem AV. Lack of ethical approval and omission of experimental evidence. *Hum Reprod*. 2012;27(7):1881.

Santos FMG, Santos SC. A percepção da criança com cancer sobre a sua doença. UNILUS Ensino e Pesquisa, v. 12, n. 28, p. 136, 2015.

Santos R R, Celestino J J H, Lopes C A P, Melo M A P, Rodrigues A P R, Figueiredo J R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. Revista Brasileira Reprod Animal Belo Horizonte v32, n1:9-15, 2008.

Silva, JMM. Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lento após intervalo precoce e tardio de castração em ratas. SILVA, 2014.

Sheikhi, M., Hultenby, K, Niklasson, B, Lundqvist, M, Hovatta, O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reproduction*, v. 26, n. 3, p. 594-603, 2011.

Silva, AC, Montagner, AC. Dicionário Latino-Português: Etimologia, Gramática, Derivações, Exemplos. Petrópolis, RJ: Editora Vozes, 2009. 527 p. 96.

Silva, J M M. Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lento após intervalo precoce e tardio de castração em ratas. SILVA, 2014.

Soleimani R, et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle. *Human reproduction*, v. 25, n. 6, p. 1458-1470, 2010.

Sonmezer, M., & Oktay, K. (2010). Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 24(1), 113-126.

Steirteghem AV. Lack of ethical approval and omission of experimental evidence. *Hum Reprod*. 2012; 27(7):1881.

Su HI, Lin K, Bracia CR: Early menopause in cancer survivors: fertility options. *Menopausal Med* 2008; S1-8.

Tanbo, Tom et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue after treatment for malignant disease—the first Norwegian results. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, v. 94, n. 9, p. 937-941, 2015.

Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online*. 2004;8:448-53.

Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod*. 2011; 26(9):2461-72.

Vairoletti E. Fertilidade uma questão a ser discutida. *Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia*. 2010; 3(14):38-41.

Yamaki S.B., Pedroso A.G. & Atvars T.D.Z. 2002. O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química (físico-química). *Química Nova*. 25(2): 330-334.

## 6. ARTIGO

**Artigo:** *Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue cryopreserved pre-pubescent in ovariectomized rats*

O presente artigo será submetido e foi elaborado conforme as normas da Revista *Journal of Ovarian Research*.



*Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue cryopreserved pre-pubescent in ovariectomized rats*

Cristina Botelho Messias<sup>1,2</sup>, Paula Barros Terraciano<sup>1,2</sup>, Silvana Bellini Vidor<sup>2,4</sup>, Cristiana Palma Kuhl<sup>2</sup>, Isabel C.L.O. Durli<sup>1,2</sup>, Raquel Schneider<sup>2</sup>, Fernanda Oliveira<sup>2</sup>, Eduardo Pandolfi Passos<sup>1,2,3</sup>, Elizabeth Obino Cirne-Lima<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas - Faculdade de Medicina UFRGS - Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Aluna de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Correspondence to:

Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima

Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350/700, 90035-903 – Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55051 3358-8989

E-mail: cirnelima@hcpa.edu.br

*Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue cryopreserved pre-pubescent in ovariectomized rats*

**Abstract**

**Introduction:** Ovarian tissue cryopreservation is a promising treatment and it is presented as the main way to preserve fertility in prepubertal patients and women who need cancer treatment immediately. However still remain obstacles related to the ovarian tissue cryopreserved autograft due to ischemic injury, damage caused by the freezing process and selecting the best location for the graft.

**Objective:** Investigate a possible restoration of the ovarian function by analyzing the histology of the ovary transplanted into sterile adult rats after autologous transplantation of ovarian tissue cryopreserved in prepubertal phase.

**Methods:** 45 Wistar rats, 30 days old, which were randomly divided into three groups: control group (n = 15), normal fertile; Sham group (n = 15), underwent bilateral oophorectomy; Transplantation group (n = 15), underwent bilateral oophorectomy followed by autologous transplantation in the scapular area. From the d35, sexual maturity was observed by examining the vaginal opening and vaginal smears, for evaluation of the estrous cycle. After observing the phase of the estrous cycle, the animals were euthanized. The tissue samples were collected and processed for histological evaluation of ovarian implants; where structural organization of the transplanted tissue and adjacent as well as follicular development were analyzed.

**Results:** Regarding sexual maturity evaluations, observed by vaginal opening analysis and microscopic analysis of material obtained from vaginal swabs, we could observe that the animals in the control group cycled normally. The rats of Sham and Transplant Group showed no regular cycle, staying in diestrus phase. The histological assessments of prepubertal

ovarian tissue samples implanted in young adult females showed ovarian degeneration, since they had areas of necrosis and fibrosis, which probably impeded the follicular development in these rats.

**Conclusion:** The ovarian tissue transplantation technique in rats is a relatively simple technique, and is effective in body mass maintenance of animals during the observed period. This finding suggests that there were hormone production originated from the transplanted ovaries, and this, encourages research in order to obtain a technique to restore the production of viable follicles in sterile patients. Despite presenting evidence of graft failure and ischemia in the transplanted tissue, the preliminary results of this investigation need to be supplemented with additional studies in order to get the best conditions for achieving greater effectiveness of autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue.

**Keywords:** *Animal model, Autologous Transplantation, Ovarian transplantation, Fertility*

## Introduction

With increasing survival rate after treatment for cancer in girls before puberty and women in reproductive age, has been growing the focus on life quality (Tanbo, 2015). The treatment with radio and chemotherapy provide alternatives for many cancer patients, but are healthy cycles are not preserved and these procedures can lead to infertility (Moraes, 2010). Cytotoxic drugs affect cells that have a high rate of cell replication, as neoplastic cells; but also act on the germ cells, threaten fertility by diminishing the primordial follicle pool which may result in infertility and ultimately premature ovarian failure (De Oliveira, 2015).

Several treatments have been developed to preserve or restore fertility in young women diagnosed with cancer (Tanbo, 2015; de Carvalho, 2015). According to Tanbo (2015), one option is the cryopreservation of ovarian tissue before treatment, followed by autologous transplantation.

According to Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2014), there are some controversies regarding the autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue, due to factors such as ischemic injury as well as damage caused by cryopreservation, as well as concerning the best place to perform the graft.

However, extensive studies are necessary, in order to establish alternative more effective for the patients. The aim of this study was to verify the restoration of ovarian function, by macroscopic evaluation, and by the analysis of the architectural structure of the ovary transplanted into infertile adult rats after transplantation of cryopreserved autologous ovarian tissue in prepubertal.

## 7. MATERIALS AND METHODS

### 7.1 Ethical Aspects

This project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) HCPA. The animal maintenance care is according the Animal Experimentation Unit of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre norms (UEA-HCPA). The *in vivo* procedures were performed to current Brazillian legislation, Law 11.794 - 08/10/2008 and in accordance with international standards (Guide for the Care and Use for Laboratory Animals of the National Institutes of Health Revised Edition 2006). Euthanasias followed the standards set by the Guidelines Euthanasia Practice CONCEA (2013).

### 7.2 Animals

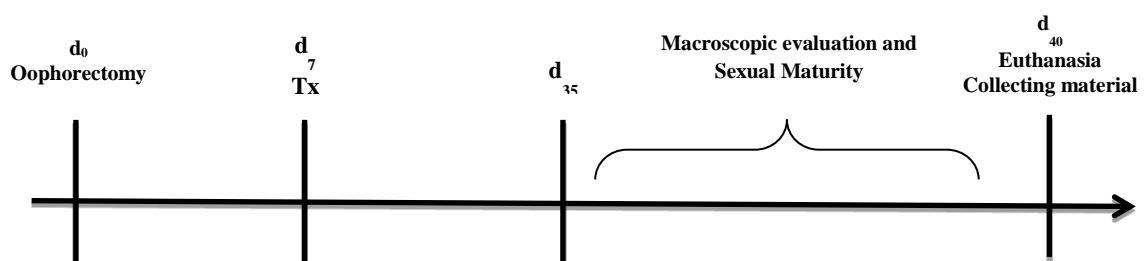
This study was conducted with 45 prepubertal Wistar rats, 30 days old, weighing between 70 and 95 grams, from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas RS, Brazil. An animals were housed in UEA-HCPA, where they received commercial food and water *ad libitum*. They were kept under temperature and humidity controlled air ( $22 \pm 2C^{\circ}$  and 40-60% respectively) and photoperiod of 12/12 hours. After an acclimatization period mice were randomly divided into three groups (n = 15):

C Group - animals who have not suffered any surgical procedure, fertile and normal;

SHAM Group - animals submitted to bilateral oophorectomy and had not received the graft of ovarian tissue cryopreserved, composing a infertile group;

Tx Group- animals submitted to bilateral oophorectomy and 7 days, late were submitted to heterotopic autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue in the dorsal area between the shoulder blades.

### 7.3 Experimental Design



### 7.4 Anesthetic

All surgeries and procedures were performed under general inhalation anesthesia with Isoflurane (Instituto Bioquímico Indústria Farmacêutica LTDA, Brazil), vaporized in 100% oxygen, with 5% isoflurane dose for induction and 2% dose for maintenance (in 0.5 L/min) and all the animals received a single dose of tramadol chloride (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Brazil) ( $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) intraperitoneally to the analgesic support with final volume of approximately 0.01ml, according to the body weight.

During surgery procedure, animals were monitored for absence of reflection interdigital, tail and breathing pattern. Body temperature was maintained by heat mat.

## **7.5 Oophorectomy**

Bilateral oophorectomy was performed on animals according to protocol established by Waynforth and Flecknell 1992.

The immediate analgesia was performed with a single dose of dipyron (Teuto / Pfizer, Anapolis, GO) (500 mg kg<sup>-1</sup>). The control of pain in the postoperative period was performed with tramadol (10mg kg<sup>-1</sup>, IP) twice a day, every 12 hours during 3 days.

## **7.6 Transplant**

The thawed ovarian tissue was transplanted to the region between the shoulder blades through a skin incision of 0.5 cm further, skin was sutured with nylon 5-0, standard Swift.

## **7.7 Ovarian tissue cryopreservation**

Automatic freezing system (CL 8800 - CryoBath, Freeze Control® automatic) for cryopreservation of ovarian tissue was used the ovarian tissue fragment was preserved in 1.5M ethylene glycol, and submitted to a fast freezing curve, lasting 35 minutes. The temperature range was between 20 ° C to - 45 ° C as described by Durli (2014). Samples were stored in cryovials and stored in liquid nitrogen (- 196 ° C).

## **7.8 Ovarian tissue thawing**

After a week, samples of cryopreserved ovarian tissue were removed from liquid nitrogen and kept at room temperature for 2 minutes. They were then transferred to 37 °C for another 2 minutes and washed with saline solution to remove the cryoprotectant, according to the protocol established by Durli in 2014.

Before transplantation, fragments were rinsed in iodine 1% solution, followed by physiological solution at 0.9% washes (3 times).

## **7.9 Macroscopic evaluation of Sexual Maturity**

Females were macroscopically evaluated from day d<sub>35</sub>, in order to confirm their sexual maturity status applying the vaginal opening technique.

Before puberty in mice, the vagina is closed by a transverse septum epithelial, which begins to decay between the 20 and 35 days of age. The septum disintegration occurs between 40 and 70 days of age, leading to the formation of a continuous lumen.

## **7.10 Estrous cycle detection**

Females were submitted to vaginal cytology from d<sub>35</sub> as described by Ceschin and collaborators in 2004, for confirmation of the estrous cycle. Vaginal suspension was collected with 0.25 ml saline 0.5% (Ceschin, 2004).

The smears were evaluated according to Cooper et al. (1989). These authors observed that the relationship between ovarian estrogen and vaginal cytology in rats is represented by an ovarian cycle with an average duration of four days, divided into three distinct phases, described below.



Diestrus: characterized by low estrogen concentrations circulating in blood and vaginal smears with a predominance of leukocytes and some cornified epithelial cells interposed. This phase is considered as pre ovulatory.

Proestrus - there is an increase in estradiol concentration in blood and the vaginal smear is predominantly compound by polymorphonuclear cells, dispersed or accumulated. This is the stage at which ovulation occurs.

Estrous - there is a decrease in estradiol levels blood detection and a predominance of epithelial cells, squamous, cornified in vaginal smears. This is the post-ovulatory phase.

### **7.11 Histological Analysis**

After 33 days of transplantation (d40), animals were euthanized. The transplanted ovaries were removed, fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin.

During sexual maturity evolution period showing animals proestrus were euthanized and their ovaries were histologically processed and evaluated. Other animals that did not presented proestrus phase were euthanized on day 40.

### **7.12 Follicular Classification**

Follicles were classified according to the modified criteria of Oktay, et al; 1995 as follows: pre-antral follicles are divided into primordial, primary and secondary. Primordial follicles typically contain oocyte surrounded by a partial or complete layer of squamous granulosa cells. On the other hand primary follicles, is possible to observe a single layer of cubic granulosa cells; and secondary follicles are characterized by presence of more than one layer of cubic granulosa cells. Antral follicles can be classified in antral and pre-ovulatory. Which are evident and well-differentiated layers of granulosa cells, theca and a single large antral cavity containing a cumulus cell layer surrounding the oocyte. Follicles were evaluated and classified due to its integrity. Follicles were identified as normal, even when they had cytoplasmatic and / or irregular contour vacuolization, as these characteristics are considered reversible. On the other hand, when pyknosis follicles were observes it were considered unhealthy (Durli, 2011).

Transplanted ovarian tissue were evaluated to observe tissue integration, organ structures and vascularization or tissue rejection indirect evidences (presence of connective tissue, lack of functional ovarian tissue and the presence of leukocyte cells); as well as regards to the specific characteristics of the follicles, mentioned earlier. Structural and functional changes according to Macedo (2011) were evaluated in the surrounded transplanted area.

### 7.13 Statistical Analysis

For body mass analysis was applied the generalized estimating equations (GEE) method and data were expressed as mean  $\pm$  standard error. The vaginal opening parameter and follicles quantification were nonparametric data and were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test and the Mann-Whitney test, respectively. These data were expressed as median (interquartile range 25-75). Tests were performed with SPSS 20.0 software and were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## 8. RESULTS AND DISCUSSION

### Body Mass Analysis

Body mass of all animals, were observed. And possible to observe a body mass gain throughout the entire experimental period, which comprised 40 days. This observation is in agreement with expectations considering free offer food and their healthy status. However, infertile animals typically gain more body mass than fertile animals. In this regard, body mass evaluation is an interesting parameter to be analyzed, when the possibility to reverse infertility was examined in oophorectomized animals undergoing autologous ovary transplant (Tx Group) compared to fertile animals (Group C) and infertile (Sham group). In this vein was verified that transplanted animals (Tx Group) possess statistically the same body mass compare to fertile animal (C Group) at the beginning 13 days after ovarian transplantation (d20). At the same time, infertile animals (Sham Group) presented higher body mass gain ( $18.48 \pm 3.36$ ) than fertile animals (Group C) ( $170.81 \pm 2.24$ ) with significance level (p) equal to 0.001.

When animals were subjected to subsequent evaluations (d34 and d40), it was observed a statistically significant difference in body mass gain when fertile versus infertile animals were compared. Infertile animals (Sham Group) gained more body mass than C Group, as shown in Table 3. However, Tx Group animals body mass gain has compatible infertile Group gain only in the first evaluation after ovarian transplantation procedure (d20). On the other after hand, where a ovarian transplanted animal body mass gain was evaluated on days d34 and d40 was possible to observe that transplanted animal exhibit intermediate values for body mass when they were companied to fertile and infertile animals as a tendency whit no statistically significance. Thus, this data suggests that the ovarian transplants in the Tx group has

been feasible or practical for a short period of time, since these animals showed body mass gain similar to the gain of the fertile animals, and not statically different from infertile animals on the 20th day. Yet, in subsequent observations (d34 and d40) there was indirect evidence that the ovarian tissue transplanted was ceasing to be viable and functional, since the body weight gain values in females who received autologous ovarian tissue became in-between of the other two experimental groups.

These results confirm data described in literature for body mass gain, as Szabo et al. (2000) who described higher body mass gain in oophorectomized cats when compared to fertile. Melton and colleagues (2000) also observed the same effect in adult rats and Vasconcellos et al (2004) in young and adult rats.

The body mass gain of oophorectomized rats may be related to the ovarian hormone deprivation, as suggested by Vasconcellos (2004), as estrogen increases the energy consumption and, consequently, decreases body mass as described by Guyard, 1993. Thus, the data presented herein concerning body mass gain of transplanted animals could be due to a possible hormonal influence deriving by the partially functional ovarian.(Figure 1)

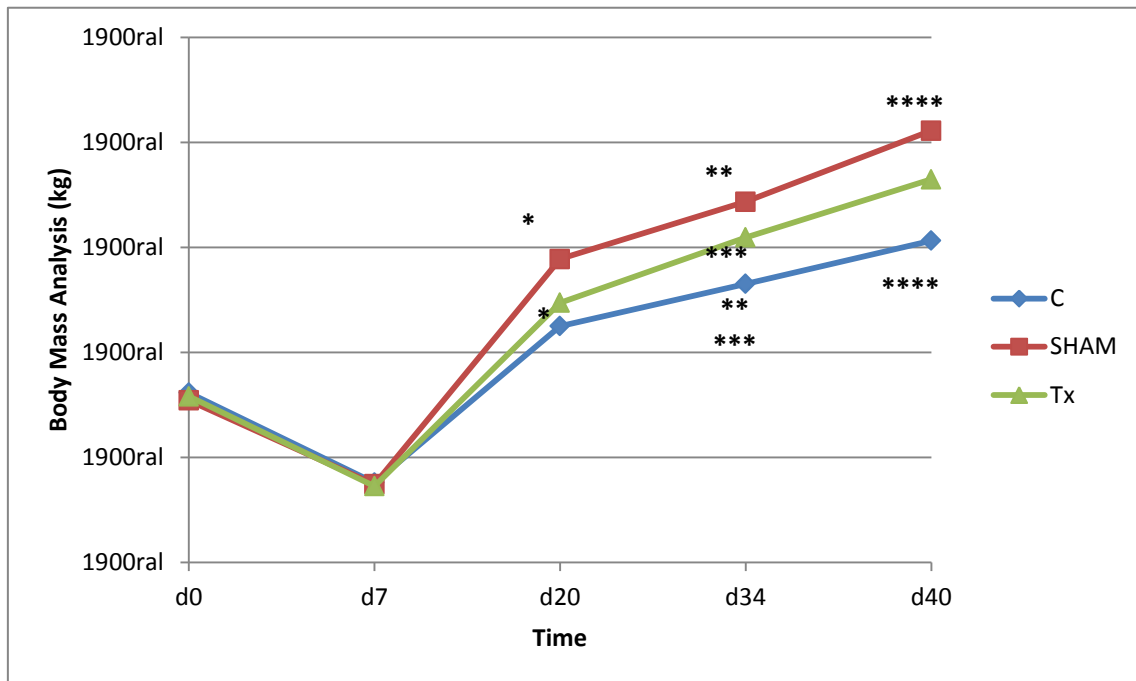


Figure 1: Animals Body mass gain. This chart shows that infertile animals (Sham Group) body mass is higher than the gain of the fertile animals (C Group); in d20. Ovarian transplanted animals (Tx Group) presented mass body gain consistent with the fertile ones and different from infertile. Values expressed as mean  $\pm$  standard error. \*  $p=0.0001$ ; \*\*  $p=0.052$ ; \*\*\*  $p=0.028$ ; \*\*\*\*  $p<0.000$ .

	<b>C</b>	<b>Sham</b>	<b>Tx</b>
<b>d0</b>	80.83±1.775	77.19±0.973	79.05±1.894
<b>d7</b>	111.31±2.193	105.87±2.307	107.39±3.227
<b>d20</b>	170.81±4.522	188.48±4.495	175.43±5.078
<b>d34</b>	186.83±5.711	209.47±4.186	199.73±6.179
<b>d40</b>	203.35±5.905	235.43±5.168	221.42±7.796

Table 3: Body Mass in grams. Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

### **Sexual Maturity**

In order to verify females sexual maturity vaginal opening observation method was applied., Females (C, Sham and Tx groups) were daily assessed by vaginal opening technique from the 28<sup>th</sup> day after ovarian tissue transplant (Tx Group). According to Ceschin and colleagues (2004) vaginal opening is easily observed after the first estrous cycle in rats. Considering that all female rats used in this study possess 30 days old at the beginning of the experiment (d<sub>0</sub>), and Noda and colleagues (2002) described the occurrence of the first estrous cycle in rats at 34 to 36 days of life, assessed fertile rats should be cycling between d<sub>4</sub> and d<sub>6</sub>. Therefore, soon after d<sub>6</sub> would be possible to observe the vaginal opening in fertile rats (C Group).

In accordance with published data mentioned previously, the results presented herein demonstrated that the vaginal opening encountered on fertile females (C group) in d<sub>35</sub> is compatible with mature sex age condition as expected since estrus cycle is supposed to initiate for the first time between d<sub>4</sub> and d<sub>6</sub>. And it is important to note that the gain of sexual maturity was exclusively observed on fertile females (C group). T Noda and colleagues (2002) demonstrated that elevated serum estradiol levels in rats was concomitant to vaginal opening detection (from 34 to 36 days of life).Friedrich

(2003) who studied estrogen receptor expression changes and estradiol levels in rats ovaries, uterus and vagina observing fertile females during prepubertal to puberty period demonstrated that serum estradiol levels enhanced in parallel with vaginal opening process. In contrast, the vagina opening process was lower in infertile female rats. The results encountered in the present study, clear cut demonstrated that vaginal opening process was observed in infertile females from Sham and Tx groups in d<sub>39</sub>, which correspond to 69 life days and the vaginal opening process was observed with a stunted appearance. These data were in accordance with Noda and colleague (2002) and Friedrich (2003) who described that late vaginal opening is characteristic in infertile females that were not under estradiol hormone high levels influences. In this sense, Figure 2 shows the differences in time of the vaginal opening, between the different experimental groups.

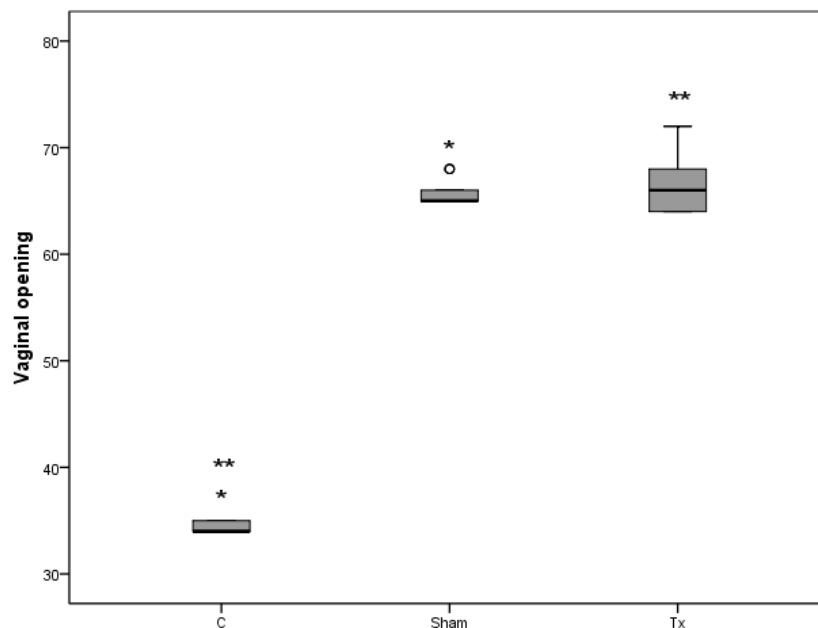


Figura 2: sexual maturity rating. Values expressed as median and interquartile range. \* P <0.001; \*\* P <0.001. o = Outlier



### **Vaginal Cytology**

Considering that ovarian cycles can be detected in rodents only when housed on regular lighting conditions the ambient light was under control to guarantee vaginal cytology analysis. Photoperiods standard have been defined as 12 to 14 hours of exposure to visible light. According to Cooper (1993), Baird (1999), Alberti (2002), the changes in photoperiods can lead to several cycle changes , including ovulation inhibition and maintenance of persistent vaginal smears in estrous.

The standard previously determined by authors such as Long & Evans, 1922; Mandl, 1951; Cooper et al., 1993; Marcondes et al., 2002 and referenced by Ceschin, 2004, allowed an assessment of the estrous cycle phases, on fertile and infertile females. The results obtained with vaginal smear evaluation in this study, described that fertile females exhibited regular sequence of vaginal cycles with the detection of diestrus, proestrus, estrus and metaestrus (Figure 3). On the other hand, when vaginal cytology was observed in infertile females ovarian transplanted or not (Sham and Tx Groups) was observed that these animals remained in diestrus vaginal cycle stage (Figure 4). Thus, the vaginal cytology data obtained from the vaginal smears analysis of female rats from C Group indicated that this data were compatible with fertile status classification once it was possible to observe all estrous cycle stages in the collected material.

On the other hand, focusing the vaginal cytology analysis of the female rats of Sham and Tx Groups it was observed that they did not show regular estrous cycle and presented all features of the diestrus phase. This observation was expected to Sham group animals because all these females were oophorectomized on the first day of the experiment ( $d_0$ ). However, when transplanted animals were analyzed the findings indicated that transplanted ovarian tissue was not able to produce or to secrete in

accessible form ovarian hormones secrete accessible. Alberti in 2002 and Ceschin (2004) also described that female mice who underwent oophorectomy and autologous transplant of ovarian tissue in retroperitoneal and inguinal region, respectively did not secrete serum detectable estradiol hormone levels.

As Villela (2007), our findings confirm that the estrous cycle allow an accurate assessment of ovarian activity, considering this changes abruptly due to variation in estradiol levels, as well as any change that leads to the disruption of this standard on environmental or toxic agents.

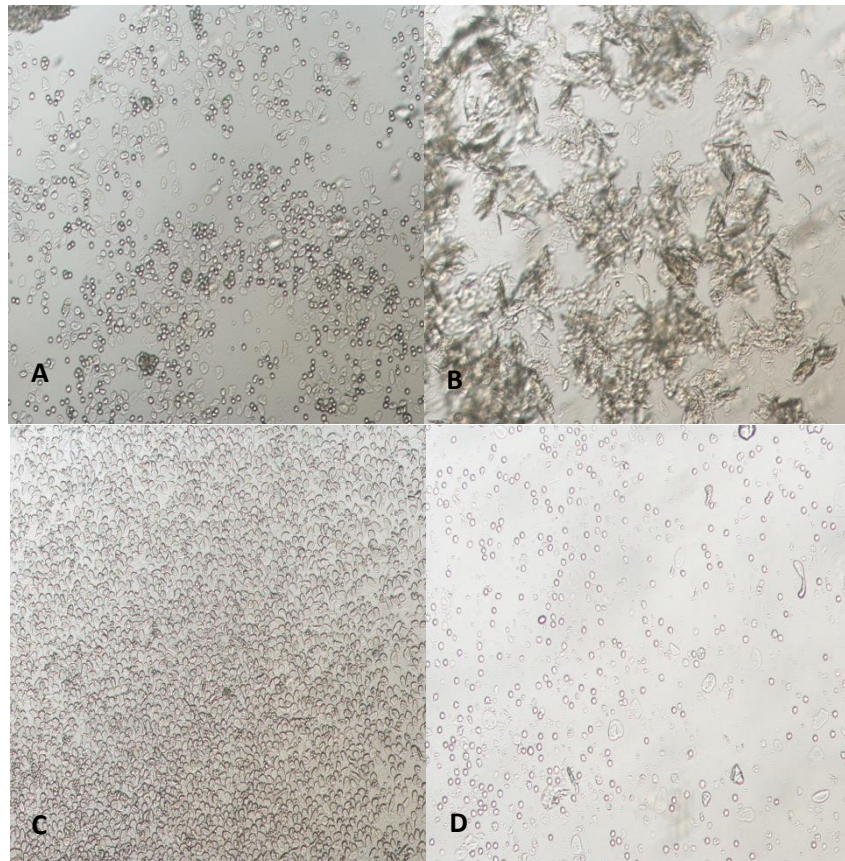


Figura 3: Photomicrograph showing the four stages of the estrous cycle, observed by cytology of vaginal smears of fertile females (Group C). 40x magnification and 100x. A- proestrus; B-Estrus; C-Metaestrus; D- Diestrus.

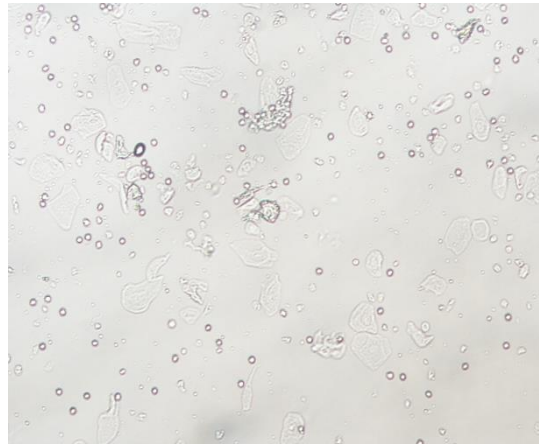


Figure 4: Photomicrograph of vaginal lavage cytology, showing typical diestrus image, which was observed in all females of Sham and Tx Groups in all analyzed periods (d35 to d40). 40x magnification and 100x.

#### **Histological evaluation: prepuber and mature ovarian tissue**

According to the experimental design the ovarian tissues have been collected from all animal groups, but it occurred in different periods of time. In order to confirm the normal pattern of histological ovarian tissue organization the collected organs obtained when females have been oophorectomized (d<sub>0</sub>) (Sham group) were processed for histological analysis and will be referred as prepubertal organs. In the same way, normal ovarian tissues collected at the end of the experiment (d<sub>40</sub>) obtained from the control group which was compound by normal young adult female rats processed for histological analysis are referred below as normal mature samples from ovarian tissues. These prepubertal and mature normal ovarian samples have been shown to perform the normal prepubertal and mature ovarian organ comparison versus collected samples of ovarian transplanted obtained 33<sup>th</sup> after organ transplantation. In this vein, as expected when ovarian mature tissues was evaluated, was possible to observe an important and

higher number of corpus luteum, when compared with the material obtained from Sham Group, since the ovaries of these were collected when the females were in prepubertal phase ( $p < 0.001$ ) (Figure 5). Further, the primordial and degenerated follicles were more abundant ( $p = 0.019$  and  $p < 0.001$ , respectively) in the prepubertal ovarian tissue samples obtained from Sham Group members compared to those obtained from the mature females (C Group animals) (figures 6 and 7).

When animals from Sham and C Groups were evaluated to the presence of primary follicles unilaminar, primary multilaminar, secondary and tertiary, in ovarian tissues was possible to observe that both follicles were more numerous in the ovaries obtained from prepubescent animals (Sham group); however, there were no statistical differences in the comparison of animals of these parameters (Figures 8,9,10 and 11).

The results showed that the ovarian tissue obtained from animals of Sham Group presented prepubescent morphological characteristics, as demonstrated by Oberlender (2014) when evaluated prepubertal ovaries of swine females and Bagg et al. 2004, Knox 2005, which emphasized the absence of ovulation and corpus luteum signals. Furthermore, as noted by Diehl et al. (2003), Moreira et al. (2006) and Karvelienė & Riðkevièienė (2009) all normal ovaries evaluated in the present study showed the typical ovary histological characteristics and possessed the expected regular organ development encountered in prepubertal and mature phase.

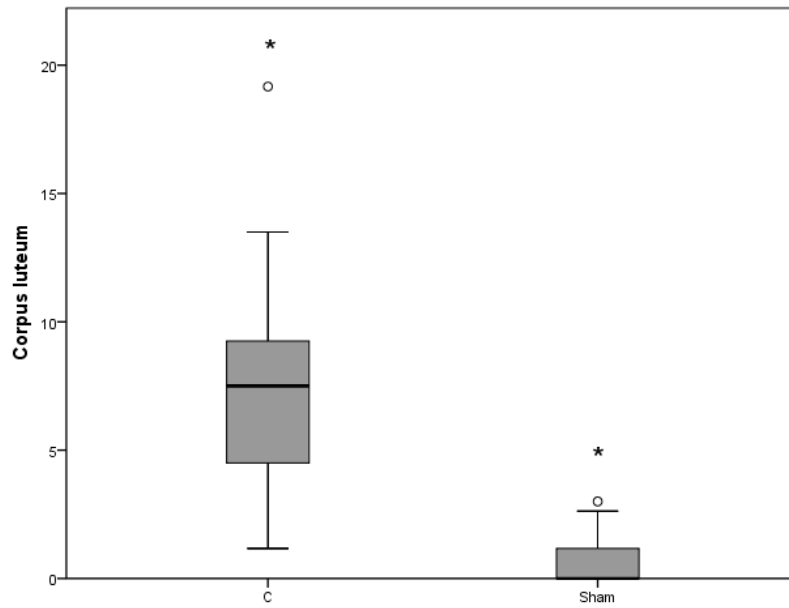


Figure 5: Body Count follicles Luteum. Values expressed as median and interquartile range. \* P < 0.001; ◯ = outlier.

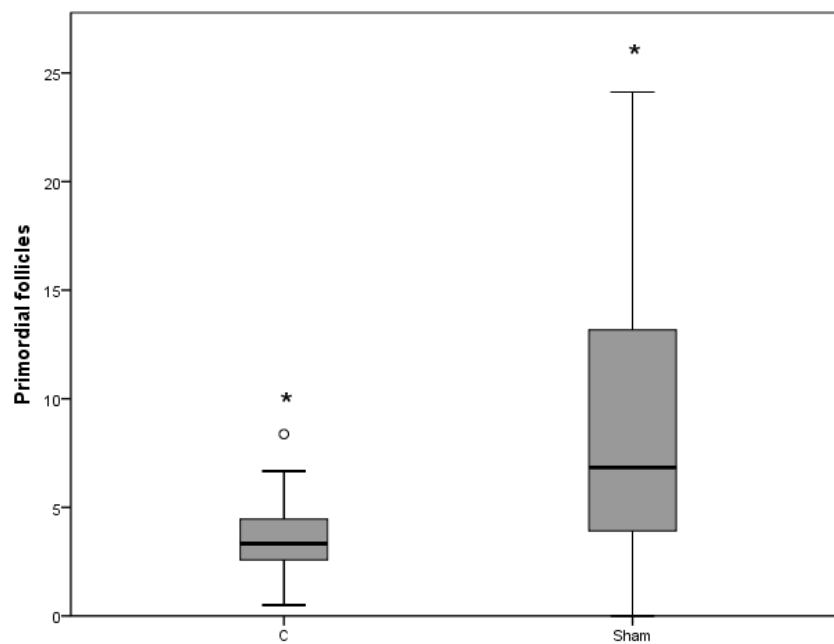


Figure 6: Count primordial follicles. Values as median and interquartile range. . \* P = 0.019; ◯ = outlier.

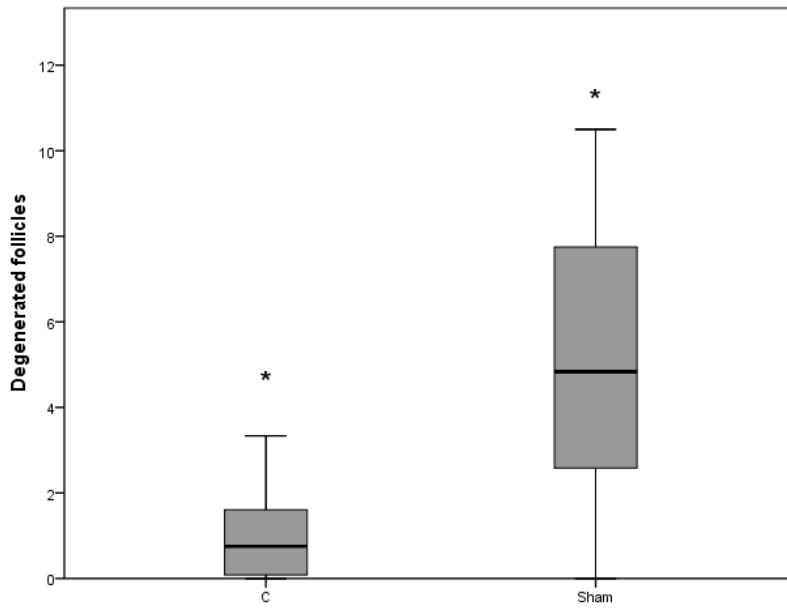


Figure 7: Count Degenerated follicles. Values expressed as median and interquartile range. \*  $P < 0.001$ .

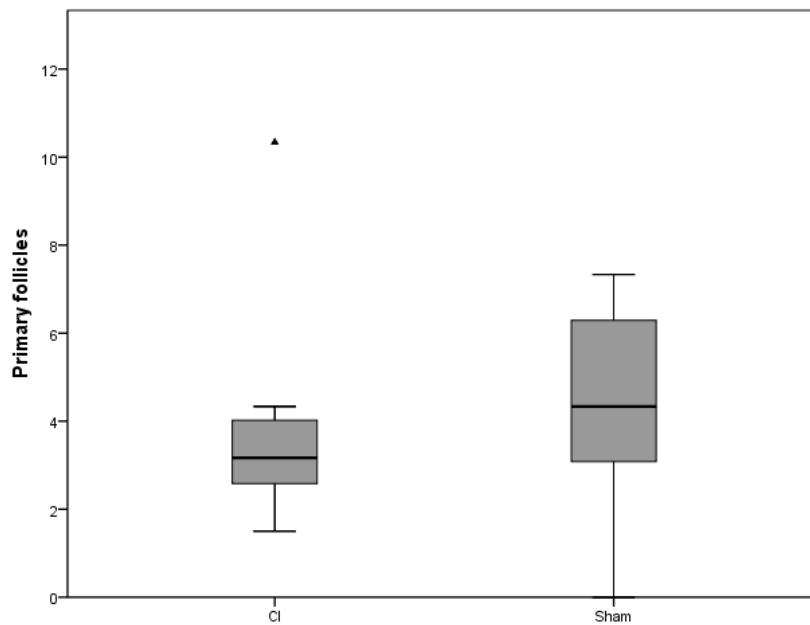


Figure 8: Count Primary follicles. Values as median and interquartile range. ▲ outlier.

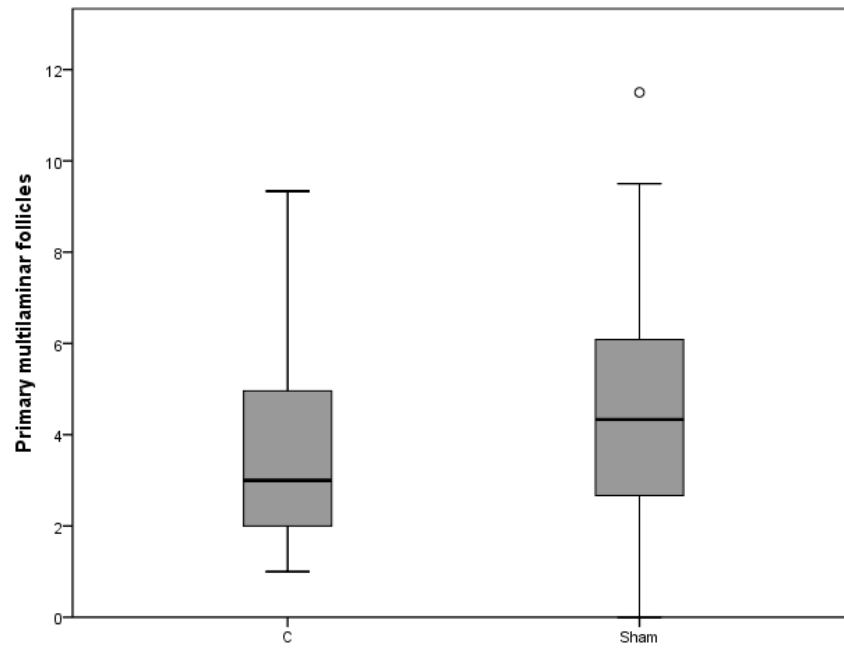


Figure 9: Primary multilaminar follicle count. Values as median and interquartile range.

○ = Outlier.

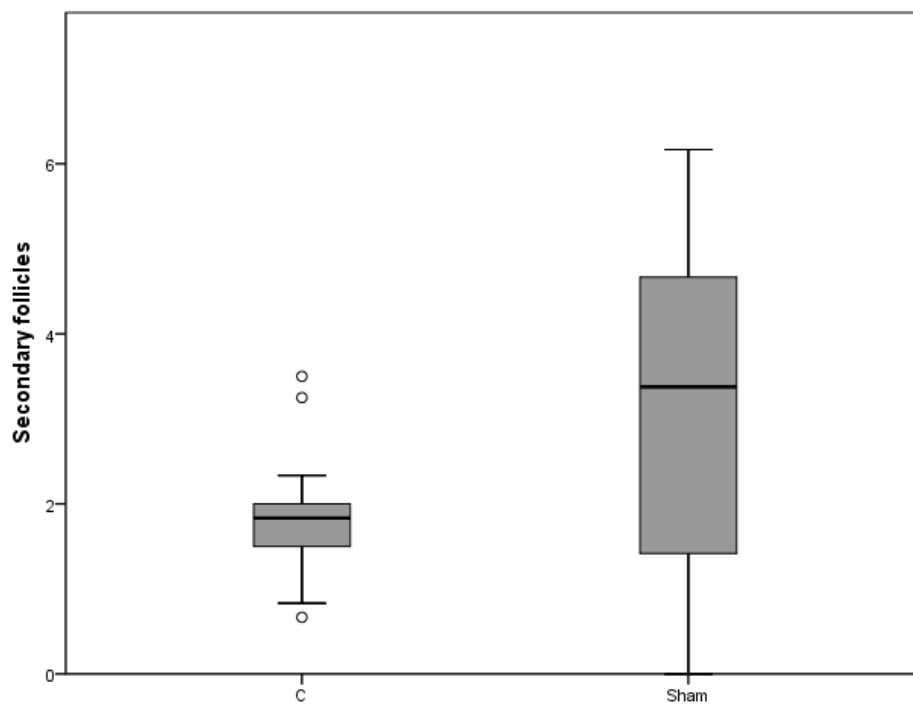


Figure 10: Count of secondary follicles. Values as median and interquartile range. ▯ = Outlier.

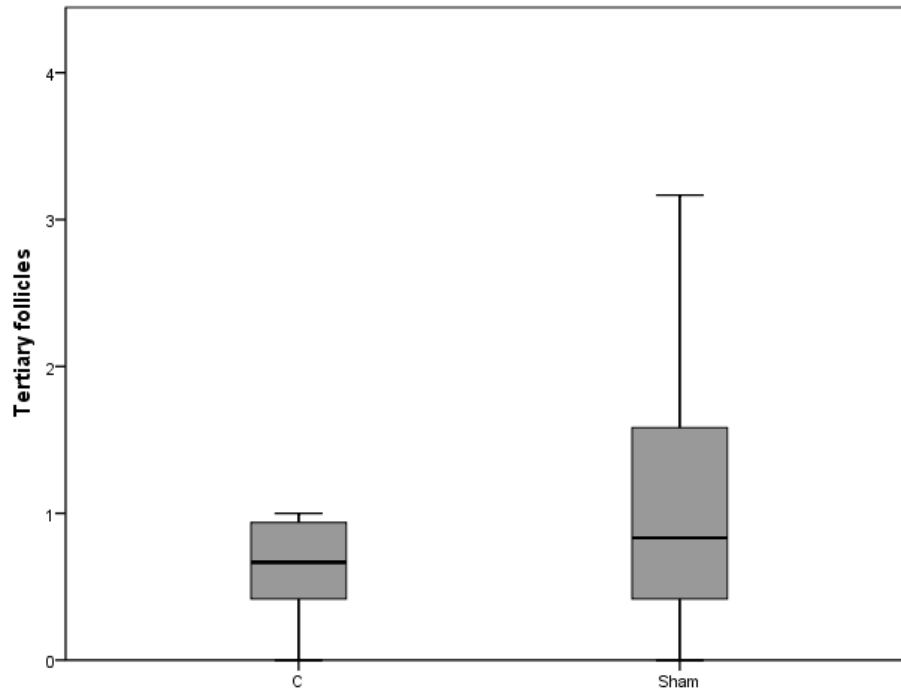


Figure 11: Count Tertiary follicles. Values as median and interquartile range.

### **Histological evaluation: transplanted ovarian tissue**

Yet, when histological analysis of transplanted prepubertal ovarian tissue into oophorectomized young adult rats was performed it was not possible to observe the different follicular structural classes: primordial, primary, secondary and antral. Tissue fragments obtained presented a different architecture preventing follicular evaluation probably due to the presence of a connective tissue capsule around the transplant ovarian tissue. Furthermore, fibrosis, necrosis, apoptosis and macrocells were



observed in the vicinity of the transplanted organ (Figure 12). Beside to these observed histological alterations, the transplanted ovary was not detectable in two different ovary transplanted female rats.

The results described may be related to the fact that the dorsum should not be the ideal location for the ovarian tissue transplant. According to Navy (2012) there are still many questions related to the this procedure, which motivate more studies in the area, such as amount of tissue to be cryopreserved; best cryopreservation technique; risk of transplanting cancer cells; best place for transplantation; techniques to reduce tissue ischemia and improving the implantation and function of ovarian tissue, how long the ovarian function is maintained, how long the tissue can remain cryopreserved and the probability of achieving a pregnancy (Marinho, 2012). Macedo (2011) discloses that a question related to the avascular ovarian tissue transplants is the longevity of the transplant, since the tissue undergoes ischemia until neovascularization. According Leonel (2014) it is important to place the graft close to large vessels in areas that facilitate neovascularization. These issues might justify the fact that the transplanted ovarian tissue in oophorectomized females have not been able to reverse infertility in these individuals.

In the present study, in two animals, ovarian transplanted tissues was not identified. Furthermore, the transplanted tissue showed characteristic cystic ovarian tissue containing yellowish, being surrounded by a translucent cap. This has already been described in 1994 by Dissen who made ovarian autologous transplantation studies in rats and reports that the presence of connectivetissue covering the surface after conducting autologous ovarian transplants is frequent. This phenomenon according Leonel (2014) is a physical barrier, making it difficult to maintain ovarian function.

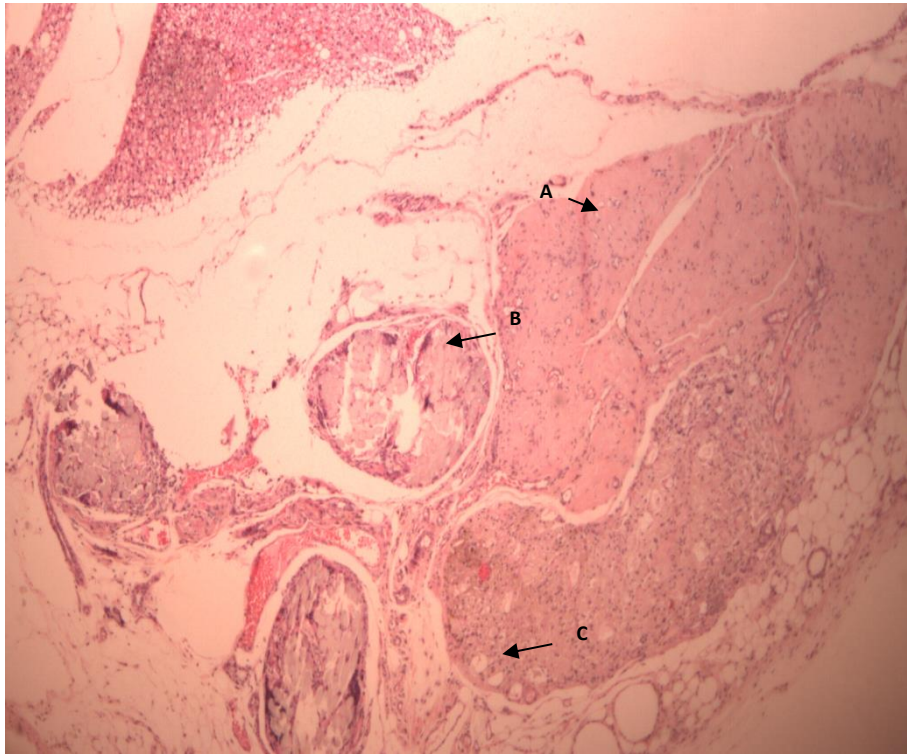


Figure 12 Ovarian tissue with: A- fibrosis; E necrosis; C- follicles unviable.

## **Conclusion**

Analyzing the series of data presented herein it is possible to first conclude that the oophorectomy and ovary transplant procedures have been appropriately implemented considering no detection of microbial contamination. And when females body mass was evaluated was possible to observe that the transplanted organ should be active for a short period of time once upon transplanted female rats possess similar body mass to fertile female when both groups were compared on d<sub>20</sub>. This result suggested that the transplanted ovary transiently secreted hormones as it was capable to partially modulated body mass gain. These findings were positive and encourage subsequent studies in order to define the best condition to restore fertile status. Despite the transplanted ovary presented indications of graft collapse, ischemia, the preliminary results obtained suggested that subsequent investigations were necessary in order to comprehend the process and to describe a procedure with higher efficacy to restore fertility with autologous cryopreserved ovary tissue transplant.

## REFERÊNCIAS

Albani E, Bracone G, Biccari SD, Vitobello D, Fattizzi N, Levi-Setti PE. Criopreservação de tecido ovariano humano como reserva de fertilidade. In: Mohan R, ed. Tópicos de sobrevivência do cancro, 2012: 215. Disponível em: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).

Alberti, L. R., Vasconcellos, L. D. S., & Petroianu, A. (2007). Avaliação endócrina e morfológica de transplante autólogo de ovários íntegros e fatiados em coelhas. *Rev bras anal clin*, 39(1), 63-6.

Bagg M.A., Vassena R., Papasso-Brambilla E., Grupen C.G., Armstrong D.T. & Gandolfi F. 2004. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. *Theriogenology* 62:1003-1011.

Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM & Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology* 140: 462-471, 1999.

Baker, S.J.; Spears, N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum. Reprod. Update*, v.5, p.153-165, 1999.

Ceschin, Á. P., Biondo-Simões, M. D. L. P., Thomaz, B. A. C., & Totsugui, J. (2004). Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratos. *Acta Cir Bras*, 19(1), 27-30.

Cooper RI; Goldman JM & Vandenberg JG. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Fem Reprod Toxicol* 3: 45-56, 1993.

Cooper RL, Goldman JM, Vandenberg JG. Monitoring of the estrous cycle in laboratory rodent by vaginal lavage. In: Heindel JJ, Chapin RE. Female reproductive toxicology. London: Academic Press; 1998. p.45-56.

de Carvalho, B. R., Rodrigues, J. K., Campos, J. R., Marinho, R. M., Caetano, J. P. J., & de Sá Rosa, A. C. J. (2015). Visão geral sobre preservação da fertilidade feminina depois do câncer. *Reprodução & Climatério*, 29(3), 123-129.

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

Diehl G.N., Costi G., Vargas A.J., Richter J.B., Lecznieski L.F., Bortolozzo F.P., Bernardi M.L. & Wentz I. 2003. Monitoramento ovariano ao abate de leitoas descartadas por anestro ou estro atípico. *Arch.Vet. Sci.* 8:121-125.

Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda, SR. Imature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 1994;134(3):1146-54.

Donnez J, Bassil S. As indicações para a criopreservação de tecido ovariano Hum *Reprod Actualizar* 248-259, 4 (1998), pp.

Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Demylle D, van Langendonck A. O papel de criopreservação para mulheres antes do tratamento de malignidade *Curr Opin Obstet Gynecol*, 17 (2005), pp. 333-338

Durli I C, Paz AHR, Terraciano PB, Passos EP, & Cirne-Lima EO. Comparative analysis of two cryopreservation systems of ovarian tissues in female Wistar rats.

Falcone T et al. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertility and sterility*, v. 81, n. 2, p. 243-257, 2004.

Friedrich, K. (2003). Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo alfa relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley.

Goldman J M., Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, & Kavlok RJ., 2000. Endocrine-Disrupting Chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Critical Reviews in Toxicology* 30(2): 135-196.

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restauração da fertilidade de ovelhas ooforectomizadas por transplante autólogo de ovário armazenados a -196 graus C *Hum Reprod*, 9 (1994), pp. 597-603

Gougeon, A.; Busso, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.163, p.33-41, 2000.

Guyard B, Fricker J, Brigant L, Betoulle D, Apfelbaum M. Effects of ovarian

Karvelienė B. & Riðkevièienė V. 2009. Post-mortem evaluation of genital organs from sows with reproductive disturbances. *Vet. Arhiv.* 79:269-279.

Knox R.V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:385-397.

Leonel, ECR. Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas. 2014.

Long JA, Evans HM. The estrous cycle in rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, v. 6, p. 141-148, 1922.

Macedo, M. F. D. (2011). Transplante ovariano autólogo em diferentes sítios anatômicos de ratas ovariectomizadas.

Mandl A. M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*, v.28, p.576-584, 1951.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v.42, 4A, p.609-614, 2002.

Marinho, R. M., Rodrigues, J. K, Lamaita, R. M., Cota, A. M. D. M., Wainstein, A. J. A., Wainstein, APDL, Caetano JPJ. (2013). Preservação da fertilidade em mulheres com câncer: atualização e perspectivas. *Revista Médica de Minas Gerais*, 23(4), 510-517.

Meirow D, Ben Yehuda D, Prus D, Poliak A, Schenker JG, Rachmilewitz EA, *et al.* Banking tecido ovariano em pacientes com doença de Hodgkin: é seguro? *Fertil Steril*, 69 (1998), pp. 996-998

Melton, S. A., Hegsted, M., Keenan, M. J., Zhang, Y., Morris, S., Bulot, L. P., & Morris, G. S. (2000). Swimming eliminates the weight gain and abdominal fat associated with ovariectomy in the retired breeder rat despite high-fat diet selection. *Appetite*, 35(1), 1-7.

Moraes, IG. Preservação da fertilidade em pacientes portadoras de neoplasias malignas. *Rev. Med. Res.* 2010;12(1):35-44.

Moreira F., Pilati C., Reis R., Dick W. & Sobestiansky J. 2006. Aspectos macroscópicos dos ovários de matrizes suínas, oriundas de granjas da microrregião de Rio Verde-Go e descartadas para abate por motivos diversos. *Arch. Vet. Sci.* 11:47-52.

Noda, S.; Sawaki, M.; Shiraishi, K.; Yamasaki, K. & Yamaguchi, R., 2002. Age-related changes of genital systems in the female Crj:CD® (SD) IGS rats during sexual maturation. *Journal of Veterinary Medical Science* 64(4): 315-319.

Oberlender, G., Pontelo, T. P., Miranda, J. R., Miranda, D. R., Zangeronimo, M. G., Silva, A. C., & Rocha, L. G. (2014). Morphological and morphometric evaluation of prepubertal gilt ovaries, uterine tubes and uterus at different oestrus cycle stages. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(1), 83-90.

Ojeda SR, & Urbanski HF. 1994. Puberty in the rat. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil & J. D. Neil, eds), pp 363-409, Nova York: Raven Press.

Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Criopreservação de ovócitos humanos imaturos e tecido ovariano: uma tecnologia emergente? *Fertil Steril*, 69 (1998), pp. 1-7

Ott J, Nouri K, Stögbauer L, Fischer EM, Lipovac M, Promberger R, *et ai*. Criopreservação de tecido ovariano para indicações não-malignas *Arch Gynecol Obstet*, 281 (2010), pp. 735-739.

*Practice Committee of The American Society for Reproductive Medicine et al*. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, v. 101, n. 5, p. 1237-1243, 2014.

Rivest RW. 1991. Sexual maturation in female rats: Hereditary, developmental and environmental aspects. *Experientia* 47: 1027-1038.

Silva, JMM. Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelação lenta após intervalo precoce e tardio de castração em ratas. SILVA, 2014.

steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Metabolism*.

Szabo, J., Ibrahim, W. H., Sunvold, G. D., Dickey, K. M., Rodgers, J. B., Toth, I. E., & Bruckner, G. G. (2000). Influence of dietary protein and lipid on weight loss in obese ovariohysterectomized cats. *American journal of veterinary research*, 61(5), 559-565.

Tanbo, Tom et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue after treatment for malignant disease—the first Norwegian results. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, v. 94, n. 9, p. 937-941, 2015.

Vasconcellos, L. S., Leite, J. M., Sabino, K. R., & Petroianu, A. (2004). Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. *Arq. bras. endocrinol. metab*, 48(2), 299-304.



Vaz LC. Transplante experimental, subcutâneo e intraperitoneal, de ovário em suínos: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Vilela, M. G., & dos Santos Júnior, J. L. (2007). Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, 35(10).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados observados a técnica de transplante autólogo heterotópico de tecido ovariano criopreservado mostrou indícios de que houve manutenção da capacidade hormonal por um período de tempo. A criopreservação do tecido ovariano se apresenta como uma valiosa ferramenta para a preservação de gametas femininos de mamíferos. Contudo, apesar do sucesso dos protocolos de criopreservação em algumas espécies, os resultados não têm se repetido de forma rotineira, evidenciando que uma melhor compreensão e maiores ajustes nos protocolos, poderão auxiliar na obtenção de resultados mais satisfatórios, com taxas de sobrevivência folicular semelhantes aos que ocorrem com os folículos frescos.

Além disso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas, que visem o crescimento de folículos e a maturação de seus oócitos, bem como ao aperfeiçoamento dos transplantes, para que possa resultar em uma alternativa concreta de manutenção da fertilidade. Portanto, novos experimentos precisam ser desenvolvidos para comprovar a real viabilidade desta técnica.

## PERSPECTIVAS

É hora de considerar a preservação da fertilidade em mulheres como um dos principais desafios da próxima década e para oferecer às mulheres que enfrentam o risco de menopausa prematura induzida maiores chances de se tornarem mães. O transplante autólogo ovariano pode servir como alternativa à terapia de reposição hormonal hoje realizada como rotina em mulheres na pós-menopausa, o que vem para reforçar os resultados com transplante autólogo já obtidos noutras investigações fora do país. Esta técnica pode inclusive ser utilizada como forma de diminuir o custo dos tratamentos hormonais hoje empregados, reduzindo os gastos públicos com a saúde de mulheres que cada vez mais alcançam a melhor idade, no Brasil e no mundo.

Quanto aos animais, podemos inferir, e quem sabe extrapolar, que o transplante autólogo ovariano também possa vir a auxiliar na redução da obesidade dos animais de companhia devido à comprovada manutenção da composição corporal em ratas observada neste estudo, além de auxiliar na propagação e manutenção de animais com risco de extinção.

Entretanto, é prudente sugerir que, futuramente, sejam realizados mais estudos, em modelos experimentais, para comparar a reposição hormonal estrogênica tradicional e o transplante autólogo ovariano, determinando sua real viabilidade nos diferentes aspectos a serem ainda avaliados; e para isso, é importante que seja ressaltada a necessidade de interação entre grupos de pesquisa voltados para as Medicinas Humana e Veterinária.