

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS COMPARATIVAS ENTRE  
DIFERENTES TAMANHOS DE FRAGMENTOS  
OVARIANOS BOVINOS CRIOPRESERVADOS**

**MARCELO OLIVEIRA FERREIRA**

**Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann**

**Dissertação de Mestrado**

**2005**

Catálogo-na-Publicação

F383 Ferreira, Marcelo Oliveira  
Análises histológicas comparativas entre diferentes tamanhos de  
fragmentos ovarianos bovinos criopreservados / Marcelo Oliveira Ferreira.  
- 2005.  
108 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas,  
Porto Alegre, 2005.

Orientador: Dr. Gilberto Schwartzmann

1. Criopreservação 2. Ovário 3. Estudo comparativo I. Schwartzmann,  
Gilberto II. Título

NLM QW95

(Bibliotecária responsável: Elise Maria Di Domenico Coser - CRB-10/1577)

## DEDICATÓRIAS

À minha esposa, **Mônica**, que esteve comigo em toda essa caminhada, dividindo as dificuldades, mas proporcionando todas as condições possíveis, com carinho e amor, para que eu pudesse atingir esse objetivo;

Ao meu filho **Gabriel**, que teve seu convívio privado, mas a cada sorriso e a cada abraço estimulava-me a seguir em frente;

À minha mãe, **Zaida Maria**, e ao meu pai, **Antônio Carlos**, pelo amor que me deram, pela educação que me proporcionaram e pelos valores que me ensinaram;

À minha irmã **Márcia** e aos meus irmãos **Luciano** e **Cristiano**, pelo constante incentivo;

À minha sogra, **Elza Mariza**, e ao meu sogro, **Antônio Américo**, pela grande compreensão, colaboração e carinho recebidos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Gilberto Schwartzmann**, um profissional muito competente, um grande realizador, sempre preocupado na produção do conhecimento e em exercer a medicina de maneira digna e correta. Obrigado por ter sido meu orientador, e por sempre me estimular a seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho;

À Dra. **Adriana Bos Mikich**, minha co-orientadora, uma profissional extremamente correta e competente, além de uma grande amiga, a quem devo muito por toda a realização deste trabalho;

Ao Dr. **Nilo Franz**, colega e amigo, pessoa cativante que está sempre na busca de novos conhecimentos, obrigado pela compreensão e por proporcionar-me todas as condições para que eu pudesse desenvolver esse estudo;

Às biólogas **Gerta Frantz e Norma Pagnoncelli Oliveira** que, além de excelentes colegas de trabalho, são pessoas pelas quais tenho imensa gratidão, pois foram decisivas para a execução dessa pesquisa, sempre dispostas a ajudar e dividir o grande conhecimento que possuem;

Ao Prof. **José Luiz Rodrigues**, que me abriu as portas do conceituado laboratório de reprodução animal da Faculdade de Veterinária da UFRGS, estimulando a realização dessa pesquisa;

Aos veterinários **Fabiana Forrell** e **Arnaldo Diniz Vieira**, obrigado por me ajudarem, pela paciência e pela disponibilidade que sempre tiveram;

Ao Prof. **Emílio Jeckel Neto**, pelo incentivo dado a esse projeto, e à técnica **Raquel Matos de Oliveira**, sempre disposta a ajudar e a resolver os problemas;

Ao administrador **Carlos Kurtz** e ao veterinário **Fábio Justo Scherer**, do frigorífico Zimmer, sou muito grato, pois pela boa vontade e gentileza que tiveram, tornaram possível a realização dessa pesquisa;

À Dra. **Flavia Carvalho Frustok** aos técnicos em histologia **Maria de Lourdes Petrocellis (Malu)** e **Ânderson Khun de Oliveira** e aos demais funcionários do **laboratório Citoclin**, a minha gratidão é muito grande, de uma forma extremamente atenciosa e eficaz, foram decisivos para a conclusão desse estudo;

Ao colega **André Campos da Cunha**, amigo de longa data, obrigado por facilitar, em muito, as minhas condições de trabalho;

Ao colega **Alfredo Cataldo Neto**, por emprestar-me sua experiência e mostrar-me os atalhos dessa caminhada;

Às funcionárias **Michelle dos Santos Gonçalves** e **Franciele Becker**, agradeço pela dedicação à minha família, e por me proporcionarem um ambiente tranquilo;

À **direção**, aos **professores** e aos **funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas**, muito obrigado por essa oportunidade.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIAS.....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>Lista de símbolos e abreviaturas.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>12</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>13</b>
<b>Lista de quadros.....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 O comprometimento de fertilidade nas pacientes oncológicas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1 Quimioterapia .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.2 Radioterapia.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Opções terapêuticas para a preservação da fertilidade.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1 Proteção farmacológica.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1.1 Antagonistas do GnRH.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.1.2 Inibidores apoptóticos.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2 Cirurgia – Transposição ovariana.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3 Criopreservação de embriões, de óvulos e de tecido ovariano</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3.1 Criopreservação de embriões.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3.2 Criopreservação de óvulos.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.3.3 Criopreservação de tecido ovariana.....</b>	<b>27</b>
<b>2.REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Criopreservação de tecido ovariano.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.1 Maturação oocitária <i>in vitro</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1.2 Xenotransplante.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.3 Autotransplante.....</b>	<b>33</b>

2.1.3.1 Autotransplante em animais.....	33
2.1.3.2 Autotransplante em humanos.....	34
2.1.3.3 O uso de fragmentos ovarianos em criopreservação.....	38
2.1.3.4 Criopreservação de ovário intacto.....	40
2.1.3.5 A segurança dos transplantes ovarianos.....	42
2.1.3.6 Indicações para criopreservação de tecido ovariano.....	45
2.2 Princípios de criobiologia.....	48
2.2.1 Introdução.....	48
2.2.2 Eventos que ocorrem no congelamento.....	48
2.2.3 Influência da velocidade de congelamento.....	50
2.2.4 Papel dos crioprotetores.....	51
2.2.5 Descongelamento.....	53
2.2.6 Diluição do crioprotetor.....	53
2.2.7 Armazenamento.....	54
2.3 Histologia do tecido ovariano.....	55
2.3.1 Folículos ovarianos.....	56
2.3.1.1 Folículo primordial.....	57
2.3.1.2 Folículo em crescimento.....	57
2.3.1.3 Folículo maduro ou de Graaf.....	60
2.4 Preparo das lâminas histológicas.....	61
2.4.1 Desidratação.....	61
2.4.2 Clarificação ou diafanização.....	61
2.4.3 Corte.....	61
2.4.4 Coloração.....	62
2.4.5 Montagem.....	63
2.5 Referências bibliográficas.....	64

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2 Específicos.....</b>	<b>72</b>
<b>4. ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Abstract.....</b>	<b>75</b>
<b>4.2 Introduction.....</b>	<b>76</b>
<b>4.3 Methods.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.1 Source of ovaries and tissue preparation.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3.2 Freezing.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3.3 Thawing.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3.4 Histological evaluation.....</b>	<b>82</b>
<b>4.4 Statistical analysis.....</b>	<b>83</b>
<b>4.5 Results.....</b>	<b>84</b>
<b>4.6 Discussion.....</b>	<b>93</b>
<b>4.7 References.....</b>	<b>98</b>
<b>5. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b>	<b>102</b>
<b>5.1 Resumo.....</b>	<b>104</b>
<b>5.2 Introdução.....</b>	<b>105</b>
<b>5.3 Método.....</b>	<b>109</b>
<b>5.3.1 Obtenção dos fragmentos.....</b>	<b>109</b>
<b>5.3.2 Congelamento .....</b>	<b>110</b>
<b>5.3.3 Descongelamento.....</b>	<b>111</b>
<b>5.3.4 Análises histológicas .....</b>	<b>111</b>
<b>5.4 Análise estatística.....</b>	<b>121</b>
<b>5.5 Resultados.....</b>	<b>122</b>
<b>5.6 Discussão.....</b>	<b>131</b>

<b>5.7 Referências.....</b>	<b>135</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>6.1 Conclusão geral.....</b>	<b>140</b>
<b>6.2 Conclusões específicas.....</b>	<b>140</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>141</b>
<b>7.1 Programa de obtenção das medidas dos folículos <i>Image Pro-plus</i></b>	<b>142</b>

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

$\alpha$	Alfa
~	Aproximadamente
>	Maior
<	Menor
$\pm$	Mais ou menos
$\mu\text{m}$	Micrômetros
a-GnRH	Análogos do GnRH
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
Cm	Centímetros
Colo.	Colaboradores
CPA	Agentes crioprotetores
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxidoribonucléico
Eg	Etileno-glicol
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embriology
EUA	Estados Unidos da América
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GY	Gray
h	hora
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
L	litro
LD	<i>Lower dose</i>
M	Molar

MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mm	milímetros
Mol	Molaridade
° C	Graus Celsius
$\rho$	Índice de Pearson
P.E.P.I.	<i>Programs for Epidemiologists</i>
PAS	Ácido periódico Schiff
PEG	Polietileno-glicol
PROH	Propanediol
PVP	Polivinil-pirrolidona
RR	Risco Relativo
SCID	<i>Severe-combined-immunodeficiency</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Risco estimado de disfunção gonadal de acordo com o quimioterápico utilizado no tratamento do câncer	20
Tabela 2.1	Comparação entre diferentes tamanhos de fragmentos usados em estudos com criopreservação ovariana em humanos	39
Tabela 2.2	Risco de envolvimento ovariano com células cancerígenas de acordo com o tipo de câncer	44
Tabela 4.1	Total numbers and percentages of normal follicles in 2mm and >2mm fragments, comparison between controls (not treated) and cryopreserved groups (treated): analysis of complete follicles	86
Tabela 4.2	Most frequent alterations found in controls and cryopreserved (treated) >2mm fragments: analysis of complete follicles	87
Tabela 4.3	Most frequent alterations found in controls and cryopreserved (treated) >2mm fragments: analysis of complete follicle	88
Tabela 4.4	Total numbers and percentages of normal follicles in 2mm and >2mm fragments, comparison between controls (not treated) and cryopreserved groups (treated): analysis of incomplete follicles	89
Tabela 5.1	Numero total e percentagens de folículos normais em fragmentos com 2mm e com mais de 2mm, comparativo entre os grupos controle e criopreservado (tratamento): análise dos folículos completos	124
Tabela 5.2	Alterações encontradas nos grupos controle e criopreservado (tratamento) nos fragmentos com 2mm: análise dos folículos completos	125
Tabela 5.3	Alterações encontradas nos grupos controle e criopreservado (tratamento) nos fragmentos maiores de 2mm: análise dos folículos completos	126
Tabela 5.4	Numero total e percentagens de folículos normais em fragmentos com 2mm e com mais de 2mm, comparativo entre os grupos controle e criopreservado (tratamento): análise dos folículos incompletos	127

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b>	<b>Transposição ovariana via laparoscópica</b>	<b>24</b>
<b>Figura 2.1</b>	<b>Opções para o uso da criopreservação ovariana</b>	<b>30</b>
<b>Figura 2.2</b>	<b>Autotransplante ovariano no antebraço (heterotópico)</b>	<b>36</b>
<b>Figura 2.3</b>	<b>Autotransplante ortotópico</b>	<b>37</b>
<b>Figura 2.4</b>	<b>Autotransplante heterotópico de ovário intacto com pedículo vascular</b>	<b>42</b>
<b>Figura 2.5</b>	<b>Abordagem individualizada para a preservação da fertilidade</b>	<b>46</b>
<b>Figura 2.6</b>	<b>Indução da formação do gelo (<i>seeding</i>)</b>	<b>50</b>
<b>Figura 4.1</b>	<b>Histological section of ovarian tissue stained with haematoxin and eosin (200X)</b>	<b>90</b>
<b>Figura 4.2</b>	<b>Normal follicular rates in controls and cryopreserved (treated) 2mm and &gt;2mm fragments: analysis of complete follicles</b>	<b>91</b>
<b>Figura 4.3</b>	<b>Normal follicular rates in controls and cryopreserved (treated) groups of 2mm and &gt;2mm fragments: analysis of incomplete follicles</b>	<b>92</b>
<b>Figura 5.1</b>	<b>Ovário antes de ser fragmentado</b>	<b>113</b>
<b>Figura 5.2</b>	<b>Primeiro passo do procedimento: divisão do ovário ao meio, resultando em 2 hemi-ovários</b>	<b>113</b>
<b>Figura 5.3</b>	<b>Detalhe do aparelho composto por lâminas paralelas e fixadas com parafusos</b>	<b>114</b>
<b>Figura 5.4</b>	<b>Aferição com paquímetro das distâncias de 2 e de 4mm entre as lâminas</b>	<b>114</b>
<b>Figura 5.5</b>	<b>Deslizamento do aparelho de lâminas paralelas sobre a córtex do hemi-ovário</b>	<b>115</b>

<b>Figura 5.6</b>	<b>Duas tiras, que serão seccionadas transversalmente de modo a formar 3 a 4 fragmentos com 10mm de comprimento</b>	<b>115</b>
<b>Figura 5.7</b>	<b>Aferição de uma das medidas do fragmento</b>	<b>116</b>
<b>Figura 5.8</b>	<b>Etapa em que foram imergidos os fragmentos no meio com crioprotetor</b>	<b>116</b>
<b>Figura 5.9</b>	<b>Colocação dos criotubos na máquina de congelamento</b>	<b>117</b>
<b>Figura 5.10</b>	<b>Realização da indução da formação do gelo (<i>seeding</i>)</b>	<b>117</b>
<b>Figura 5.11</b>	<b>Armazenamento em nitrogênio líquido a <math>-196^{\circ}</math></b>	<b>118</b>
<b>Figura 5.12</b>	<b>Retirada do crioprotetor em diluições decrescentes, após o descongelamento</b>	<b>118</b>
<b>Figura 5.13</b>	<b>Fixação em bouin</b>	<b>119</b>
<b>Figura 5.14</b>	<b>Emblocação dos fragmentos em parafina, na etapa do preparo para histologia</b>	<b>119</b>
<b>Figura 5.15</b>	<b>Histologia do ovário: folículo primário normal de fragmento com 2mm que foi criopreservado</b>	<b>120</b>
<b>Figura 5.16</b>	<b>Corte histológico de tecido ovariano corado com hematoxilina e eosina</b>	<b>128</b>
<b>Figura 5.17</b>	<b>Taxas de folículos normais nos grupos controle e pós-congelamento (tratamento) nos fragmentos com 2mm e nos fragmentos maiores de 2mm: análise dos folículos completos</b>	<b>129</b>
<b>Figura 5.18</b>	<b>Taxas de folículos normais nos grupos controle e pós-congelamento (tratamento) nos fragmentos com 2mm e nos fragmentos maiores de 2mm: análise dos folículos incompletos</b>	<b>130</b>

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1.1</b>	<b>Avaliação de risco de subfertilidade após o tratamento do câncer na infância e na adolescência</b>	<b>18</b>
<b>Quadro 2.1</b>	<b>Critérios de Edimburgo para a indicação de criopreservação ovariana</b>	<b>47</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 O COMPROMETIMENTO DA FERTILIDADE NAS PACIENTES ONCOLÓGICAS

As taxas de sobrevivência em crianças e em mulheres em idade reprodutiva com câncer aumentaram drasticamente nos últimos anos e, devido aos efeitos colaterais a longo prazo dos tratamentos, é de vital importância que nos preocupemos com o futuro reprodutivo dessas pacientes.

Estima-se que no ano 2010 a proporção de sobreviventes de câncer na infância, na população adulta, se aproximará de 1 em 250 (Blatt, 1999). A sobrevivência em 5 anos para todas as leucemias diagnosticadas na infância, que no período de 1971 e 1975 era de 33%, aumentou para aproximadamente 80% no período de 1986 e 1990 (Mc Vie, 1999). Os tratamentos, no entanto, são associados à significativa morbidade do ponto de vista reprodutivo (Quadro 1.1), e a toxicidade ovariana é um importante e comum efeito colateral a longo prazo da quimioterapia e da radioterapia curativas (Byrne e cols., 1992).

## **Quadro 1.1 Avaliação de risco de subfertilidade após o tratamento do câncer na infância e na adolescência**

(Wallace e cols.. Lancet Oncol 2005;6:209-18)

### **BAIXO RISCO (< 20%)**

- Leucemia linfoblástica aguda
- Tumor de Wilms
- Sarcoma de partes moles: estágio I
- Tumor de células germinativas (com preservação gonadal e sem radioterapia)
- Retinoblastoma
- Tumor cerebral: somente cirurgia e irradiação cranial <24 Gy

### **MÉDIO RISCO**

- Leucemia mieloblástica aguda (difícil de quantificar)
- Hepatoblastoma
- Osteossarcoma
- Sarcoma de Ewing: não metastático
- Sarcoma de partes moles: estágio II ou III
- Neuroblastoma
- Linfoma não Hodgkin
- Doença de Hogkin: tratamento alternado
- Tumor cerebral: radioterapia crânio-espinhal, irradiação cranial < 24Gy

### **ALTO RISCO (>80%)**

- Irradiação de corpo inteiro
- Radioterapia localizada (pélvica)
- Quimioterapia de condicionamento para transplante de medula óssea
- Doença de Hogkin: tratamento com drogas alquilantes
- Sarcoma de partes moles: estágio IV (metastático)
- Sarcoma de Ewing: metastático

### 1.1.1 Quimioterapia

Estudos histológicos de ovários que foram expostos a drogas citotóxicas mostraram significativas alterações, desde a diminuição do número de folículos à ausência destes e à fibrose ovariana (Warne e cols., 1973). Meiorow (1999) estudou um grupo de pacientes com idade média de 29 anos, pós-quimioterapia, e encontrou taxa de falência ovariana de 15% na leucemia mielocítica aguda, 44% no linfoma não Hodgkin, 32% no linfoma Hodgkin e 50% no câncer de mama.

O risco do dano gonadal aumenta com a idade, pois a mulher mais idosa tem uma quantidade menor de oócitos que a mulher mais jovem. O tipo de quimioterápico, a duração do tratamento e a dose empregada também são determinantes para a morbidade ovariana.

Agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, a mecloretamina e o clorambucil, causam danos permanentes aos ovários porque interagem quimicamente com o DNA (Schamberger e cols., 1981). Esses danos são dependentes da dose total e do tempo de exposição aos agentes. Os quimioterápicos podem prejudicar a maturação folicular e/ou depletar folículos primordiais. Quando folículos em maturação forem danificados, ocorrerá amenorréia temporária e, quando forem destruídos folículos primordiais, a consequência será a falência ovariana prematura (Falcone e cols., 2004). Sonmezer e Oktay (2004) descreveram o risco estimado de disfunção gonadal de acordo com o quimioterápico utilizado no tratamento do câncer (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1- Risco estimado de disfunção gonadal de acordo com o quimioterápico utilizado no tratamento do câncer**

(Sonmezer e Oktay. Hum Reprod Update 2004; 10:251-266)

<b>Alto risco</b>	<b>Médio risco</b>	<b>Baixo risco</b>
Ciclofosfamida	Cisplatina	Vincristina
Ifosfamida	Carboplatina	Metrotexate
Mecloretamina	Doxorubicina	Dactinomicina
Busulfan		Bleomicina
Melfalan		Mercaptopurina
Procarbazina		Vinblastina
Clorambucil		

### **1.1.2 Radioterapia**

As radiações ionizantes também têm efeitos adversos na função gonadal. O grau e a persistência do dano dependem da dose, do campo irradiado e da idade da paciente, sendo as pacientes mais velhas as de maior risco.

Os ovários são expostos a significativas doses de irradiação quando a radioterapia é usada para a pelve e para doenças abdominais, como câncer de colo uterino, câncer retal e radioterapia crânio-espinhal, para patologias malignas do sistema nervoso central. Esse

também é o caso quando linfonodos pélvicos são irradiados para patologias hematológicas, como a doença de Hodgkin e com irradiação corporal total antes do transplante de medula óssea (Meirow e Nugend, 2001).

Chiarelli e colaboradores (1999) avaliaram sobreviventes de câncer na infância que receberam irradiação abdominal/pélvica e/ou quimioterapia com agentes alquilantes e compararam o risco de menopausa precoce e infertilidade com sobreviventes que foram tratadas somente por cirurgia não esterilizante. Os resultados indicaram que o risco de falência prematura aumentou significativamente com o aumento da dose de irradiação: com doses de < 20 Gy, o risco relativo foi de 1,02; com irradiação de 20 a 35 Gy, o risco relativo aumentou para 1,37 e, com doses > 35 Gy, o risco relativo de falência ovariana prematura foi de 3,27. Em estudo prévio, Wallace e colaboradores (1989) relataram que a dose estimada para a perda da metade dos folículos nos humanos ( $LD_{50}$ ) é de 4 Gy.

## 1.2 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA A PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM PACIENTES ONCOLÓGICAS

### 1.2.1 Proteção farmacológica

#### 1.2.1.1 Análogos do GnRH (a-GnRH)

Após observar que gônadas femininas pré-menarca demonstraram ser menos sensíveis às drogas citotóxicas (Chiarelli e cols., 1999; Tangir e cols., 2003), pesquisadores tentaram mimetizar esse estado usando a-GnRH. Evidências em roedores sugerem que este tratamento adjuvante com a-GnRH protege as gônadas (Globe e cols., 1981; Ataya e cols., 1985; Bokser e cols., 1990). Embora haja controvérsia sobre a existência de receptores de a-GnRH em ovários humanos, esses receptores foram claramente detectados nos ovários de ratos, portanto, a resposta pode ser diferente entre as espécies.

Ataya e colaboradores (1995), estudaram o efeito protetor nos ovários de fêmeas *macaca rhesus* quando compararam, após o uso de ciclofosfamida, um grupo que usou acetato de leuprolida (a-GnRH) com outro grupo que usou placebo, observando 64% de perda de folículos no grupo que somente usou ciclofosfamida, enquanto somente 29% de perda folicular ocorreu no grupo que usou acetato de leuprolida, demonstrando proteção.

Esse é um tema controverso, pois em estudo realizado em mulheres por Waxman e colaboradores (1987), buserilin (a-GnRH) não demonstrou proteção gonadal para a

quimioterapia, ao passo que Blumenfeld e colaboradores (1996), realizaram um estudo em um grupo grande de pacientes, usando a-GnRH 7-10 dias antes do início da quimioterapia, e observaram taxa de falência ovariana prematura somente de 5% no grupo que usou a-GnRH, enquanto no grupo controle, a falência foi de 55%.

#### 1.2.1.2 Inibidores Apópticos

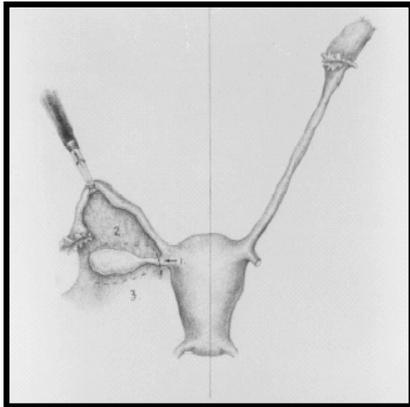
A apoptose no processo normal da depleção das células germinativas, tanto pré quanto pós-natal, é bem documentada (Tilly, 1996-a, 1996-b). A existência de uma trajetória predeterminada geneticamente, que inicia e regula a apoptose das células germinativas, tem aumentado a possibilidade de que essa trajetória possa ser ativada aberrantemente pelas drogas quimioterápicas (Morita & Tilly, 1999).

Quando oócitos de roedores foram expostos a dextrorubicin *in vitro*, eles sofreram várias mudanças, levando à formação de corpos apoptóticos (Tilly, 1998). Uma série de eventos são ativados na apoptose e, inibindo esses eventos, poder-se-ia, potencialmente, parar o processo de apoptose e proteger a paciente da falência ovariana prematura (Falcone e cols., 2004).

#### 1.2.2 Cirurgia – Transposição ovariana

Reposicionar cirurgicamente os ovários fora do campo de irradiação nas mulheres em idade reprodutiva com patologias pélvicas malignas, ou antes da irradiação pélvica de linfonodos, pode preservar a função ovariana. A cirurgia de transposição ovariana pode

ser feita por laparotomia, durante o tratamento cirúrgico da patologia, como o câncer cervical, ou por laparoscopia, imediatamente antes da irradiação pélvica (Figura 1.1).



**Figura 1.1**

**Transposição ovariana via laparoscópica**

(Tulandy e Al-Took. *Fertil Steril* 1998; 70:381-383)

O procedimento pode proteger do dano da radioterapia, mas não protege do dano causado pela quimioterapia sistêmica (Meirow & Nugent, 2001). As indicações, a efetividade e as complicações foram avaliadas em 107 pacientes tratadas para câncer cervical em estudo realizado por Morice e colaboradores (2000). A função ovariana foi preservada em todas as 11 pacientes tratadas exclusivamente por cirurgia, em 53 das 59 pacientes (90%) no grupo tratado por braquiterapia vaginal pós-operatória, e em 15 das 25 pacientes (60%) tratadas por radiação externa pós-operatória e braquiterapia vaginal.

A dose de irradiação ovariana após a transposição é reduzida em aproximadamente 5-10% (Covense cols., 1996). A cirurgia, porém, não é isenta de complicações, pois pode haver dano à vascularização, infarto tubário e formação de cistos ovarianos (Chambers e

cols., 1990 & Feeney e cols., 1995). Após a transposição ovariana, freqüentemente é necessária a fertilização *in vitro* (FIV) para restaurar a fertilidade.

### **1.2.3 Criopreservação de embriões, de óvulos, e de tecido ovariano**

#### *1.2.3.1 Criopreservação de embriões*

A criopreservação de embriões foi introduzida para maximizar as chances de gestação de um único ciclo. É uma técnica estabelecida, com resultados aceitáveis. Em publicação recente, a *European Society for Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) (2005) e a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) (2004) reportaram taxas de gestações por transferência usando embriões congelados de 16,4% e de 25,5%, respectivamente.

Essa técnica, no entanto, não é uma opção aceitável para meninas pré-puberes e também para adolescentes e mulheres sem um parceiro, a menos que recorram a sêmen doado. A coleta de oócitos maduros requer estimulação ovariana, o que demanda um período de tempo de aproximadamente 4 semanas e, infelizmente, na maioria das neoplasias malignas, não é possível aguardar esse tempo antes de começar o tratamento.

Existe também a preocupação, nas pacientes com câncer de mama, de que os altos níveis de estrogênio obtidos nos protocolos padrões de FIV possam comprometer negativamente a sobrevivência a longo prazo dessas pacientes; nesses casos, pode ser

proposto ciclo natural, ou indução com tamoxifen ou com inibidores da aromatase (Falcone e cols., 2004).

### *1.2.3.2 Criopreservação de óvulos*

A criopreservação de oócitos representa uma boa opção para a preservação da fertilidade, especialmente para aquelas mulheres que não têm parceiro. Também evita conflitos éticos, religiosos e legais que podem existir na criopreservação de embriões. Tecnicamente, no entanto, o congelamento de oócitos é mais desafiador: os oócitos têm a membrana citoplasmática com menor quantidade de microfilamentos de actina do que os embriões e são mais frágeis para a criopreservação (Gook e cols., 1993), a proporção volume-superfície é grande, tornando o processo de desidratação mais difícil (Chen e cols., 2005) e o congelamento e descongelamento resulta em grande comprometimento de fuso meiótico (Eroglu e cols., 1998). No entanto, novos protocolos têm mostrado resultados encorajadores.

Porcu e colaboradores (2000), usando regime de 1,5mol/l 1,2-propanediol (PROH) com alta concentração de sacarose de 0,2mol/l, obtiveram taxa de sobrevivência de 59%. Fabri e colaboradores (2001), aumentando a concentração de sacarose para 0,3mol/l e expondo os oócitos por 15 minutos no crioprotetor, obtiveram taxa de sobrevivência de 82%. Outros autores (Quintans e cols., 2002; Azambuja e cols., 2002; Boldt e cols., 2003), acrescentando colina ao crioprotetor, obtiveram nascimentos e, recentemente, Chen e colaboradores (2005), usando 1,2 propanediol com sacarose seguido de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), obtiveram em 21 ciclos, 7 gestações (33%).

A criopreservação de óvulos, no entanto, similarmente ao congelamento de embriões, necessita de indução da ovulação; conseqüentemente, não pode ser indicada para as pacientes que necessitam de tratamento oncológico imediato, nem para as meninas pré-púberes.

#### *1.2.3.3 Criopreservação de tecido ovariano*

A criopreservação do tecido ovariano constitui mais um opção para a preservação da fertilidade em pacientes oncológicas. Nessa dissertação, serão descritas as análises histológicas comparativas entre diferentes tamanhos de fragmentos bovinos criopreservados. Uma vez que este é o tema central desse trabalho, a técnica será descrita em detalhes, com a revisão bibliográfica correspondente.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

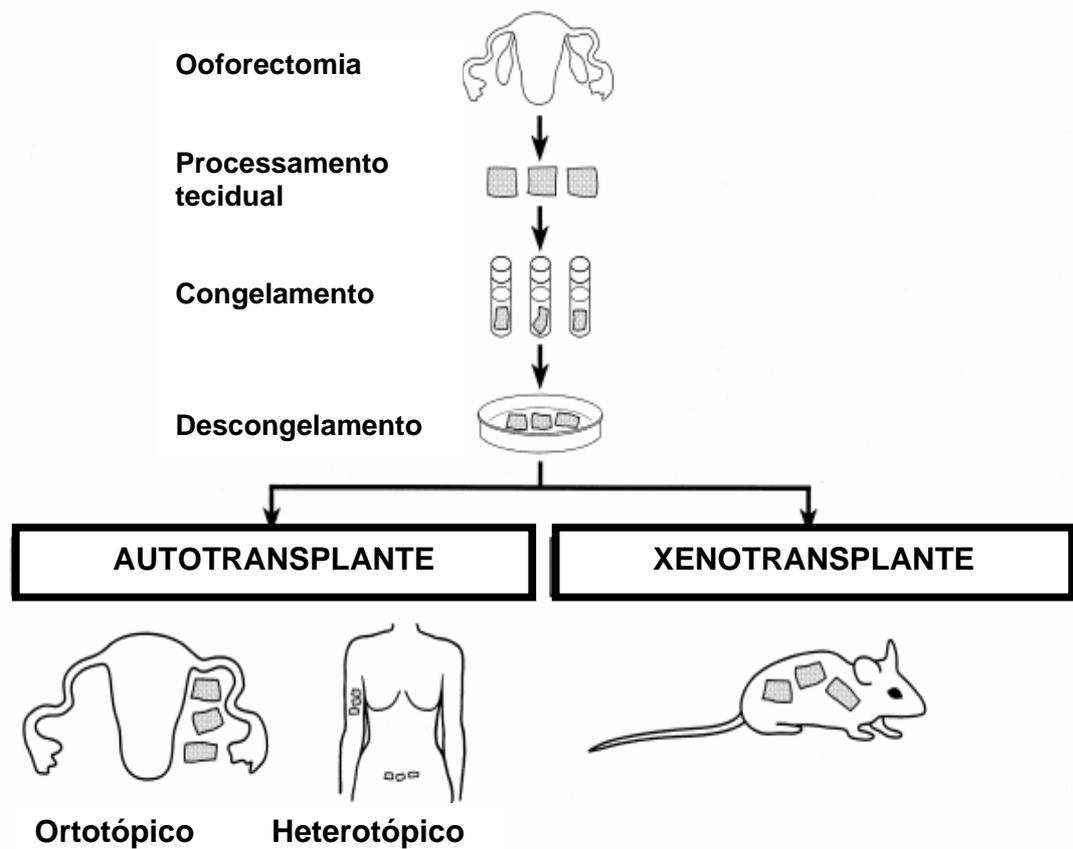
## 2.1 CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO

O conceito de transplante ovariano não é novo; os pioneiros trabalho foram realizados nos anos 50 (Parkes e Smith, 1954; Danesly, 1954). Nos 30 anos seguintes, não houve muito progresso nesse campo; porém, nos anos 90, o reconhecimento do potencial clínico da aplicação dessa tecnologia em medicina reprodutiva reacendeu o interesse em congelamento de ovário.

A criopreservação de tecido ovariano tem muitas vantagens potenciais tanto sobre congelamento de óvulos quanto de embriões. Nesse procedimento, centenas de oócitos imaturos são criopreservados sem a necessidade de estimulação ovariana e sem adiar o início do tratamento do câncer (Gosden e cols., 1999). Potencialmente, é possível restaurar a fertilidade natural com menos dilemas éticos.

Os folículos imaturos na córtex ovariana, diferentemente de folículos em crescimento, toleram a criopreservação muito bem. Algumas características os fazem menos vulneráveis ao congelamento: o tamanho pequeno do oócito e das células de suporte, o metabolismo baixo, a ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais periféricos e a pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis ao frio. Os oócitos imaturos estão em prófase, carregam baixo risco de erros citogenéticos; já e os folículos primordiais têm tempo para reparar danos sub-letais das organelas e de outras estruturas durante a sua prolongada fase de crescimento (Oktay e cols., 1998-a; Shaw e cols., 2000).

No presente momento, o congelamento ovariano é um procedimento experimental, e, entre os potenciais usos dessa técnica destacam-se a maturação oocitária *in vitro*, (MIV) o xenotransplante e o autotransplante (Figura 2.1).



**Figura. 2.1 Opções para o uso da criopreservação ovariana**  
(Kim e cols.. Fertil Steril 2001;75:1049-1056)

### 2.1.1 Maturação oocitária *in vitro*

A maturação *in vitro* e o crescimento de folículos primordiais seguidos de fertilização *in vitro* é uma opção atrativa e desejada, mas é tecnicamente desafiadora devido à extensão da fase de crescimento, e da falta de conhecimento sobre as ótimas condições para o desenvolvimento e a maturação dos oócitos humanos

A maturação de folículos primordiais *in vitro* tem sido demonstrada em camundongos (Eppig e O'Brien, 1996). Wandji e colaboradores (1997), relataram que folículos primordiais de primatas não humanos poderiam sobreviver e se desenvolver até estágio de folículos secundários *in vitro* em cultura. Em ovinos, também foram isolados folículos pré-antrais de tecido criopreservado e cresceram até o estágio de antral (Newton e cols., 1999).

A maturação *in vitro* de oócitos é correntemente realizada somente nos estágios finais do desenvolvimento folicular e requer muito aprimoramento antes da sua ampla implementação clínica. A capacidade de obtermos o completo crescimento e a maturação de oócitos humanos imaturos, no entanto, não será disponível até que haja o desenvolvimento de um sistema ótimo de cultura, que depende do completo entendimento e controle dos mecanismos do crescimento folicular (Kim e cols., 2001). Liu e colaboradores (2000), demonstraram a maturação de folículos primordiais de camundongos pela combinação do autotransplante *in vivo* e cultura *in vitro*. Essa estratégia de dois passos para a maturação oocitária necessita ser investigada em outras espécies

### 2.1.2 Xenotransplante

O transplante de tecido ovariano criopreservado em animais hospedeiros com a subsequente maturação e coleta dos oócitos, pode oferecer importantes vantagens aos sobreviventes do câncer. Com essa técnica, a possibilidade de transmissão do câncer pode ser eliminada porque o câncer não pode penetrar na zona pelúcida e algumas dificuldades do crescimento e da maturação *in vitro* podem ser ultrapassadas. Adicionalmente, essa técnica pode ser aplicada a pacientes com alto risco de hiperestímulo (síndrome dos ovários policísticos) ou às pacientes em que há a preocupação com o estímulo hormonal como no câncer de mama (Kim e cols., 2001).

A técnica consiste em enxertar o fragmento de ovário humano, que havia sido criopreservado, na região subcapsular do rim (ou em outra região ricamente vascularizada) de camundongos imunodeficientes (*SCID mice*). Posteriormente, se faz a estimulação folicular, aplicando gonadotrofinas no camundongo (Gook e cols., 2001).

Nisolle e colaboradores (2000), compararam as características histológicas de ovários humanos frescos com criopreservados após xenotransplante em camundongos fêmeas e observaram que, apesar da maior fibrose, os ovários criopreservados demonstraram uma densidade folicular similar aos ovários frescos.

Foi demonstrado que, no tecido ovariano humano transplantado em camundongos imunodeficientes, os folículos crescem até o estágio de secretores antrais (Oktay e cols., 1998-b; Weissman e cols., 1999; Ravel e cols., 2000) e atingem a maturação folicular e ovulação com surgimento de corpo lúteo (Kim e cols., 2000; Gook e cols., 2003). Dentre

as vantagens no transplante xenográfico podemos citar a simplicidade do procedimento, a fácil monitoração do desenvolvimento folicular e o acesso direto à aspiração.

### **2.1.3 Autotransplante**

Autotransplante parece ser um método simples e prático para a maturação dos oócitos armazenados no tecido ovariano. O tecido ovariano criopreservado pode ser auto-enxertado tanto ortotopicamente (no sítio ovariano original da pelve) ou heterotopicamente, (em um sítio ectópico).

A vantagem teórica dos enxertos ortotópicos é a restauração da função reprodutiva normal e a concepção natural, ou a inseminação intra-uterina. No transplante heterotópico, a restauração de fertilidade está necessariamente associada à captura dos oócitos com fertilização *in vitro* e, quando seleciona-se um local para o enxerto, deve-se considerar o suprimento vascular e o fácil acesso (Falcone e cols., 2004).

#### **2.1.3.1 Autotransplante em animais**

O trabalho realizado por Gosden e colaboradores (1994), que restaurou a fertilidade, com gestação e nascimento em ovinos, foi um importante marco, pois foi a primeira gestação com tecido ovariano criopreservado em grandes animais. Em roedores, Sztejn e colaboradores (1998), descreveram o restabelecimento da fertilidade em 57% dos camundongos em que reimplantou ortotopicamente fragmento ovariano criopreservado, e

Candy e colaboradores (2000), obtiveram gestações após reimplantar ovário intacto que havia sido congelado.

Em grandes animais, foi mais difícil reproduzir os resultados iniciais de Gosden e colaboradores (1994), devido à maior dificuldade de perfusão vascular após o reimplante dos enxertos conseqüente ao maior volume ovariano. No entanto, Salle e colaboradores (2002), também obtiveram gestações com o nascimento em 4 ovelhas que tiveram ovários criopreservados, e Lee e colaboradores (2004), descreveram o primeiro nascimento após autotransplante heterotópico de ovário fresco em grande primata (*macaca rhesus*).

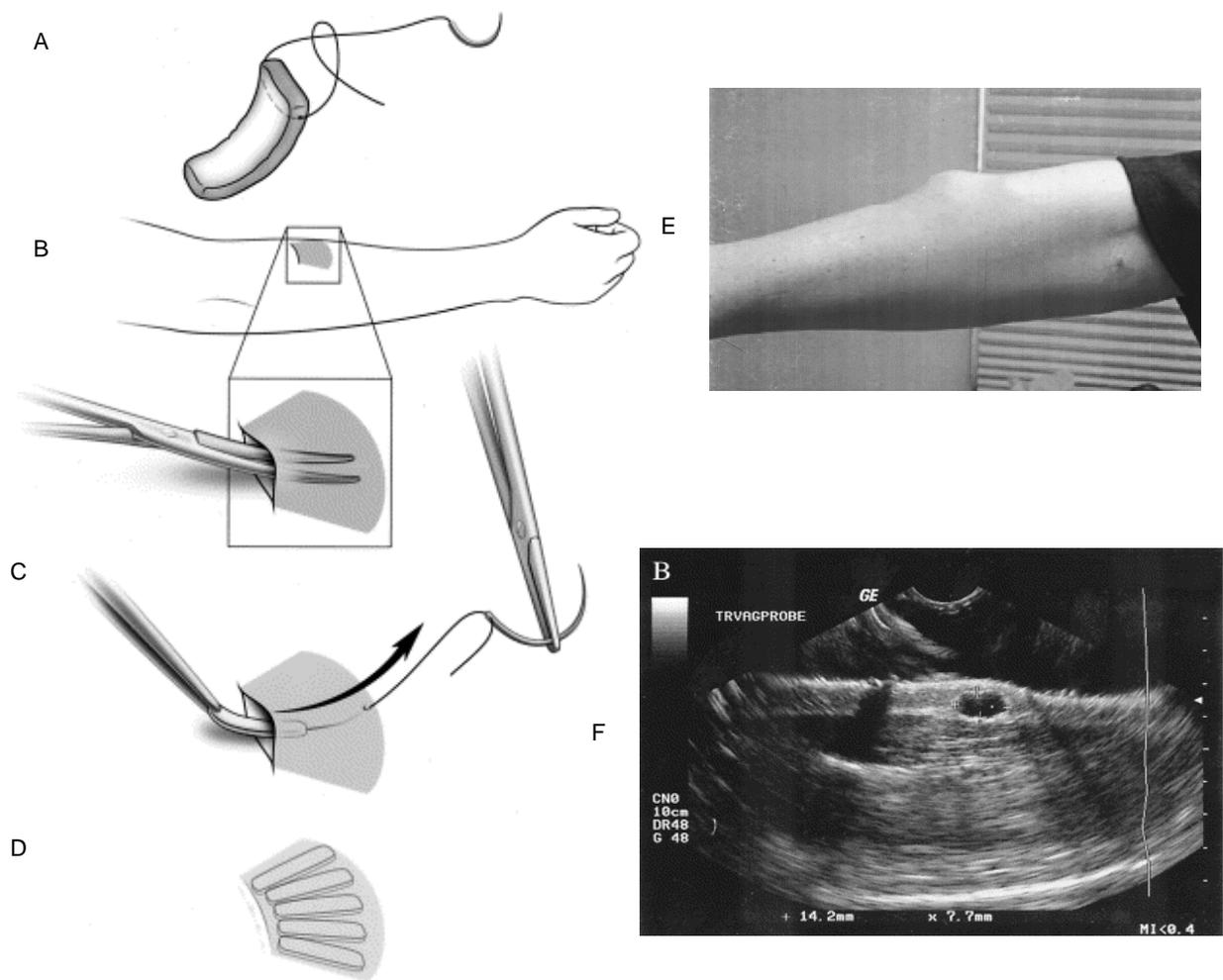
#### 2.1.3.2 Autotransplante em humanos

Em humanos, igualmente como ocorre em grandes animais, a revascularização do enxerto é a maior dificuldade encontrada, porém importantes progressos têm sido relatados. Radford e colaboradores (2001), descreveram o primeiro caso em que houve a comprovação do retorno da função ovariana em paciente que teve fragmentos ovarianos criopreservados antes da quimioterapia por linfoma de Hodgkin e transplantados após a cura do câncer.

Oktay e colaboradores (2000), comprovaram o funcionamento de autotransplante ortotópico quando reimplantaram fragmentos de ovário fresco na fáscia da musculatura do antebraço e, após estimulação com gonadotrofinas, obtiveram crescimento de folículo de 15mm e coleta de óvulos (Figura 2.2). Callejo e colaboradores (2001), realizaram

autotransplante heterotópico de 4 pacientes, 3 de ovários frescos e 1 de ovário congelado, observando o restabelecimento da função ovariana em 3 das 4 pacientes.

Andersen e colaboradores (2004), relataram o retorno das menstruações em paciente com linfoma de Hodgkin após o reimplante de tecido ovariano criopreservado, e Kim (2004) descreve o primeiro caso com um ano de funcionamento ovariano após fragmentos criopreservados terem sido enxertados entre a bainha e o músculo reto abdominal. Oktay (2004) demonstrou o desenvolvimento de embrião após transplante heterotópico de tecido ovariano congelado: com 8 ciclos estimulados e não estimulados, 20 oócitos foram coletados, 8 foram passíveis de fertilização; houve a formação de um embrião, que foi transferido no estágio de 4 células; no entanto, não houve gestação após a transferência.



**Figura 2.2**

**Autotransplante ovariano no antebraço (heterotópico)**

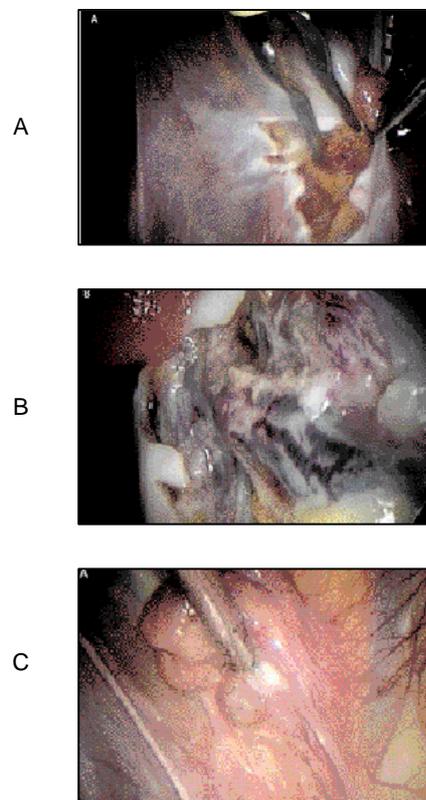
**A-D:** representação gráfica da técnica de enxerto de fragmentos ovarianos na fáscia do músculo braquiorradial, no antebraço

**E:** saliência no antebraço ocasionada pelo crescimento do folículo

**F:** imagem ecográfica de folículo ovariano de 1,5cm

(Oktay e cols.. Fert Ster 2003;80:193-98)

Donnez e colaboradores (2004), relataram a primeira gestação e o primeiro nascimento em humanos após transplante ortotópico de tecido ovariano criopreservado. Paciente com 25 anos, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin estágio IV, teve tecido ovariano, criopreservado antes de realizar quimioterapia e reimplantado junto ao hilo ovariano 5 anos após o término do tratamento. Onze meses após o reimplante, gestou naturalmente, com nascimento de criança normal (Figura 2.3).



**Figura 2.3 Autotransplante ortotópico**

**A e B: janela peritoneal abaixo do hilo ovariano**

**C: enxerto ovariano com visualização de folículo**

(Donnez e cols.. Lancet 2004;364:1405-10)

### 2.1.3.3 O uso de fragmentos ovarianos em criopreservação

A criopreservação de tecido ovariano é realizada predominantemente com pequenos fragmentos avasculares e, somente recentemente, alguns poucos trabalhos descreveram experiências com o congelamento de ovário intacto. Pesquisando sobre os fragmentos que são criopreservados, encontramos somente uma característica em comum: ter pelo menos uma medida igual ou menor que 2mm (Tabela 2.1). As outras duas medidas variam bastante, fato que pode ser explicado pelas diferentes características de cada estudo.

Fragmentos de ovários de roedores são necessariamente pequenos, assim como os de ovelhas e suínos são menores que os de humanos e bovinos. A variação de medidas também se dá em função do objetivo de cada estudo. Diferentes pesquisas são feitas com fragmentos ovarianos, como análises histológicas pós-congelamento para verificar a viabilidade folicular (Newton e cols., 1996) e a permeabilidade dos crioprotetores (Newton, 1998) ou, ainda, experimentos in vivo, como xenotransplante (Gook e cols., 2003), ou autotransplante (Oktay e cols., 2000; Radford e cols., 2001; Oktay e cols., 2003).

A heterogeneidade nos tamanhos dos fragmentos pode ser explicada pelo que descrevemos acima; porém, a justificativa para a única característica comum, ter 2mm ou menos em pelo menos uma medida, é que em tecidos mais espessos pode não haver a adequada penetração do crioprotetor e, conseqüentemente, não haver suficiente proteção aos danos celulares e teciduais causados pelo congelamento (Oktay e cols., 2001).

**Tabela 2.1****Comparação entre diferentes tamanhos de fragmentos usados em estudos com criopreservação ovariana em humanos**

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Medidas dos fragmentos</b>	<b>Estudo</b>
Hovatta e cols.	1996	entre 0,3 e 2mm	Comparou DMSO x PROH
Newton e cols.	1996	< 2mm	Xenotransplante
Newton e cols.	1998	2 x 4mm diâmetro	Comparou a permeabilidade de 4 crioprotetores
Gook e cols.	1999	1 x 3 x 4mm	Xenotransplante.
Nisolle e cols.	2000	1 x 1 x 1mm	Xenotransplante
Oktay e cols.	2000	2 x 2 a 5 x 10mm	Autotransplante ortotópico
Kim e cols.	2001	1-2 x máximo 8mm	Avaliou transmissão do cancer
Radford e cols.	2001	1 x 5 x 10mm	O retorno da fertilidade
Gook e cols.	2001	0,5 x 2 x ~4mm	Após descongelamento cortou ~0,5 x 1 x 0,5mm e fez xenotransplante
Oktay e cols.	2003	1-3 x 5 x 10mm	Transplante antebraço
Gook e cols.	2003	1 x 2 x ~4mm	Xenotransplante
Ravel e cols.	2003	1 x 1 x 5mm	Coleta de oócitos durante congelamento
Donnez e cols.	2004	2 x 2mm	Nascimento após autotransplante

O manejo de tecido com medidas diminutas como 0,3mm (Hovatta, 1996), 0,5mm (Gook, 2001), 1mm (Nisolle e cols., 2000) ou 2mm (Donnez e cols., 2004), pode trazer algumas dificuldades. A retirada de pequenos fragmentos demanda um tempo maior, com mais manipulação do ovário, e também aumenta a possibilidade de dano na camada cortical, onde se localizam os folículos. Pode ainda ser necessária a magnificação da visão (Oktay e cols., 1997; Hreinsson e cols., 2003). Para retirarmos e congelarmos fragmentos maiores, não é necessária extrema destreza, e o procedimento pode ser realizado mais rapidamente e com menos riscos. Outra vantagem fundamental é a existência de uma maior quantidade de folículos disponíveis (Jeremias e cols., 2003).

#### *2.1.3.4 Criopreservação do ovário intacto*

Como referido anteriormente, até hoje, a grande maioria dos trabalhos foi realizada com a criopreservação de fragmentos da córtex não vascularizados, no entanto, o transplante de ovário intacto criopreservado, conservando o pedículo vascular, é uma técnica que tem sido experimentada nos últimos anos com potencial de preservação da fertilidade. Nos enxertos não vascularizados há um significativo dano causado pela isquemia após a reimplantação, até que ocorra a revascularização, conseqüentemente, um transplante vascular, seria uma abordagem lógica (Figura 2.4).

Transplantes vascularizados de ovários intactos criopreservados têm duas limitações: a dificuldade técnica em proceder a reanastomose e o desafio de preservar um órgão intacto (Martinez-Madrid e cols., 2004). Existem poucos trabalhos com o transplante de ovário intacto criopreservado.

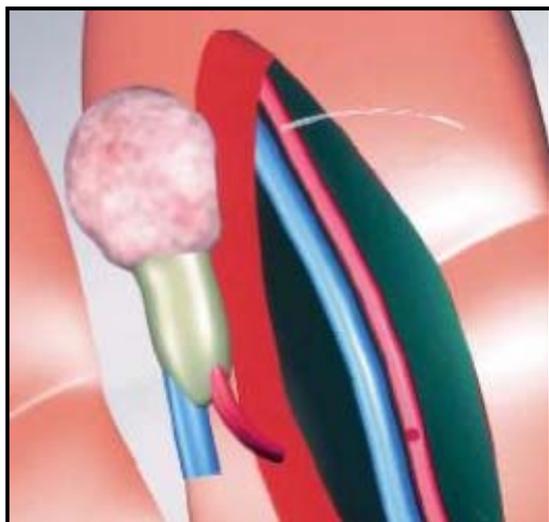
Em roedores, Wang e colaboradores (2002) descreveram a criopreservação e o transplante em bloco de ovários, trompas e segmento superior do útero de ratos. Houve o desenvolvimento folicular, de corpo lúteo e uma gestação, com dois fetos. Em outro estudo, também com ratos, quatro dos sete transplantes de ovário intactos criopreservados (57%) sobreviveram por mais de 60 dias, ocorreu ovulação, e uma gestação foi obtida (Yin e cols., 2003).

Ravel e colaboradores (2004) reimplantaram ovário criopreservado com pedículo vascular em ovelhas ooforectomizadas. Em três das oito ovelhas tratadas, foram observados níveis plasmáticos de progesterona. Martinez-Madrid e colaboradores (2004) estudaram a criopreservação de ovário intacto em humanos. Foi realizada ooforectomia, com a retirada do ovário, junto com artéria e veia, durante cirurgia de Werthein-Meigs, antes de radioterapia. Os ovários não foram reimplantados, porém o estudo descreveu 75% de viabilidade folicular pós descongelamento e não encontrou diferença histológica na morfologia dos folículos.

A principal diferença entre a técnica de criopreservação de fragmento avasculares e do ovário intacto é que, enquanto nos fragmentos a penetração tecidual dos crioprotetores se dá por difusão, no órgão inteiro, é realizada a perfusão pelo pedículo vascular.

O congelamento do ovário intacto ainda é bastante desafiador. Há a necessidade da remoção e armazenamento de todo ovário com sua vascularização, a maioria dos processos que afetam a sobrevivência dos ovários ao congelamento são desconhecidos,

a dinâmica dos agentes crioprotetores é pouco compreendida e a adequada difusão dos crioprotetores em tecidos grandes é um processo difícil (Bedaiwy e cols., 2003).



**Figura 2.4**

**Autotransplante heterotópico de ovário intacto com pedículo vascular**

**Músculo reto abdominal e artéria epigástrica.**

**Modelo proposto por Falcone e colaboradores.**

**(Falcone e cols.. Fertil Steril 2004;81:243-257)**

#### *2.1.3.5 A segurança dos transplantes ovarianos*

Existe uma preocupação legítima com a recidiva de células cancerígenas quando da realização de transplante ovariano. Pelo menos um estudo com modelo animal levantou esta questão, embora uma forma muito agressiva de câncer linfático tenha sido usado como exemplo (Shaw e cols., 1996). Naquele estudo, o tecido ovariano coletado de

camundongos com linfoma foi enxertado em camundongos fêmeas saudáveis. Em um grupo que recebeu tecido ovário proveniente de animais que portavam linfoma, todas as fêmeas que receberam enxerto, tanto criopreservado quanto fresco, desenvolveram linfoma e morreram por esta causa.

Kim e colaboradores (2001), realizaram outro estudo em que 30 camundongos imunodeficientes (*SCID-mice*) receberam transplante de tecido ovariano criopreservado de 18 pacientes humanos com linfoma (13 com linfoma de Hodgkin e 5 com linfoma não Hogkin) e 3 camundongos receberam linfonodos de pacientes com linfoma. Dezesesseis semanas após, os animais foram necropsiados e, por análise histológica, imunohistoquímica, e análise de micro satélite de DNA humano, nenhum dos animais transplantados com ovários desenvolveu doença. No entanto, todos os 3 animais que haviam recebido linfonodos desenvolveram linfomas de células B.

O risco de recidivar um câncer devido ao transplante ovariano não deve ser nem ignorado nem exagerado. Devido às limitadas experiências clínicas com transplante ovariano, ainda não é conhecido se o risco de recorrência é aumentado nessas pacientes. A maioria dos cânceres em mulheres em idade reprodutiva não metastatiza para os ovários. As chances de transmissão do câncer no transplante de ovário dependem principalmente do tipo de câncer (Tabela 2.2), enquanto muitos tipos nunca originam metástases ovarianas, outros, devido à sua natureza sistêmica expõem a um maior risco (Oktay e Sonmezer, 2004).

## Tabela 2.2

### Risco de envolvimento ovariano com células cancerígenas de acordo com o tipo de câncer

(Oktay. Hum Reprod Update 2001;7:526-534)

Baixo risco (<0,2%)	Risco moderado (0,2-11%)	Alto risco (>11%)
Tumor de Wilms	Adenocarcinoma de mama	Leucemia
Linfoma não Hodgkin	Adenocarcinoma do colo uterino	Neuroblastoma
Linfoma de Hodgkin		
Rabdomiossarcoma não genital		
Sarcoma osteogênico		
Carcinoma de células. escamosas do colo uterino		
Sarcoma de de Ewing		

Tentativas de confirmar a segurança do tecido ovariano baseados no microscópio óptico podem não ser suficientes. É necessário desenvolver métodos de *screening* para detectar doença mínima residual (MRD) no tecido ovariano para eliminar o risco de transmissão de células cancerígenas com o transplante. Na verdade, a córtex ovariana é relativamente avascular e, no seu preparo, sofre várias lavagens, o que reduz a probabilidade de transmissão. A contaminação, no entanto, mesmo com poucas células,

não pode ser tolerada. O risco de transmissão de células cancerosas depende do tipo de doença, atividade, estágio, e da massa de células transferidas.

É imperativo que os casos sejam individualizados e que haja um diálogo muito próximo com o oncologista, para eleger os casos que tenham indicação para o transplante e para avaliar a segurança quanto a transmissão do câncer (Oktay, 2001).

#### *2.1.3.5 Indicações para congelamento de tecido ovariano*

A abordagem da preservação da fertilidade deve ser individualizada. O congelamento ovariano é uma ferramenta a mais no espectro das opções existentes. É importante que o enfoque da paciente seja multidisciplinar, com a presença de oncologistas e hematologistas, e que hajam protocolos e critérios de seleção para eleger as pacientes que devam realizar a criopreservação ovariana.

Oktay & Sonmezer (2004) descreveram as estratégias adotadas no *Center for Reproductive Medicine and Infertility*, da Universidade de Cornell, Nova York, para a preservação da fertilidade das pacientes oncológicas (Figura 2.5). Em recente publicação, Wallace e colaboradores (2005), publicaram os critérios de seleção para a criopreservação de tecido ovariano adotados em Edimburgo, Reino Unido, após reunião multidisciplinar do *UK Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* (Quadro 2.1).



**Figura 2.5**

**Abordagem individualizada para a preservação da fertilidade**

**Proposta do *Center for Reproductive Medicine*, da Universidade de Cornell, Nova York, EUA**

**(Oktay e Sonmezer. Hum Reprod)**

## **Quadro 2.1 Critérios de Edimburgo para a indicação de criopreservação ovariana**

(Wallace e cols.. Lancet Oncol 2005;6:209-18)

- **Pacientes com menos de 30 anos**
- **Sem história prévia de quimioterapia ou radioterapia**  
(pacientes menores de 15 anos, com quimioterapia de baixo risco, devem ser consideradas)
- **Chance realista de sobrevivência a longo prazo**
- **Tratamento com alto risco de induzir a falência ovariana**  
(estimativa > 50%)
- **Consentimento informado**
- **Sorologia negativa para HIV e para hepatites**
- **Paciente sem filhos**

Felizmente, muitas crianças, adolescentes e mulheres adultas que têm o diagnóstico de câncer, podem, de forma realista, ter sobrevida longa após o tratamento. A infertilidade, contudo, é um dos efeitos adversos mais devastadores conseqüentes das agressivas, mas eficientes, terapias dessas pacientes.

A criopreservação ovariana ainda é um procedimento experimental e deve ser indicada de forma individualizada e criteriosa. No entanto, os progressos dessa técnica têm sido constantes e, dessa maneira, a criopreservação de tecido ovariano é mais uma opção de tratamento para a preservação da fertilidade nas pacientes oncológicas.

## **2.2 PRINCÍPIOS DE CRIOBIOLOGIA**

### **2.2.1 Introdução**

O objetivo essencial da criopreservação é a manutenção da viabilidade e da funcionalidade celular e tecidual. A sobrevivência ao congelamento é o resultado de numerosos fatores que interagem entre si.

### **2.2.2 Eventos que ocorrem durante o congelamento**

A criopreservação do material biológico usualmente ocorre em uma solução aquosa, com diferentes solutos presentes. As propriedades físico-químicas que regem os eventos aos quais está submetida a solução durante o congelamento resultam da concentração dos presentes. O ponto de congelamento da solução é inversamente proporcional à concentração dos solutos presentes (Vila, 1984).

Quando uma solução celular é resfriada e alcança temperaturas entre  $-5$  e  $-10^{\circ}$  C, formam-se núcleos de gelo distribuídos aleatoriamente no meio extracelular, com formação de cristais. O gelo no espaço extracelular coexiste com água líquida intracelular graças à membrana plasmática, que constitui a barreira que bloqueia o crescimento de cristais de gelo dentro da célula (Mazur, 1977).

Durante a cristalização no meio extracelular, forma-se gelo puro, deixando os solutos progressivamente mais concentrados na fração líquida, à medida que ocorre a

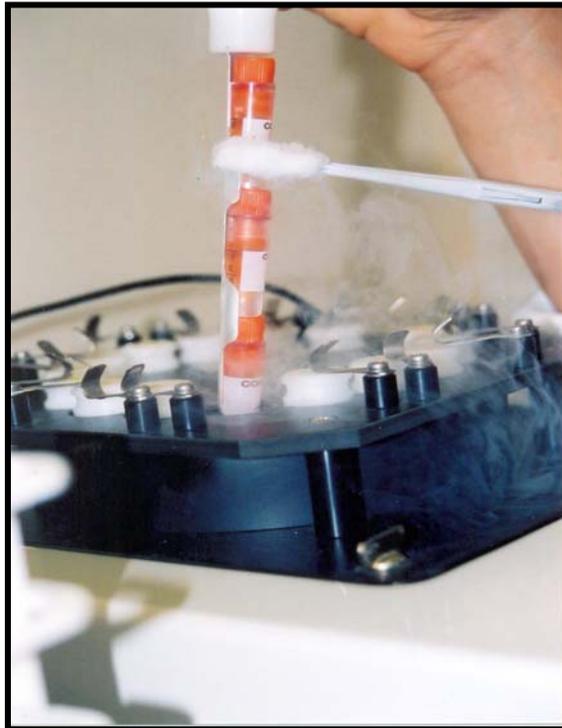
troca de fase. As células devem desidratar-se para manter o equilíbrio osmótico com um meio extracelular cada vez mais hipertônico.

Em um processo programado de resfriamento, à medida que o sistema de refrigeração extrai calor, a temperatura baixa até que, alcançando o ponto de congelamento, a fase líquida remanescente e os solutos solidificam. O ponto de congelamento reflete a máxima concentração de solutos que se podem obter antes de a água e os solutos solidificarem conjuntamente (Mazur e Schneider, 1986).

Denomina-se sobre-resfriamento a um estado em que a suspensão celular resfriada lentamente atinge temperaturas abaixo de seu ponto de cristalização mantendo-se, no entanto, em estado líquido. A água intracelular sobre-resfriada flui para fora da célula em resposta à diferença de potencial entre o meio intra e extracelular.

Ao ocorrer a cristalização, há uma liberação de energia em forma de calor latente e eleva-se transitoriamente a temperatura. Como o sistema de refrigeração continua extraindo calor e a temperatura continua descendo, a amostra rapidamente se esfria. Apesar disso, esse processo de aumento e diminuição rápida da temperatura é prejudicial para as células.

Para evitar os efeitos danosos do supercongelamento, como desidratação incompleta, as amostras devem ser induzidas a formar gelo, processo comumente chamado de indução da formação do gelo ou *seeding* (Figura 2.6), que ocorre em temperaturas logo abaixo do ponto de congelamento do meio. A indução da formação do gelo é induzida pelo toque no recipiente contendo as amostras, com um objeto metálico previamente exposto ao nitrogênio líquido.



**Figura 2.6**  
**Indução da formação do gelo (*seeding*)**

Após a indução da formação do gelo (*seeding*), as amostras são geralmente deixadas nessa mesma temperatura por 5 a 20 minutos, para se reequilibrarem. Durante esse período de tempo, as células irão se desidratar em resposta à elevada concentração de eletrólitos causada pela remoção de água na forma de cristais de gelo.

### **2.2.3 Influência da velocidade de congelamento**

No momento em que ocorre a cristalização no meio extracelular, os solutos ficam progressivamente mais concentrados, tornando o meio hipertônico. Em resposta à diferença de gradiente gerada entre o meio intra e extracelular, a água flui para o meio extracelular e congela externamente.

Os eventos físicos celulares subsequentes dependem da velocidade de congelamento. Quando o congelamento é lento, a célula é capaz de perder água rapidamente por osmose, aumentando a concentração dos solutos intracelulares, desidratando-se e evitando o congelamento intracelular. No entanto, se a velocidade é demasiadamente lenta, a desidratação poderá ser extrema, levando ao colapso celular. Quando a velocidade de congelamento é muito rápida, a célula pode não ser capaz de desidratar-se suficientemente rápido, formando gelo intracelular.

Com uma velocidade de congelamento adequada, a célula se desidratará e se concentrará intracelularmente antes de atingir a temperatura de cristalização, de forma que a possibilidade de congelamento intracelular, e o dano celular se minimizarão (Mazur, 1984).

#### **2.2.4 Papel dos crioprotetores**

Além de uma adequada velocidade de congelamento, para melhorar a viabilidade celular, é necessário alterar o comportamento físico-químico das soluções aquosas, envolvidas na criopreservação. Para isso, adicionam-se ao meio de congelamento agentes crioprotetores: substâncias muito hidrossolúveis e de baixa citotoxicidade que baixam o ponto de solidificação de uma dada solução (García e Vila, 1984). Os crioprotetores evitam ou minimizam a formação de cristais de gelo intracelulares, preservando as células, pois, devido à diminuição da temperatura de congelamento, a célula estará mais desidratada e o gradiente osmótico ao qual estará submetida será menor (McGann, 1978).

Os crioprotetores podem ser classificados em agentes penetrantes e não-penetrantes, de acordo com a permeabilidade da membrana celular. Os agentes penetrantes são substâncias de baixo peso molecular, permeáveis através da membrana, que protegem a célula das lesões produzidas pelos congelamentos com velocidade lenta. Os mais utilizados são: 1,2-Propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO), etileno-glicol (EG) e glicerol.

As características básicas desses agentes crioprotetores são a capacidade de penetrar na célula, para promover a desidratação, e não ser tóxico em concentrações multimolares. A taxa de penetração dos vários componentes varia em função do agente e de acordo com o tipo e a origem da célula e com a espessura do tecido.

Os agentes crioprotetores não-penetrantes são substâncias de alto peso molecular, que são efetivas quando se utilizam velocidades altas de congelamento. Não são crioprotectores propriamente ditos, já que não penetram na célula: exercem sua ação crioprotetora promovendo a rápida desidratação celular e somente são usados associados aos agentes penetrantes. Os mais utilizados são: sacarose, glicose, dextrose, polivinil-pirrolidona (PVP), dextrano, polietileno-glicol (PEG).

A ação coligativa dos agentes penetrantes e não-penetrantes permite à célula sobreviver às condições impostas pela redução do conteúdo de água durante o resfriamento. Os aditivos não permeáveis promovem, através de osmose, a retirada de água de dentro das células em temperaturas suficientemente baixas e a redução dos danos causados pela concentração de solutos. Dependendo da permeabilidade do crioprotetor utilizado e de sua citotoxicidade, a adição se realiza a 4°C, 37°C ou à temperatura ambiente.

### **2.2.5 Descongelamento**

A velocidade de descongelamento é o segundo fator mais importante para a sobrevivência celular. Existe uma relação entre as velocidades de resfriamento e de reaquecimento: células resfriadas rapidamente são mais sensíveis ao reaquecimento lento do que ao reaquecimento rápido (Mazur, 1970). Esse fato pode ser explicado pela presença de gelo intracelular, visto que células rapidamente congeladas estarão incompletamente desidratadas no momento da formação do gelo intracelular.

Durante o reaquecimento lento, os cristais de gelo crescem, resultando na morte celular devido à ruptura da membrana plasmática e devido ao trauma osmótico durante o descongelamento do gelo (Mazur, 1966). O reaquecimento rápido evitará os efeitos danosos do crescimento dos cristais.

### **2.2.6 Diluição do crioprotetor**

A maior parte da diluição do crioprotetor ocorre já durante o descongelamento (Farrant, 1980). As taxas de diluição devem ser perfeitas a fim de reduzir o dano devido ao choque osmótico. Durante a diluição ocorre um aumento imediato no volume celular e, se esse aumento for muito grande, a célula morre. O grau de aumento do volume celular depende da quantidade de crioprotetor dentro da célula e da velocidade com que ele pode sair da célula.

A temperatura é um fator importante durante a diluição, uma vez que ela influencia a velocidade de transporte do crioprotetor de dentro para fora da célula (Wittinghan, 1980). Teoricamente, o dano celular seria evitado fazendo-se uma diluição gradativa,

em etapas, de maneira que o volume celular nunca atinja valores críticos (Mazur, 1977).

O choque osmótico durante a diluição do crioprotetor pode ser evitado pela adição de um soluto impermeável como a sacarose (Leibo & Mazur, 1978). Nestas soluções, o equilíbrio osmótico é estabelecido pelo colapamento da célula, prevenindo-se o aumento do volume celular enquanto o crioprotetor desloca-se para fora dela (Leibo, 1989).

### **2.2.7 Armazenamento**

Teoricamente, as células podem sobreviver indefinidamente congeladas em temperaturas em que não existe atividade biológica, como ocorre no nitrogênio líquido. Os únicos tipos de reações que ocorrem nessa temperatura são fotofisiológicos, como a radiação ionizante.

O nível natural de radiação ambiente é baixo e, uma vez que menos de 1% das mutações espontâneas são atribuíveis à radiação ambiente a temperaturas fisiológicas, seria necessário armazenamento por 200 a 1000 anos para reduzir significativamente a sobrevivência celular (Whittingham, 1977). Assim parece não haver barreira óbvia ao armazenamento prolongado do tecido ovariano.

## 2.3 HISTOLOGIA DO TECIDO OVARIANO

Na espécie humana, os ovários são um par de órgãos medindo cerca de 3cm de comprimento, 1,5cm de largura e 1cm de espessura. O hilo do ovário está ligado à superfície posterior do ligamento redondo por uma prega peritoneal, o mesovário. Os vasos e nervos do ovário passam através de uma prega peritoneal chamada ligamento suspensor do ovário, para o mesovário e daí para o hilo do ovário. O pólo medial do ovário está ligado ao útero pelo ligamento ovariano.

A porção central do ovário, a região medular, contém tecido conjuntivo frouxo, com vasos sanguíneos relativamente grandes e contorcidos, vasos linfáticos e nervos. A sua porção periférica, a região cortical, ou córtex, circunda a medula e contém os folículos ovarianos, incluídos em um tecido compacto e altamente celular. No estroma que circunda os folículos estão presentes fibras musculares lisas. O limite entre a medula e a córtex não é muito nítido. No hilo, o córtex é interrompido, e o mesovário se continua com a medula. Nessa região, podem ser encontrados pequenos ductos irregulares, a *rete ovarii*, que são remanescentes das estruturas fetais.

A superfície do ovário é revestida por uma única camada de células cúbicas ou pavimentosas. Essa camada é conhecida como epitélio germinativo; é contínua com o mesotélio que recobre o mesovário. A denominação epitélio germinativo é herança dos primórdios dos estudos histológicos, quando se acreditava, incorretamente, ser esse o local de formação das células germinativas.

Atualmente, sabe-se que as células germinativas primordiais têm origem extra-gonadal e que elas migram para as gônadas, onde se diferenciam em ovogônias.

Entre o epitélio germinativo e a córtex, localizado abaixo, está uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea.

### **2.3.1 Folículos ovarianos**

Cada folículo ovariano contém um oócito que se encontra incluído no córtex do ovário. Seu tamanho indica o estado de desenvolvimento do oócito. Os primeiros estágios da oogenese ocorrem durante o início da vida fetal, com divisões mitóticas das oogônias. Os oócitos presentes no nascimento têm seu desenvolvimento interrompido na primeira divisão meiótica.

Quando as meninas entram na puberdade, os ovários iniciam uma fase de atividade reprodutiva que se caracteriza pelo crescimento e amadurecimento cíclicos de pequenos grupos de folículos. Em geral, a primeira ovulação só ocorre um ano ou mais após a menarca. A partir daí, inicia-se um ciclo de amadurecimento folicular e de ovulação que continua por um período de 30 a 40 anos.

Normalmente, a cada ciclo menstrual, apenas um oócito atinge maturação completa, sendo liberado pelo ovário. Durante a vida reprodutiva, a mulher produz aproximadamente 400 oócitos, enquanto a maioria dos 400.000 oócitos presentes ao nascimento não amadurecem e degeneram gradualmente através da atresia. Os poucos oócitos que permanecem, degeneram em poucos anos quando a mulher entra na menopausa.

Podem ser identificados três tipos de folículos ovarianos: folículo primordial, folículo em crescimento e folículo maduro ou de Graaf. Os folículos em crescimento ainda podem ser divididos em em primários e secundários (ou antrais).

#### *2.3.1.1 Folículo Primordial*

Os folículos primordiais são encontrados no estroma do córtex ovariano, bem abaixo da túnica albugínea. O oócito é circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas, situadas sobre uma membrana basal. Nesse estágio, as membranas plasmáticas do oócito e das células foliculares circundantes estão em íntima aposição e são relativamente lisas.

O oócito do folículo mede cerca de 30 $\mu$ m de diâmetro e contém um núcleo grande e excêntrico com cromatina frouxa e dispersa, e um ou mais nucléolos grandes. Um aparelho de Golgi bem desenvolvido, circundado por inúmeras mitocôndrias, está localizado perto do nucléolo. Em nível ultra-estrutural vê-se que o citoplasma contém, além de outras organelas típicas, lamelas anulares e numerosas vesículas pequenas que parecem estar associadas ao aparelho de Golgi, mas que também encontram-se espalhadas pelo citoplasma.

#### *2.3.1.2 Folículo em crescimento*

À medida que o folículo primordial se transforma no folículo em crescimento (ativo ou em amadurecimento), ocorrem alterações nas células foliculares no oócito e no folículo adjacente. Inicialmente, o oócito aumenta de tamanho, e as células pavimentosas que o circundam proliferam e tornam-se cúbicas, o folículo é identificado como folículo primário.

À medida em que o oócito cresce, aparece entre este e as células foliculares adjacentes uma camada homogênea, acidófila e retrátil, que se cora fortemente e é

denominada zona pelúcida. Essa zona aparece pela primeira vez ao microscópio óptico quando o oócito, circundado por uma única camada de células foliculares cúbicas ou cilíndricas, cresce até um diâmetro de 50 a 80 $\mu$ m. O oócito em crescimento é responsável pela produção dessa camada gelatinosa, positiva ao método do ácido periódico Schiff (PAS), rica em glicosaminoglicanas e proteoglicanas.

Através da rápida proliferação mitótica, a camada única de células foliculares dá origem a um epitélio estratificado, que circunda o oócito e repousa sobre uma membrana basal. As células foliculares são, então, identificadas como células da granulosa. À medida que estas últimas proliferam, as células do estroma, que circundam diretamente o folículo, formam uma bainha celular, a teca folicular, externamente à membrana basal.

A teca folicular diferencia-se depois em duas camadas: a teca interna, que é uma camada interna e altamente vascularizada, e a teca externa, que é uma camada externa de células do tecido conjuntivo. Os limites entre essas duas camadas e entre a teca externa e o estroma circundante não são distintos.

Contudo, a membrana basal situada entre a camada da granulosa e a teca interna estabelece um limite distinto, separando essas camadas; ela também separa o rico leito capilar da teca interna da camada da granulosa, que é avascular durante o período de crescimento folicular. Quando totalmente diferenciadas, as células da teca interna são cúbicas e possuem características ultra-estruturais típicas de células produtoras de esteróides.

A distribuição das organelas nos oócitos altera-se à medida que este amadurece. No seu citoplasma, estão espalhados vários complexos de Golgi, derivados do único complexo de Golgi justanuclear do oócito primário. Há um aumento no número de ribossomas livres, de pequenas vesículas e de corpúsculos multivesiculares e na quantidade de retículo endoplasmático granular.

O folículo primário inicialmente aprofunda-se no estroma cortical à medida que seu tamanho aumenta, sobretudo através da proliferação das células da granulosa. Quando a camada da granulosa atinge a espessura de 6 a 12 camadas celulares, aparecem cavidades cheias de líquido por entre as células da granulosa.

O líquido rico em ácido hialurônico, que se chama líquido folicular, vai se acumulando por entre as células da granulosa, as cavidades começam a fundirem-se, formando finalmente uma única cavidade em forma de crescente, chamada antro folicular. O folículo é então identificado como folículo secundário ou folículo antral. O oócito que tem posição excêntrica e que atingiu o diâmetro de aproximadamente 125 $\mu$ m, não cresce mais. O folículo, que tinha um diâmetro de 0,2mm quando o líquido folicular apareceu pela primeira vez, continua a crescer e atingirá o diâmetro de 10mm ou mais .

À medida que o tamanho do folículo secundário aumenta, o antro folicular, revestido por várias camadas de células da granulosa, também aumenta. A camada da granulosa tem espessura relativamente uniforme, com exceção da região associada ao oócito. Nesta, as células da granulosa formam um montículo espesso, o *cumulus oophorus*, que se projeta para o antro e circunda o oócito. As células do

*cumulus oophorus* que circundam diretamente o oócito e que permanecem com ele na ovulação também são conhecidas como *corona radiata*.

### 2.3.1.3 Folículo Maduro ou de Graaf

Um folículo maduro tem diâmetro de 10mm ou mais, estende-se por toda a espessura do córtex e projeta-se na superfície do ovário. À medida que se aproxima de seu tamanho máximo, vai diminuindo a atividade mitótica das células da granulosa. A camada da granulosa parece ficar mais delgada à medida que o tamanho do antro folicular aumenta. Enquanto que o espaço entre as células da granulosa vai aumentando, o oócito e as células do *cumulus oophorus* vão se soltando das demais células da granulosa como preparação para a ovulação. As células do *cumulus oophorus*, que circundam diretamente o oócito, formam uma camada celular única, a *corona radiata*, externamente à zona pelúcida. Essas células e as células do *cumulus oophorus*, dispostas frouxamente, permanecem associadas ao oócito no momento da ovulação (Ross, 1993).

## **2.4 PREPARO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS**

### **2.4.1 Desidratação**

A desidratação visa à substituição da água ou do solvente aquoso do fixador por um solvente não polar. A água presente nos tecidos é retirada pela passagem do material em concentrações crescentes de etanol de 70% até etanol puro (100%).

### **2.4.2 Clarificação ou diafanização**

O xilol é usado como agente clarificador padrão com o seguinte protocolo:

- a) lavagem do fixador,
- b) etanol (álcool ) -70%- mínimo 1h,
- c) etanol 80% - 1h,
- d) etanol 90% - 1h,
- e) etanol 100% - 3 x 1h,
- f) xilol - 2 x 1h,
- g) parafina - 3 x 1h.

### **2.4.3 Corte**

O micrótomo é o aparelho utilizado para o corte da amostra na espessura desejada. O corte é colocado em uma lâmina histológica de vidro preparada com adesivo *polylysine*

#### 2.4.4 Coloração

As células coradas pela hematoxilina são denominadas basófilas, tais como os núcleos das células. A eosina, um corante de cor rosa a avermelhada, ácido (aniônico), cora estruturas básicas caracterizando-as como estruturas acidófilas, como o citoplasma e a matriz extracelular.

É aplicada a seguinte seqüência de substâncias para a coloração com hematoxilina e eosina:

- a) xilol: três vezes de três a cinco minutos,
- b) etanol 100% duas vezes de três a cinco minutos,
- c) etanol 90% cinco minutos,
- d) etanol 80% cinco minutos,
- e) etanol 70% cinco minutos,
- f) água destilada cinco minutos,
- g) hematoxilina: mínimo de três minutos,
- h) lavado em água corrente por dez minutos,
- i) água destilada: um minuto,
- j) eosina - Lavado rapidamente três vezes .em etanol 80%,
- k) etanol 90% - três minutos,
- l) etanol 100% : duas vezes de três minutos,
- m) xilol: três vezes de três a cinco minutos.

#### **2.4.5 Montagem**

É o fechamento do material (um sanduíche) com resina (bálsamo do Canadá) que faz aderência entre a lâmina e a lamínula. Esse processo impede entrada de ar e umidade no corte e permite transparência e refringência , possibilitando passagem adequada de luz para observação ao microscópio (Beçak e Paulete, 1996).

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Society for Reproductive Medicine e Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*. 2004;81:1207–20.
2. Andersen Y, Schmidt K, Starup J, Loft A, Ziebe A, Byskow A, Andersen A. Autotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue. Supplement abstracts of the 20<sup>th</sup> annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 2004; 19 Suppl. 1:i76.
3. Ataya K, McKanna J, Weintraub A, Clark M, LeMaire W. A luteinizing hormone–releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. *Cancer Res* 1985;45:3651–56.
4. Ataya K, Rao L, Lawrence E, Kimmel R. Luteinizing hormone–releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1995;52:365–72.
5. Azambuja R, Stachecki J, Badalotti M, Michelon J, Petracco A. Nascimento de feto a termo após congelamento de oócitos. *J Brasileiro Reprod Assist* 2002;6:119-21.
6. Beçak W, Paulete J. Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 2, p. 574-88.
7. Bedaiwy, M; Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein M, Siemianow M., Biscotti C, e Falcone T Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2003;79:594-602.
8. Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:29–33.
9. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum Reprod* 1996;11:1620 –26.
10. Bokser L, Szende B, Schally A. Protective effects of D-Trp6- luteinising hormone-releasing hormone microcapsules against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. *Br J Cancer* 1990;61:861–65.
11. Boldt J, Cline D, McLaughlin D. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2003;18:1250–55.
12. Byrne J, Fears T, Gail M. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescent. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:788-93.

13. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila J, Balasch J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4489 – 94.
14. Candy C, Wood M, Whittingham D. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 2000;15:1300-04.
15. Chambers S, Chambers J, Holm C, Peschel R, Schwartz P. Sequelae of lateral ovarian transposition in unirradiated cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 1990;39:155–59.
16. Chen S, Lien Y, Chen H, Chang L, Tsai Y, Yang Y. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod* 2005;24:1-6.
17. Chiarelli A, Marret L, Darling G. Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer in 1964-1988 in Ontario, Canada. *Am J Epidemiol* 1999;150:245-54.
18. Covens A, Van der Putten H, Fyles A. Laparoscopic ovarian transposition. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996;17:177-82.
19. Danesly R. Inmaturerat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol* 1954;11:197-00.
20. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet j, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10.
21. Eppig J, O'Brien M. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197–07.
22. Eroglu A, Toth T, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 1998;69:944-57.
23. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) The European IVF-monitoring programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE *Hum Reprod* 2005;20:1158-76.
24. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411–16.
25. Falcone T, Attaran M, Bedaiwy M, Goldberg J. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril* 2004; 81:243-57.

26. Farrant J. General observations on cells preservation. In: Low temperature preservation in medicine and biology. Farrant, J, Pitmen. editors. Ashwood-Smith: Mj & Medical Tunbridge Wells, Kent, UK. 1980, p. 1-18.
27. Feeney D, Moore D, Look K, Stehman F, Sutton G. The fate of the ovaries after radical hysterectomy and ovarian transposition. *Gynecol Oncol* 1995;56:3-7.
28. García J, Vila L. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984;6:219-25.
29. Glode L, Robinson J, Gould S. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 1981;1:1132-34.
30. Gook D, Osborn S, Johnston W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8:1101-09.
31. Gook D, McCully B, Edgar D, McBain J. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2001;16: 417-22.
32. Gook D, Edgar D, Borg J, Archer J, Lutjen P, McBain J. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2003;9:1772-81.
33. Gosden R, Baird D, Wade J, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196° C. *Hum Reprod* 1994;9:597-03.
34. Gosden R, Kim S, Mathews S. Frozen banking of follicles. In: Jansen R, Mortimer D, editors. *Towards reproductive certainty*. New York: Parthenon; 1999. p. 163-69.
35. Hovatta O, Sylie R, Krausz T, Abir R, Margara R. Cryopreservation of human tissue using dimethylsulfoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996;11:1268-72.
36. Hreinsson J, Zhang P, Swahn M, Hultenby K, Hovatta O. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue: comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Hum Reprod* 2003;18: 2420-28.
37. Jeremias E, Bedaiwy M, Nelson D, Biscotti C, Falcone T. Assessment of tissue injury in cryopreserved ovarian tissue. *Fertil Steril* 2003;79:651-56.
38. Kim S, Soules M, Gosden R, Battaglia D. The evidence of follicle maturation and subsequent ovulation in human ovarian tissue x-enografted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Fertil Steril* 2000;74(suppl):S34.
39. Kim S, Radford J, Harris M, Varley J, Rutherford A, Lieberman B e cols.. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. *Hum Reprod* 2001;16:2056-60. Kim S, Battaglia,

- Soules M, The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril* 2001;76:1049-56.
41. Kim S, Hwang I, Lee H, Kang H. Long term maintenance of ovarian function of frozen-thawed human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2004; 19 Suppl 1:i77
  42. Lee D, Yeoman R, Battaglia D, Stouffer R, Zelinski-Wooten M, Fanton J, Wolf D. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature* 2004;11:137-38.
  43. Leibo S, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: *Methods in Mammalian Reproduction*. New York: Academic Press; 1978. p. 45-52.
  44. Leibo S. Equilibrium and non-equilibrium cryopreservation of embryos. *Theriyogeniology* 1989;31:85-93.
  45. Liu J, Van der Elst J, Van Den Broecke R, Dumortier F, Dhont M. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and *in vitro* culture. *Biol Reprod* 2000;62:1218 –23.
  46. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004;82:1390-94.
  47. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 1966;2:181-92.
  48. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 1970;168:939-49.
  49. Mazur P. Slow-freezing injuries in mammalian cells. In: Elliot K, Whelan J, editors. *The freezing of mammalian embryos*. CIBA Foundation Symposium. Amsterdam: Elsevier; 1977. p. 19-48.
  50. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247:125-42.
  51. Mazur P e Schneider O. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implication. *Cell Biophys* 1986;8:259-85.
  52. Mc Vie J. Cancer treatment: the last 25 years. *Cancer Treat Rev* 1999;25:323-31.
  53. McGann L. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* 1978;15:382-90.
  54. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:535-43.
  55. Meirow, D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility on female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hematological neoplasia and other cancers. *Leuk Lymphoma* 1999;33:65-76.

56. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril* 2000;74:743–48.
57. Morita Y, Tilly J. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999;213:1–17.
58. Newton H, Aubard Y., Rutherford, A, Sharma, V, Gosden, RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996;11:1487–91.
59. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13: 376–80
60. Newton H, Picton H, Gosden R. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil* 1999;115:141–50.
61. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 2000;74:122-29.
62. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997;67:481–86
63. Oktay K, Newton H, aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocyte and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998-a;69:1-7.
64. Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden R. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/*hpg* mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998-b;13:1133– 38.
65. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;342:1919.
66. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications. *Hum Reprod Update* 2001;7:526-34.
67. Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z. A technique for transplantation of ovarian cortical to strips to the forearm. *Fert Ster* 2003;80:193-98.
68. Oktay K, Sonmezer, M. Ovarian tissue banking for cancer patients. *Hum Reprod* 2004;19:477-80.
69. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837-40.
70. Parkes A, Smith A. Preservation of ovarian tissue at  $-79^{\circ}$  C for transplantation. *Acta Endocrinol* 1954;17:313-20.

71. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fartto R, Ciotti P, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:33–37.
72. Quintans C, Donaldson M, Bertolino M, Pasqualini R. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod* 2002;17:3149–52.
73. Radford J, Lieberman B, Brison R, Smith A, Critchlow J, Russel S, Watson A, Clayton J, Harris M, Gosden R, et. al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high dose chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2001;357:1172-75.
74. Revel A, Raanani H, Leyland N, Casper R. Human oocyte retrieval from nude mice transplanted with human ovarian cortex. *Hum Reprod* 2000;15:13.
75. Ross MH. Sistema genital feminino. In: *Histologia: Texto e Atlas*. São Paulo. 2<sup>a</sup> ed.: Panamericana; 1993.p.649-70.
76. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz R, Guerin J, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002;77:403–08.
77. Shamberger R, Rosenberg S, Seipp C, Sherins R. Effects of high-dose methotrexate and vincristine on ovarian and testicular functions in patients undergoing postoperative adjuvant treatment of osteosarcoma. *Cancer Treat Rep* 1981;65:739–46.
78. Shaw J, Bowles J, Koopman P, Wood E, Trounson A. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 1996;11:1668-73.
79. Shaw J, Oranratnachai A, Trounson A. Fundamental cryobiology of mammalian oocyte and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000;53:59-72.
80. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004; 10:251-66.
81. Sztejn J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biol Reprod* 1998;58:1071–74.
82. Tangir J, Zeltermann D, Ma W, Schwartz P. Reproductive function after conservative surgery and chemotherapy for malignant germ cell tumors of the ovary. *Obstet Gynecol* 2003;101:251–57.
83. Tilly J. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996-a;1:162–72.
84. Tilly J. The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Front Biosci* 1996-b;1:1–11.
85. Tilly J. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol Lett* 1998;102-3:497–01.

86. Tulandy T, Al-Took S. Laparoscopic ovarian suspension before irradiation. *Fertil Steril* 1998; 70:381-83.
87. Vila L. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol* 1984;6:227-36.
88. Vila L, Carretero F. Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol* 1985;7:61-67.
89. Wallace W, Shalet S, Hendry J, Morris-Jones P, Gattamaneni H. Ovarian failure following ovarian irradiation in childhood. The radiosensitivity of human oocyte. *Br. Radiol* 1989;62: 995-98.
90. Wallace W, Andersen R, Irvine D. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005;6:209-18.
91. Wandji S, Srsen V, Nathanielsz P, Eppig J, Fortune J. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Hum Reprod* 1997;12:1993–2001.
92. Warne G, Fairley K, Hobbs J, Martin F. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med* 1973;289:1159–62.
93. Waxman J, Ahmed R, Smith D, Wrigley P, Gregory W, Shalet S, e cols. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19:159–62.
94. Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt E, Casper R. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod* 1999;60:1462–67.
95. Wittingham D, Lyon M, Glenister P. Long term storage of mouse embryos at – 196° C: the effect of background radiation. *Genet Res* 1977;29:171-81.
96. Wittingham D. Principles of embryo preservation. In: Ashwood-Smith Mj, Farrant J, editors. *Low temperature preservation in medicine and biology*. Tunbridge Wells: Kent; 1980. p. 65-84.
97. Yin H, Wang X, Kim S, Chen H, Tan S, Gosden R. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003;18:1165-72.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os achados histológicos presentes em fragmentos ovarianos de diferentes tamanhos após o processo de criopreservação.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever as principais alterações histológicas encontradas nos fragmentos ovarianos pós criopreservação.
- b) Recomendar um tamanho de fragmento ovariano a ser utilizado no processo de criopreservação ovariana.

#### **4. ARTIGO EM INGLÊS**

## **The effects of different fragment sizes on the outcome of ovarian tissue cryopreservation**

Authors:

Ferreira M\*, Bos-Mikich A, Frantz G, Oliveira NP, Frantz N, Rodrigues JL, Jeckel-Neto EA, Brunetto AL, Schwartzmann G

Performing site:

Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;

Veterinary School (UFRGS), Porto Alegre, Brasil;

Nilo Frantz Assisted Reproduction Clinic, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* To whom correspondence should be addressed:

Rua Silva Jardim, 449/601

Cep: 90450-071

Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: marcef@terra.com.br

Phones:+ 55 51 99610906

+ 55 51 33353198

#### 4.1 ABSTRACT

**Aims of the study:** To assess the effect of different tissue sizes on the morphology of primordial and primary follicles after cryopreservation.

**Desing:** Laboratorial controlled experiment. Comparative histological evaluations were performed of fresh control and cryopreserved tissue strips. Two groups were analyzed. In the group of the smaller fragments, the major face measure 2mm and in the group of the larger fragments, all the faces measure more than 2mm.

**Setting:** Veterinary School of the Federal University of Rio Grande do Sul and Nilo Frantz Assisted Reproduction Clinic, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Animal (s):** One ovary from a Hereford cow.

**Main results:** The percentages of normal follicles in large ovarian fragments cut into 2mm and >2mm slices were 56% and 34%, respectively. The relative risks to obtain normal follicles in the 2mm and >2mm strips after cryopreservation were 0.63 and 0.47, respectively. The comparison of the two relative risks shows significantly (heterogeneity qui-square  $p=0.022$ ) that the effect of freezing on reducing success rate was higher in large tissue fragments that are cut >2mm.

**Conclusion(s):** The present study shows that there is an increased risk of damage to primary and primordial follicles when the cryopreserved fragment has all its measures larger than 2mm.

**Key-words:** *cryopreservation/ovary/ovarian/ fragments*

## 4.2 INTROUCTION

Survival rates for cancers that occur in young girls and women of reproductive age have improved dramatically in the last years. It was estimated that in 2010, one in 250 adults will be a survivor of childhood cancer (1). The five-year survival in the period 1971-1975 of 33% for all leukaemias diagnosed in children has improved to nearly 80% between 1986-1990 (2). However, the treatment is associated long-term effects, as severe depletion of the follicular store and premature menopause. Therefore, preservation of fertility in these women has become a relevant concern. Histological studies on ovarian sections that have been exposed to cytotoxic drugs have shown a spectrum of alterations ranging from decreased numbers of follicles to absence of follicles and fibrosis (3). Radiotherapy has also adverse effects on ovarian function, the degree and persistence of the damage depending on the dose, irradiation field and patient's age (4). The estimated dose at which half of the follicles are lost in humans ( $LD_{50}$ ) is 4 Gy (5).

Several potential options are available to preserve the fertility of these patients. Pharmacologic protection, such as the use of GnRH agonist (6) and apoptotic inhibitors (7) are promising, however more studies are needed before a wide and consensual use of these approaches becomes reality. Surgical ovarian transposition (8) may reduce the damage caused by ionizing irradiation, however it does not protect the ovaries against damage caused by systemic chemotherapy. Embryo cryopreservation is a well known procedure showing reasonable rates (9,10) of pregnancy after transfer and oocyte cryopreservation has shown a steady progress in terms of fertilization and pregnancies mainly due to the use of new freezing protocols (11,12). However, both procedures involve ovarian stimulation for oocyte collection, a procedure that takes approximately four weeks of stimulation, a time that may be too long for starting treatment of most malignancies. Ovarian tissue cryopreservation is a new experimental

procedure, which may be a feasible option to preserve fertility in prepubertal girls and women which can not wait to undergo ovarian stimulation.

The first studies on ovarian cryopreservation appeared during the 1950s (13,14). In the following 30 years the technique was nearly abandoned due to technical difficulties such as unavailability of modern cryoprotectants and automated cryopreservation machines. However, there was a new interest on the technique in the 1990s, when the potential clinical use of this technology in assisted reproduction was acknowledged. Work on animal models showed the effectiveness of the cryopreservation and transplantation of ovarian tissue in several species, such as live young born in sheep (15,16), mouse (17,18), rat (19) and monkey (20). In humans, ovulation and corpora luteum formation were achieved after xenografting (21). Furthermore, restoration of ovarian function (22,23), ovulation (24), embryo formation (25) and more recently, the first live birth were reported after autotransplantation of cryopreserved ovarian strips (26).

Cryopreservation of ovarian tissue is usually performed using small strips of tissue, which after thawing could be used in *in vitro* follicle maturation (27,28), xenografting (21) or orthotopic and heterotopic autotransplantation (22,23). Recently, studies performed on the freezing of intact ovaries (29-34) showed encouraging results, but whole organs cryopreservation is still a challenging procedure particularly due to the difficulties in the permeation of cryopreservation agents (CPA). The literature review shows that the common characteristic among all studies on ovarian fragments cryopreservation is that strips have to have at least one of its measures of 2mm or less. The other two measures vary considerably, which can be partially explained by the individual characteristics of each study. Ovaries from rodents are small and sheep and pig ovaries are smaller than humans. The variability in measures also occurs due to the different aims of the studies. Several researches were performed using ovarian fragments for histologic analysis after thawing to assess follicular viability (35),

cryoprotectant penetration (36), and for *in vivo* experiments of xenografting and autotransplantation of frozen-thawed ovarian strips (22,23,24). The variability in the size of the ovarian tissue may be explained by one of the reasons presented above. However, the reason for having one 2mm or less measure may rely on the fact that larger fragments would not allow an appropriate penetration of the cryoprotectant, which would result in a poor protection against tissue and cellular injury caused by cryopreservation (37).

The handling of small tissue pieces measuring 0.3mm (38), 0.5mm (39), 1mm (40,41) or 2mm (22,24) may be very hard. The removal of small fragments is more time consuming, the ovary is more manipulated and there is an increased risk of damage to the cortical area, where most primary and primordial follicles are found. Also, there may be necessary the use of or sight magnification (42,43). The collection and freezing of larger fragments would facilitate manipulation, the procedure could be done quicker and with less damage to the tissue. Further, larger pieces would contain more follicles per area (44).

Despite the above mentioned advantages of manipulating larger pieces of ovarian tissue, difficulties exist for the cryoprotectant to penetrate the tissue when slices are thicker. The question is: how much an ovarian fragment is damaged by cryopreservation, when it has all its measures larger than 2mm? Although widely reported that fragments should have one measure of 2mm or less (37,45) and reports have shown successful results in terms of follicular viability after thawing pieces that size, to our knowledge there is no experimental study to investigate how freezing and thawing affects follicular morphology on large tissue samples.

The present study was designed to evaluate the effects of cryopreservation on ovarian tissue slices cut into fragments larger than usual, keeping one of the measures of 2mm or making all measures larger than 2mm. Histological evaluations were

performed of cryopreserved bovine ovarian fragments measuring 10 x 3 x 2mm and larger fragments measuring 10 x 3 x 4 mm.

## **4.3 METHODS**

### **4.3.1 Source of ovaries and tissue preparation**

One ovary from one Hereford cow aged between four and six years old was used. The ovary was collected at the Zimmer abattoir located in the town of Sapiranga, Brazil. It was transported to the laboratory at the Nilo Frantz Assisted Reproduction Centre, Brazil, in saline solution at 4°C. In the laboratory, the ovary was sliced approximately 3 hours after the animal death.

Initially, the whole ovary was split into two halves and most of the underlying stroma of each half-ovary was removed. A tissue chopper specially designed for this purpose, which consisted of a set of parallel razor blades tightly hold together at a fixed distance of 2mm or 4mm from each other, was slided over the cortical surface of the ovary. Thus, we obtained slices of ovarian tissue of about 4cm long (approximate length of the bovine ovary) and with the width of 2mm and 4mm according to the previous determined distance between the razor blades. The strips were then cut at each 10mm interval using a scalpel. The third measure, the height, corresponding to the distance between the cortex and the stroma, was also cut using a scalpel into 3mm strips for both groups. All measures were confirmed by using a Varnier-Caliper (0-150mm).

Two groups were created: in the first group the fragments measured 10mm (length) x 3mm (height) x 2 mm (width), which was named the 2mm group and another group in which fragments were larger, measuring 10 mm (length) x 3mm (height) x 4mm (width), which was named the more than 2mm (>2mm) group. Fresh fragments from both groups were fixed immediately after trimming in Bouin's fixative and were used as controls. The remaining pieces of tissue from both groups were frozen.

### **4.3.2 Freezing**

The freezing protocol was similar to that described by Lucci and colleagues (46) for cryopreservation of bovine ovarian tissue. The cryoprotectant solution consisted of 1.5M propanediol (PROH) (Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) prepared in Medium 199 (supplemented with HEPES and Hank's salts; Cultilab, Campinas, Brazil) containing 0.1M sucrose (S-188, Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) and 0.4% bovine serum albumine (BSA, Sigma Chemical, St. Louis MO, USA).

The ovarian cortex pieces were placed into 1.2ml cryogenic vials (Corning) containing 1ml of the cryoprotectant solution. Each vial received one piece of tissue. Vials were equilibrated at 20°C for 20 minutes and then cooled from 20°C to -7°C at 1°C/minute and held at this temperature for 10 minutes. At this point vials were manually seeded and then cooled at 0.3°C/minute to -30°C. The vials were plunged into liquid nitrogen at -196°C and stored for three weeks before thawing.

### **4.3.3 Thawing**

Vials from both experimental groups were warmed in air at room temperature (approximately 25°C) for 30 seconds and then immersed in water at 38°C until the ice melted. Tissues were removed from the vials and washed three times (5 minutes each), twice in M 199+ containing decreasing concentrations of the cryoprotectant (0.75M and 0.375M) and once in pure M199+. After thawing fragments were fixed in Boiun's fixative for histology. Slides were stained with haematoxylin and eosin.

#### 4.3.4 Histological evaluation

Pre-antral follicles were classified as primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) and primary (one layer of cuboidal cells around the oocyte). Follicles were classified as normal when they presented a round oocyte with a well-delimited nucleus with uncondensed chromatin, even homogeneous cytoplasm, surrounded by a complete layer of cuboidal or flattened cells closely attached to the oocyte. Abnormal follicles presented an oocyte with picnotic nucleus, uneven or shrunk cytoplasm and detachment of the follicle from the surrounding stroma.

Tissue samples were sectioned at 5 $\mu$ m thickness. Serial sections were cut at 80 $\mu$ m intervals in the 2mm group and at 160 $\mu$ m intervals in the >2mm group to allow for the examination of the whole tissue fragment. The intervals between sections were chosen due to results obtained in a previous study, where we observed that the mean diameter of the primordial follicles was  $39.7 \pm 4.0\mu\text{m}$  and of the primary follicles was  $58 \pm 10\mu\text{m}$ .

Only primordial and primary follicles were analyzed. Secondary and antral follicles were not included in the analysis because they are larger and appear in reduced numbers.

In order to gather more information on primordial and primary follicles, structures that did not present the nucleus of the oocyte were also classified according to the morphological intactness of their cytoplasm and surrounding follicular cells.

Examination of the slides was made in a Nikon Alphaphoto 2y s2 (Japan) microscope using a 400x objective, by the same observer at blind, after randomization of the slides.

#### 4.4 STATISTICAL ANALYSIS

A laboratory controlled experiment was performed. Data were described as success proportions stratified according to specimen size and cryopreservation. At first, proportions were calculated by Pearson's Chi-square. The frequency of normal follicles in the fresh control and cryopreserved tissues was compared between the 2mm- and >2mm groups by the relative-risk heterogeneity Mantel-Haenszel Chi-square. Data were analyzed by the P.E.P.I program (Programs for Epidemiologists) version 4.0. Values were considered statistically significant for  $\alpha = 0.05$ .

## 4.5 RESULTS

A total of 1618 follicles were analyzed, of which 839 presented the oocyte and its nucleus (complete follicles, Figure 4.1A) and 779 in which the nucleus of the oocyte was not evident (incomplete follicles, figure 4.1B).

The percentages of morphologically normal complete follicles in controls and after cryopreservation for the 2mm and >2mm groups are shown in Table 4.1. There was a significant decrease in the rates of normal follicular morphology in both fragment groups after cryopreservation. A significantly lower percentage of normal follicles was also observed in the >2mm group (34%) compared to the 2mm group (56%) after cryopreservation ( $p < 0.001$ ). Most frozen-thawed follicles abnormally looking follicles showed shrunken cytoplasm of the oocyte (Figure 4.1C ) in both groups of fragment sizes (Tables 4.2 and 4.3). Our results showed that the size of the fragment by itself has also contributed to reduce the quality of normal follicles. The control group of fragments 2mm showed 89% of normal follicles, whereas follicles which were >2mm presented 73% of normal follicles ( $p < 0.001$ ).

In the group of follicles that did not present the nucleus of the oocyte, findings were very similar to those described for the analysis of complete follicles. After cryopreservation, there was a significant reduction in normal follicle morphology between the two fragment size groups: 64% and 32% of follicles showed normal morphology in the 2-mm and >2mm groups, respectively ( $p < 0.01$ ) (Table 4.4). The most frequent change was the shrunken cytoplasm of the oocyte (95%) . A significant decrease was also found in the rate of morphologically normal follicles in controls cut into larger slices: 88% and 77% of follicles showed normal morphology in the 2mm and >2mm groups, respectively ( $p < 0.001$ ).

In the group of 2mm fragments, 89% and 56% of normal follicle morphology was obtained in control and cryopreserved fragments, respectively, and the relative risk

to maintain normal follicular morphology after freezing and thawing was 0.63. On the other hand, 73% and 34% of normal follicles were observed in the group of >2mm control and cryopreserved fragments, respectively, and the relative risk to maintain normal follicular morphology after freezing and thawing was 0.47. The comparison of the two relative risks (heterogeneity Chi-square  $p=0.022$ ) showed statistically significant differences on the effect that cryopreservation has in reducing the success rate, which was higher in ovarian fragments cut into large slices >2mm (Figure 4.2). In the second second group of follicles, where incomplete follicles were analyzed, the relative risk to preserve normal follicular morphology after cryopreservation was 0.72 and 0.43 for the 2mm and >2mm fragments, respectively. These two relative risks analyzed by the heterogeneity Chi-square also showed a significant reduction in the percentage of morphologically normal follicles in >2mm fragments ( $p<0,001$ ) (Figure 4.3). Overall, the effect of freezing and thawing on the reduction of the rate of morphologically normal follicles was more accentuated in the >2mm samples of ovarian tissue.

**Table 4.1.**

**Total numbers and percentages of normal follicles in 2mm and >2mm fragments, comparison between controls (not treated) and cryopreserved groups (treated): analysis of complete follicles**

	2mm			>2mm		
	n	Normal	%	n	Normal	%
Control	169	150	89	273	201	73
Treated	219	123	56*	178	62	34 <sup>*,**</sup>

\*p < 0,001 difference from control

\*\*p < 0,001 difference from 2mm treated

**Table 4.2**

**Most frequent alterations found in controls and cryopreserved (treated) 2mm fragments: analysis of complete follicles**

---

	Total	Shrunken cytoplasm	%	picnotic nucleus	%	Others*	%
Controls	19	4	21	8	42	7	36
Treated	96	54	56	26	27	16	17

---

\*Others alterations : heterogeneous ooplasm, incomplete basal membrane.

**Table 4.3**

**Most frequent alterations found in controls and cryopreserved (treated) >2mm fragments: analysis of complete follicles**

	Total	Shrunken cytoplasm	%	picnótico nucleus	%	Others*	%
Controls	72	30	41	29	40	13	19
Treated	116	99	85	6	5	11	10

\* Others alterations: heterogeneous ooplasm, incomplete basal membrane

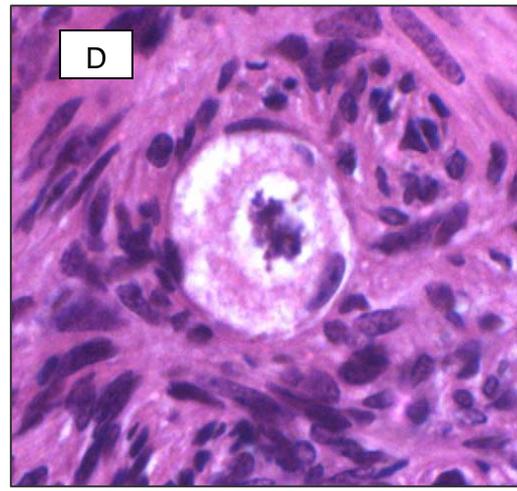
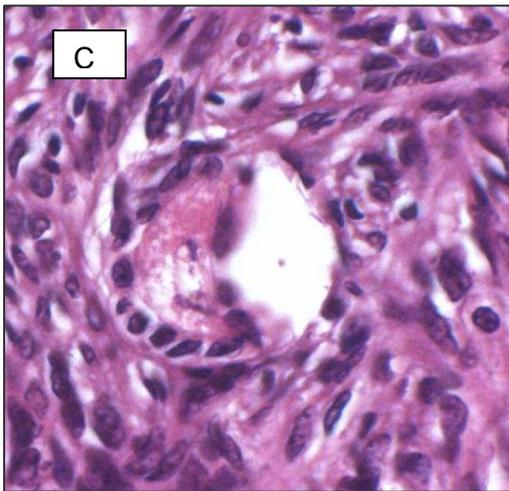
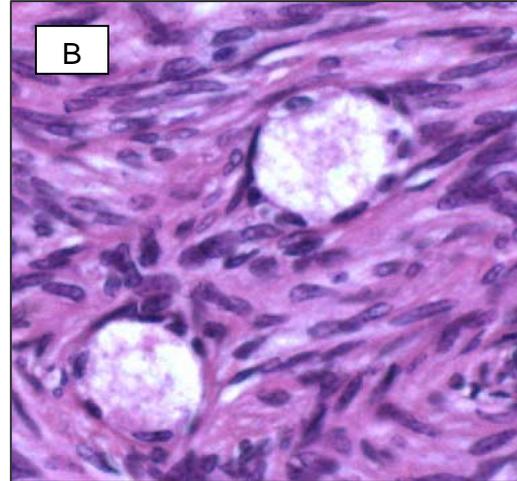
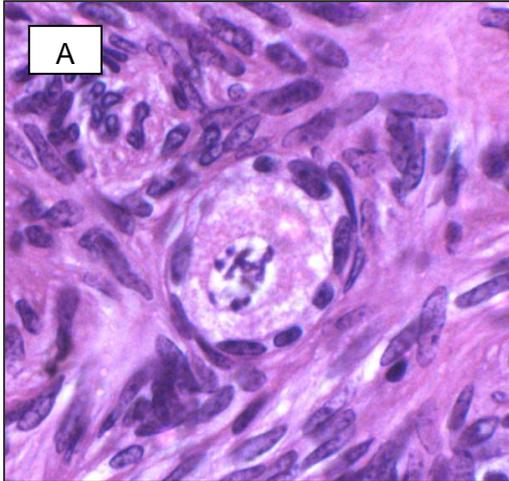
**Table 4.4**

**Total numbers and percentages of normal follicles in 2mm and >2mm fragments, comparison between controls (not treated) and cryopreserved groups (treated): analysis of incomplete follicles**

	2mm			>2mm		
	n	Normal	%	n	Normal	%
Controls	156	138	88	211	162	77
Treated	245	156	64*	167	54	32*, **

\*p< 0,001 difference from control

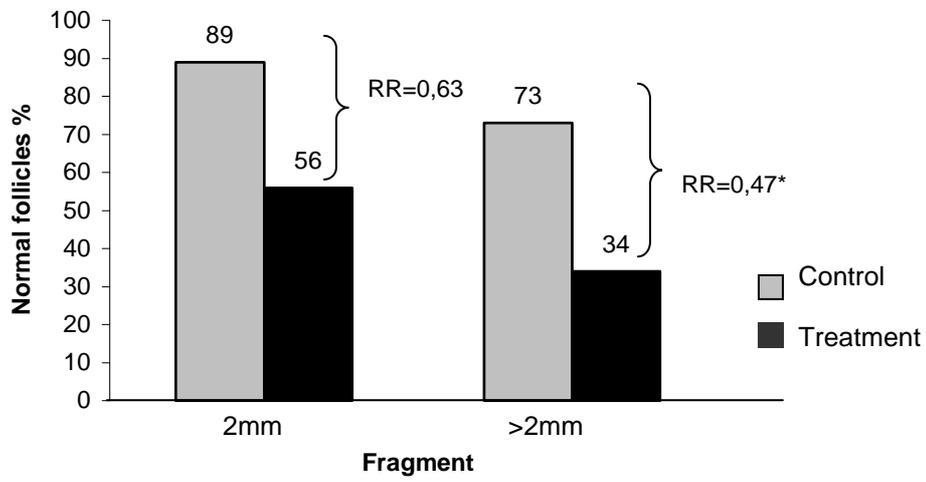
\*\*p< 0,001 difference from treated 2mm



**Figure 4.1**

**Histological section of ovarian tissue stained with haematoxylin and eosin (200X)**

- (A) Primordial follicle morphologically normal.**
- (B) Primordial follicle incomplete morphologically normal.**
- (C) Abnormal follicle and oocyte showing shrunken cytoplasm and separation of granulosa cells from the basal membrane**
- (D) Abnormal oocyte with picnotic nucleus.**

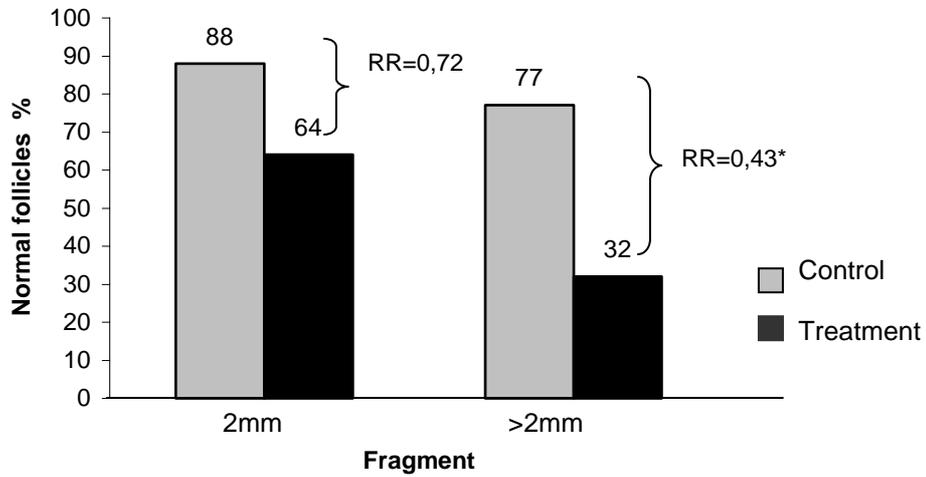


**Figure 4.2**

**Normal follicular rates in controls and cryopreserved (treated) groups of 2mm and >2mm fragments: analysis of complete follicles**

**RR: relative risk to be successful (follicular preservation)**

**\*Significantly higher reduction in success rates (p=0.022)**



**Figure 4.3**

**Normal follicular rates in controls and cryopreserved (treated) groups of 2mm and >2mm fragments: analysis of incomplete follicles**

RR: Relative risk to be successful (follicular preservation)

\*Significantly higher reduction in success rates ( $p < 0.001$ )

## 4.6 Discussion

The present study shows that, despite the advantages that may exist on the cryopreservation of large pieces of ovarian tissue, there is a significant loss in terms of normal follicular morphology when the fragment measures are all larger than 2mm. Keeping the same length of 10mm and thickness of 3mm, we observed a significant decrease in the rate of morphologically normal follicles after thawing in tissue pieces cut >2mm compared to those cut 2mm (34% and 56%, respectively).

A few previous studies reported advantages on the use of large pieces of ovarian tissue for cryopreservation and transplantation. Comparing the effects of two different tissue sizes on the cryopreservation outcome, Jeremias and colleagues (44) compared two fragment sizes and concluded that preserving larger pieces of tissue (5 x 1 x 1 mm<sup>3</sup>) is preferable, they concluded that handling and gain in terms of follicular population are better using the larger samples. It is well known the role that an appropriate cryoprotectant penetration has on the success of the cryopreservation procedure.

The bovine ovary, similar to the humans, is a large and fibrous organ. It has been suggested that the cortex of the human ovary is best cut into small fragments 1-2mm-thick, to allow an optimum penetration of the cryoprotectant into the sample and the permeation rate depends on the amount of tissue that the cryoprotectants have to penetrate by diffusion (37,45). Our data on bovine ovarian cortex cut into thicker and wider fragments than those usually used for humans showed that it is possible to obtain a reasonable follicular survival rate using larger tissue samples, provided that one of the measures is maintained small (2mm or less). As mentioned before, the main advantages of the use of large samples of ovarian tissue are the presence of larger

numbers of follicles available and practicality to cut and to handle the tissue, avoiding the risks of extensive damage while dissecting the cortex from the stroma.

Previous reports on the cryopreservation of ovarian tissue that used what could be considered as large samples, always maintained one measure of 2mm or smaller. These studies demonstrated the feasibility of the technique by the restoration of ovarian function, fertilization, embryo development and gestation in humans and sheep (15,16,25,26).

We have chosen the bovine ovarian tissue for our experiments, because it closely resembles those of humans and our data have shown that the cryopreservation outcome is less successful if samples are cut into strips presenting all measures larger than 2mm, perhaps due to cryoprotectant permeation difficulties in larger fragments of a tissue sample that presents a considerable cellular heterogeneity.

Recently, a study to evaluate the effect of the thickness of ovarian samples was performed using fresh ewe ovarian tissue for transplantation. The ovary was cut into large (more than 2cm in diameter) fragments measuring 2mm and 3mm in thickness (48). No statistically significant difference was observed in terms of follicle counts, microvessel density and viability after transplantation between the 2mm and 3mm-thick tissue slices. However, according to our results and as mentioned before, it is likely that the thicker fragments in such a large cortical area would present a higher rate of follicular loss after cryopreservation, due to a sub-optimal cryoprotectant permeation.

The relative risk for follicle preservation indicates in a statistically significant fashion, that tissue sections that present one 2mm measure are less likely to be damaged by freezing and thawing when compared to fragments that present all measures larger than 2mm. The decrease in the rate of morphologically normal follicles was further confirmed by the analysis of incomplete follicles, whose oocytes did not show their nucleus at the section.

Our findings on the rate of morphologically normal follicles could be compared to those reported by Lucci and colleagues (46) using bovine ovarian tissue and propanediol as cryoprotectant. The authors observed a higher percentage of morphologically normal follicles after cryopreservation, possibly because they used tissue slices thinner than ours (1mm vs 3mm-thick). We do not believe that increasing permeation time would increase success rates after freezing and thawing in larger pieces of tissue, since a prolonged exposure to the cryoprotectants at temperatures above 0°C affects the oocyte cytoskeleton and may be toxic (48). It is well known that the diffusion of cryoprotectants in multicellular tissues is slower than in isolated cells, which means that the equilibrium should be long enough to guarantee an adequate permeation into the center of the tissue. However, in doing so, we may be damaging the superficial cells exposed to toxic levels of cryoprotectant over an excessive long period of equilibrium.

It is worth mentioning our observation that there was a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) in the rate of morphologically normal follicles between controls cut into 2mm strips (89%) and controls cut into >2mm strips (73%) and, because of this finding, the size of the fragments ended up having an impact on results with a more compromising effect on larger fragments. There is no reason, to our understanding, to why the size of the fragment would by itself affect follicular preservation. Taking into account that all fragments were from a single ovary, were cut by the same person, frozen and thawed together, analyzed by the same examiner and the analysis was blind, we believe that the histological fixation may have negatively affected the larger fragments. Considering that our aim was to evaluate the damage caused by the permeation difficulty of cryoprotectors and to remove the influence of the confusion bias caused by the size of the fragment, we compared the relative risks to reduce the success (normal follicles after cryopreservation) between the two groups of fragments by the heterogeneity Chi-square. We can assert that the relative risk to preserve

follicles shows in a statistically significant fashion, that fragments with one of the measures of 2mm are less likely to undergo damage due to freezing and thawing when compared to fragments with all measures larger than 2mm. The reduction in preservation rates of normal follicles after cryopreservation was significantly higher in fragments with all measures larger than 2mm, a finding observed in the analysis of both, the complete ( $p=0.002$ ) and the incomplete follicles ( $p<0.001$ ).

The present study specifically investigated the effect of two tissue sizes on the cryopreservation outcome, although previous authors have mentioned the differential effect of cryopreservation on ovarian tissue, due to the dimension of the fragment. Newton and colleagues (36) reported that the discrepancy in the percentage of equilibration for the same time, between their results and those from Thomas and colleagues (49) was most probably due to the greater thickness of ovarian tissue and lower equilibration temperatures used by the last authors. In a later study, Bedaiwy and colleagues (33) reported that in frozen thawed intact sheep ovaries, cryopreserved by perfusion no signs of necrosis was detected in the 1-mm cortex rim, however necrosis of most of the growing follicles was evident, denoting that they did not survive the freeze-thaw process and the ischemia-reperfusion injury.

The freezing of ovarian tissue represents one option to preserve the fertility in cancer patients. It is still an experimental procedure that has shown encouraging progresses over the past 10-years. It is well known that more research is needed before the technique can routinely be used in human reproductive medicine. At present, the majority of investigators propose the use of a slow-freezing protocol using dimethylsulfoxide or propanediol as cryoprotectants and tissue slices not more than 2mm-thick with satisfactory success rates in terms of follicular survival. It seems that, presently, ischemia during tissue revascularization is the major limiting factor affecting follicular survival post-grafting (45). The damage is more severe in large tissue slices of

ovarian autografts, because tissues do not have a vascular supply and depend on oxygen and nutrients diffusion before neovascularization is completed.

In conclusion, our study showed that the cryopreservation of large ovarian cortical fragments is feasible, provided that the sample is cut into slices with one of its measures not larger than 2mm. The results agree with previous reports on the cryopreservation of ovarian cortex and represent one more contribution to the scarcely available information on the factors that affect the success of the procedure.

## 4.7 REFERENCES

1. Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:29–33.
2. Mc Vie JG. Cancer treatment: the last 25 years. *Cancer Treat Rev* 1999;25:323-31.
3. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med* 1973;289:1159–62.
4. Meirow, D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility on female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hematological neoplasia and other cancers. *Leuk Lymphoma* 1999;33:65-76.
5. Wallace WHB, Shalet SM, Hendry J H, e cols. Ovarian failure following ovarian irradiation in childhood. The radiosensitivity of human oocyte. *Br Radiol* 1989; 62:995-98.
6. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum Reprod* 1996;11:1620 –26.
7. Tilly JL. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol Lett* 1998;102:497–01.
8. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril* 2000;74:743–48.
9. American Society for Reproductive Medicine e Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril*. 2004;81:1207–20.
10. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) The European IVF-monitoring programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE *Hum Reprod* 2005;20:1158-76.
11. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411–16.
12. Chen S, Lien Y, Chen H, Chang L, Tsai Y, Yang Y. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod*. 2005;24:1-6.

13. Parkes, AS, Smith AU. Preservation of ovarian tissue at  $-79^{\circ}$  C for transplantation. *Acta Endocrinol* 1954;17:313-20.
14. Danesly R. Inmaturerat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol* 1954;11:197-00.
15. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196^{\circ}$  C. *Hum Reprod* 1994;9:597-03.
16. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002;77:403-08.
17. Sztejn J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biol Reprod* 1998;58:1071-74.
18. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 2000;15:1300-04.
19. Aubard Y, Newton H, Scheffer G, Gosden R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;79:83-7.
20. Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, Wolf DP. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature* 2004;428:137-38.
21. Gook D, Edgar DH, Borg J, Archer J, Lutjen PJ, McBain JC. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2003;18:1772-81.
22. Radford JA., Lieberman BA , Brison R., Smith AR., Critchlow JD., Russel SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M., Gosden R *et. al.* Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high dose chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2001;357:1172-75.
23. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4489 – 94.
24. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;342:1919.
25. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837-40.
26. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet j, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10.

27. Eppig J, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197–07.
28. Picton HM, Gosden RG. *In vitro* growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000;166:27–35.
29. Revel A, Elami A, Bor A, Yavin S, Natan Y, AravA. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertil Steril* 2004;82:1714-15.
30. Bedaiwy, M; Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein M, Siemianow M., Biscotti C, Falcone T. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2003;79:594-02.
31. Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002;415:385.
32. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004;82:1390-94.
33. Bedaiwy M, Falcone T. Ovarian tissue banking for cancer patients: Reduction of post-transplantation ischaemic injury: intact ovary freezing and transplantation. *Hum Reprod* 2004;19:1242-44.
34. Yin H, Wang X, Kim S, Chen H, Tan S, Gosden R. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003;18:1165-72.
35. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996;11:1487–91.
36. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13:376–80.
37. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications. *Hum Rep Update* 2001;7:526-34.
38. Hovatta O, Sylie R, Krausz T, Abir R, Margara R. Cryopreservation of human tissue using dimethylsulfoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Rep* 1996;11:1268-72.
39. Gook D, McCully BA, Edgar DH, McBain JC. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2001;16:417-22.
40. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen thwed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 2000;74: 122-29.

41. Poirot C, Vacher-Lavenu M. Human ovarian tissue cryopreservation: indication and feasibility. *Hum Reprod* 2002;17:1447-52.
42. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997;67:481-86.
43. Hreinsson J, Zhang P, Swahn M, Hultenby K, Hovatta O. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Hum Reprod* 2003;18:2420-28.
44. Jeremias E, Bedaiwy M, Nelson D, Biscotti C, Falcone T. Assessment of tissue injury in cryopreserved ovarian tissue. *Fertil Steril* 2003; 79: 651-56.
45. Falcone T, Marjan Attaran M, Bedaiwy, M, Goldberg J. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril* 2004;81:243-57.
46. Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bao SN. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* 2004;61:1101-14.
47. Denschlag D, Knobloch C, Kockrow A, Baessler A, Goebel H, Wellens E, Haberstroh J, Tempfer C, Keck C. Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue in sheep. *Fertil Steril* 2005;83:501-03.
48. Bos-Mikich A, Whittingham DG. Analysis of the chromosome complement of frozen-thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1995;42:254-60.
49. Thomas N, Busza A, Cooper A, et cols. Measurement of permeating levels of cryoprotectant during ovarian tissue cryopreservation using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in human and porcine ovaries. *Cryoletters* 1997;18:179-84.

## **5. ARTIGO EM PORTUGUÊS**

## **Análises histológicas comparativas entre diferentes tamanhos de fragmentos ovarianos criopreservados**

Autores:

Ferreira M, Bos-Mikich A, Frantz G, Oliveira NP, Frantz N, Rodrigues JL, Jeckel-Neto EA, Brunetto AL, Schwartzmann G

Local de Realização:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Centro de Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, Brasil

Endereço para correspondência:

Marcelo Oliveira Ferreira

Rua Silva Jardim, 449/601

Cep: 90450-071

Porto Alegre, RS, Brasil

E-mail: marcef@terra.com.br

Fones: 51 99610906

51 33353198

## 5.1 RESUMO

**Objetivo:** Investigar a influência do tamanho dos fragmentos ovarianos na preservação dos folículos primordiais e primários pós-congelamento.

**Desenho:** Experimento laboratorial controlado. Foram realizadas análises histológicas comparativas em grupos controle e pós-congelamento de fragmentos de ovários bovinos. No grupo dos fragmentos menores, a menor das medidas era de 2mm e no grupo dos fragmentos maiores, todas as medidas eram maiores de 2mm.

**Local de Realização:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Veterinária da UFRGS e Centro de Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Animais:** Foi utilizado um ovário de vaca raça Hereford.

**Resultados Principais:** Nos fragmentos congelados com medida de 2mm, e com medidas maiores de 2mm, a percentagem de folículos normais foi de 56% e 34%, respectivamente. O risco relativo para a manutenção dos folículos normais pós-congelamento nos fragmentos com de 2mm e maiores de 2mm foi de 0,63 e de 0,47, respectivamente. A comparação desses dois riscos relativos mostrou, de forma significativa (qui-quadrado de heterogeneidade  $p=0,022$ ), que o impacto do congelamento na redução das taxas de sucesso foi maior nos fragmentos com espessuras maiores de 2mm.

**Conclusões principais:** Este estudo mostrou que há um comprometimento maior na preservação folicular em fragmentos ovarianos criopreservados com espessuras maiores de 2mm.

**Palavras-chave:** Congelamento, criopreservação, ovariano, ovário, fragmento

## 5.2 INTRODUÇÃO

As taxas de sobrevivência em crianças e em mulheres em idade reprodutiva com câncer aumentaram drasticamente nos últimos anos e, devido aos efeitos colaterais a longo prazo dos tratamentos, é de vital importância que nos preocupemos com o futuro reprodutivo dessas pacientes. Estima-se que no ano 2010 a proporção, na população adulta, de sobreviventes de câncer na infância se aproximará de 1 em 250 (1). A sobrevivência em 5 anos para todas as leucemias diagnosticadas na infância que, no período de 1971 a 1975 era de 33%, aumentou para aproximadamente 80% no período de 1986 a 1990 (2).

Os tratamentos, no entanto, estão associados à significativa morbidade do ponto de vista reprodutivo, e a toxicidade ovariana é um importante e comum efeito colateral a longo prazo da quimioterapia e da radioterapia curativas (3). Estudos histológicos de ovários que foram expostos a drogas citotóxicas mostraram significativas alterações, desde a diminuição do número de folículos à ausência destes e à fibrose ovariana (4). As radiações ionizantes também têm efeitos adversos na função gonadal e o grau e persistência do dano dependem da dose, do campo irradiado e da idade da paciente (5). A dose estimada para a perda da metade dos folículos nos humanos ( $LD_{50}$ ) é de 4 Gy (6).

Várias opções potenciais são disponíveis para preservar a fertilidade dessas pacientes. A proteção farmacológica, com o uso de análogos do GnRH (7) e inibidores da apoptose celular (8), pode ser viável, porém mais estudos são necessários para a aplicação plena e consensual desses tratamentos. A cirurgia de transposição dos ovários (9) pode reduzir os danos causados pela radioterapia, mas não protege dos danos sistêmicos da quimioterapia. A criopreservação de embriões é uma técnica consagrada, com taxas aceitáveis de gestação (10,11), e a criopreservação de oócitos tem tido uma grande evolução recentemente, especialmente com o uso de novos

protocolos (12,13); porém, nestas duas técnicas a coleta de oócitos maduros requer estimulação ovariana, o que demanda um período de tempo de aproximadamente 4 semanas e, infelizmente, na maioria das neoplasias malignas, não é possível aguardar este tempo antes de começar o tratamento. Para as pacientes pré-púberes e para aquelas que necessitam quimioterapia imediata, a criopreservação de tecido ovariano é uma alternativa possível para a preservação da fertilidade (14).

O conceito de transplante ovariano não é novo; os pioneiros trabalhos foram realizados nos anos 50 (15, 16). Nos 30 anos seguintes, não houve muito progresso nesse campo; porém, nos anos 90, o reconhecimento do potencial clínico da aplicação dessa tecnologia em medicina reprodutiva, reacendeu o interesse em congelamento de ovário. Em animais, a partir do transplante de tecido ovariano criopreservado, houve progressos importantes em várias espécies, como nascimentos em ovelha (17, 18), em camundongo (19, 20) e em rato (21). Em macaco, houve nascimento a partir de transplante ovariano heterotópico de ovário fresco (22). Em humanos, já se obteve ovulação com formação de corpo lúteo com xenotransplante (23), e em autotransplante progredimos desde a evidência de função ovariana (14, 24), de ovulação (25), de formação de embrião (26) até, recentemente, o primeiro nascimento a partir do transplante de tecido ovariano que havia sido congelado (27).

A criopreservação é feita predominantemente com pequenos fragmentos que, após o descongelamento, podem ser utilizados na maturação *in vitro* dos folículos (28, 29), no xenotransplante (23) ou no autotransplante, tanto autotópico (14, 24), quanto heterotópico (25). Estudos foram realizados com o congelamento do ovário intacto (30-35) mas, mesmo com resultados encorajadores, o congelamento de órgãos inteiros é ainda um desafio, especialmente pela dificuldade técnica em proceder a reanastomose vascular e de criopreservar um órgão inteiro (33).

Pesquisando sobre os fragmentos que são criopreservados, encontramos somente uma característica em comum: ter pelo menos uma medida igual ou menor

que 2mm. As outras duas medidas variam bastante, fato que pode ser explicado pelas diferentes características de cada estudo. Fragmentos de ovários de roedores são necessariamente pequenos, assim como os de ovelhas e suínos são menores que os de humanos e bovinos. A variação de medidas também se dá em função do objetivo de cada estudo. Diferentes pesquisas são feitas com fragmentos ovarianos, como análises histológicas pós-congelamento para verificar a viabilidade folicular (36) e a permeabilidade dos crioprotetores (37) ou, ainda, experimentos in vivo, como xenotransplante (23), ou autotransplante (14, 24, 25).

A heterogeneidade nos tamanhos dos fragmentos pode ser explicada pelo que descrevemos acima; porém, a justificativa para a única característica comum, ter 2mm ou menos em pelo menos uma medida é que, em tecidos mais espessos, pode não haver a adequada penetração do crioprotetor e, como consequência, insuficiente proteção aos danos celulares e teciduais causados pelo congelamento (38). Posteriormente, quando reimplantados, fragmentos mais espessos também têm maior dificuldade de serem adequadamente perfundidos, causando um grau maior de isquemia no tecido enxertado.

O manejo de tecido com diminutas medidas como 0,3mm (39), 0,5mm (40), 1mm (41, 42) ou 2mm (14, 25), pode trazer algumas dificuldades. A retirada de pequenos fragmentos demanda um tempo maior, com mais manipulação do ovário, e também aumenta a possibilidade de dano na camada cortical, onde se localizam os folículos. Pode ainda ser necessária a magnificação da visão (43, 44). Para retirarmos e congelarmos fragmentos maiores, não é necessária extrema destreza, e o procedimento pode ser realizado mais rapidamente e com menos riscos. Outra vantagem fundamental é a existência de uma maior quantidade de folículos disponíveis (45).

Mesmo havendo vantagens na retirada de fragmentos maiores, sabemos da dificuldade de penetração dos crioprotetores em tecidos mais espessos. A grande

dúvida é: o quanto é danificado pelo congelamento um fragmento ovariano que tenha mais de 2mm de espessura? E se, por ventura, devido à irregularidade do ovário e pela sua natureza côncava, retirarmos, pelo menos em algumas áreas, tecido com uma espessura de 3mm, por exemplo, estaremos comprometendo o trabalho? Teremos uma criopreservação menos adequada? Apesar de amplamente difundido que os fragmentos devam ter 2mm ou menos (38, 46), e os trabalhos terem demonstrado ótimos resultados em termos de viabilidade com esses fragmentos pequenos (14, 26, 27), no nosso conhecimento, não encontramos na literatura nenhum trabalho que tenha feito estudo comparativo entre fragmentos ovarianos criopreservados com 2mm ou menos, e fragmentos com mais de 2mm.

O presente estudo foi desenhado para avaliar os efeitos do congelamento em tecido ovariano com medidas iguais ou maiores que 2mm. Foram comparadas alterações histológicas encontradas em fragmentos de ovários bovinos com uma das medidas com 2mm (10 x 3 x 2mm), com fragmentos sem nenhuma das medidas com 2mm (10 x 3 x 4mm).

## 5.3 MÉTODO

### 5.3.1 Obtenção dos fragmentos

Foi utilizado um ovário bovino de vaca da raça Hereford, com idade entre 4 e 6 anos, coletado no frigorífico Zimmer, na cidade de Sapiranga, Brasil. O ovário foi transportado até o Centro de Reprodução Humana Nilo Frantz, em Porto Alegre, Brasil, em solução salina a 4° C. Aproximadamente 3h após o abate, iniciou-se a fragmentação do ovário

Inicialmente, dividiu-se ao meio o ovário e, de cada hemi-ovário resultante, retirou-se grande parte da camada medular. Posteriormente, deslizou-se sobre a cortical do hemi-ovário um conjunto de lâminas de barbear paralelas, fixadas com parafusos, com a distância fixa entre elas de 2mm e de 4mm. Dessa maneira, obtivemos tiras de tecido ovariano com aproximadamente 4cm de comprimento (extensão aproximada do ovário bovino), com largura de 2 ou 4mm, conforme distância previamente determinada entre as lâminas. As tiras foram, então, divididas transversalmente com bisturi a cada 10mm, de modo a formar, de cada tira, 3 a 4 fragmentos. A terceira medida, cortada com bisturi, foi a distância entre a córtex e a medular, e foi uniformizada com 3mm em ambos os grupos. Todas as medidas foram confirmadas com paquímetro (Varnier Caliper 0-150mm).

Obtivemos, então, dois grupos: em um grupo os fragmentos mediam 10mm (comprimento) x 3mm (altura) x 2mm (largura da córtex) que denominamos de grupo dos fragmentos com 2mm, e outro grupo, com fragmentos maiores, que mediam 10mm (comprimento) x 3mm (altura) x 4mm (largura da córtex), e denominamos grupo dos fragmentos maiores de 2mm. Alguns fragmentos frescos de ambos os grupos não sofreram nenhum tratamento, apenas foram fixados com o fixador Bouin e,

posteriormente, usados como controles. Cada grupo teve seu controle próprio. Os demais fragmentos de ambos os grupos foram congelados.

### 5.3.2 Congelamento

Foi usado o protocolo descrito por de Lucci e cols. (47). O crioprotetor propanediol (PROH) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) foi preparado na concentração de 1,5M em Meio 199 (M 199) suplementado com HEPES e sais de Hanks, contendo 0,4% de BSA (M 199+) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 0,1M de sacarose (S-188, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA).

Os fragmentos de córtex ovariana foram colocados em criotubos de 1,2ml (Corning) e preenchidos com 1ml da solução crioprotetora. Foi colocado um fragmento em cada tubo. O tempo de equilíbrio dos fragmentos no crioprotetor foi de 20 minutos, na temperatura de 20° C. Os tubos foram congelados na máquina de congelamento programável Planer Kryo 10 Series III, de 20° até -7° na velocidade de 1° C/minuto, e mantido nessa temperatura por 10 minutos (*hold*), quando foi então realizada a indução da formação do gelo (*seeding*) manual. Posteriormente, foram congelados na velocidade de 0,3° C/minuto até -30° C. Após o congelamento, criotubos foram colocados em nitrogênio líquido a -196° C e armazenados por 3 semanas.

### **5.3.3 Descongelamento**

Para o descongelamento, os tubos ficaram em temperatura ambiente por 30 segundos, posteriormente imergidos em banho-maria a 38° C até o gelo ser desfeito. A seguir, os fragmentos foram retirados dos tubos e lavados para a remoção do crioprotetor a partir de duas passagens de 5 minutos cada em M 199+ contendo concentrações decrescentes do crioprotetor (0,75M e 0,375M) e, por fim, também de 5 minutos em M 199+. Após o descongelamento, os fragmentos foram fixados em bouin para o processamento histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

### **5.3.4 Análises histológicas**

Os folículos foram classificados como primordiais, com uma única camada de células planas da granulosa; primários, com uma única camada de células cubóides da granulosa, secundários, com numerosas camadas da granulosa, e antrais, com presença de cavidade. Foram considerados normais os folículos com forma circular ou ovóide, com a lâmina basal completa e presença de oócitos com citoplasma homogêneo e íntegro. Foram definidos como folículos anormais aqueles cujos oócitos apresentavam o núcleo picnótico, o citoplasma retraído, formando um espaço entre o oócito e as células da granulosa, ooplasma não homogêneo, a lâmina basal incompleta. Os cortes histológicos foram realizados com 5 µm de espessura.

Para analisarmos o bloco inteiro, estabelecemos um espaçamento de ~ 80µm no grupo dos fragmentos de 2mm, e de ~160µm no grupo dos fragmentos maiores de 2mm. Esses espaçamentos foram utilizados em função de uma análise prévia ter demonstrado que nos folículos primordiais a média foi de  $39,7 \pm 4,0\mu\text{m}$  e, nos folículos

primários, de  $58 \pm 10\mu\text{m}$  (Anexo 7.1). Dessa forma, tivemos a certeza de que não seriam analisados duas vezes o mesmo folículo.

Foram analisados somente folículos primordiais e primários. Folículos secundários e antrais não foram analisados por serem maiores, e existirem em menor número.

Para obtermos mais informações, analisamos, além dos folículos completos, cujos oócitos apresentavam núcleo e citoplasma, também aqueles em que o corte não foi realizado no plano do núcleo, obtendo, nesses casos, informações apenas do citoplasma.

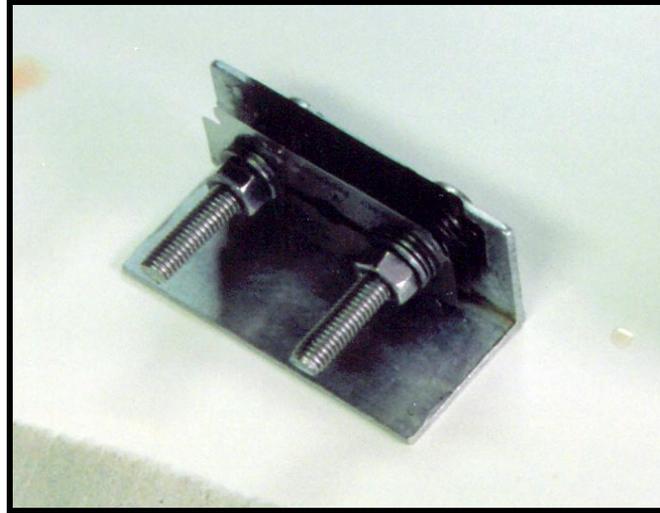
Todas as lâminas, de ambos os grupos controles e de ambos os grupos de fragmentos criopreservados, foram cegadas, colocando-se uma etiqueta sobre a identificação e, posteriormente misturadas para a randomização. Toda análise histológica foi feita pelo mesmo observador, utilizando o microscópio (Nikon Alphaphoto 2 y s2, Japan), com 400 aumentos (Figuras 5.1 a 5.15).



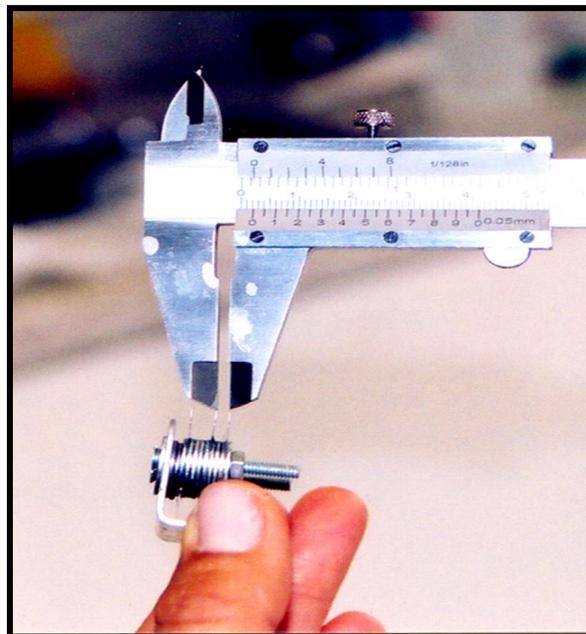
**Figura 5.1**  
**Ovário antes de ser fragmentado**



**Figura 5.2**  
**Primeiro passo do procedimento: divisão do ovário ao meio, resultando em 2 hemi-ovários**



**Figura 5.3**  
Detalhe do aparelho composto por lâminas paralelas e fixadas com parafusos



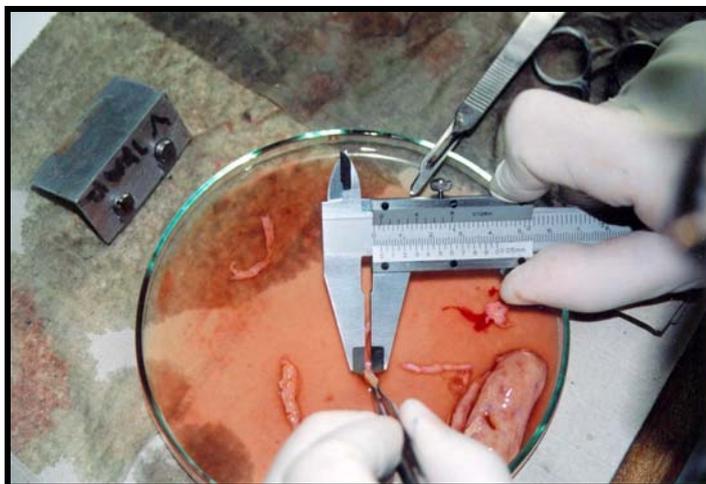
**Figura 5.4**  
Aferição com paquímetro das distâncias de 2 e de 4mm entre as lâminas



**Figura 5.5**  
**Deslizamento do aparelho de lâminas paralelas sobre o córtex do hemi-ovário**



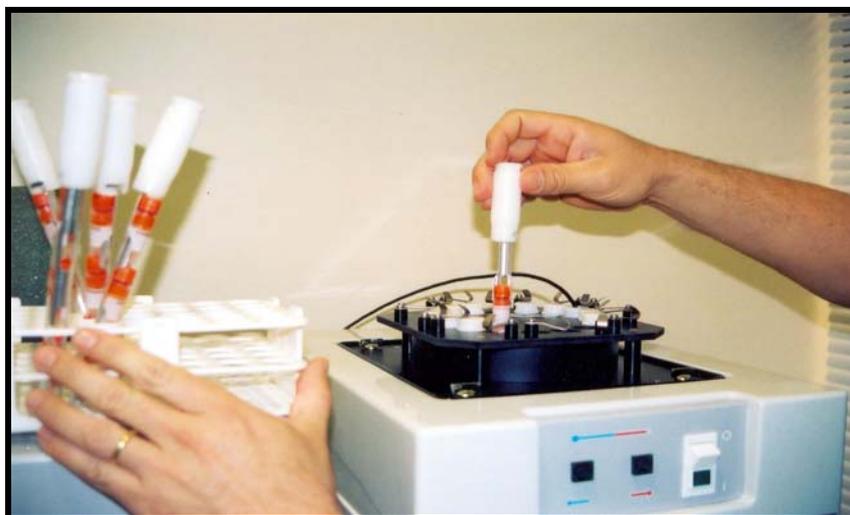
**Figura 5.6**  
**Duas tiras, que serão seccionadas transversalmente de modo a formar 3 a 4 fragmentos com 10mm de comprimento**



**Figura 5.7**  
**Aferição de uma das medidas do fragmento**



**Figura 5.8**  
**Etapa em que os fragmentos foram imersos no meio com crioprotetor**



**Figura 5.9**  
**Colocação dos criotubos na máquina de congelamento**



**Figura 5.10**  
**Realização da indução da formação do gelo (*seeding*)**



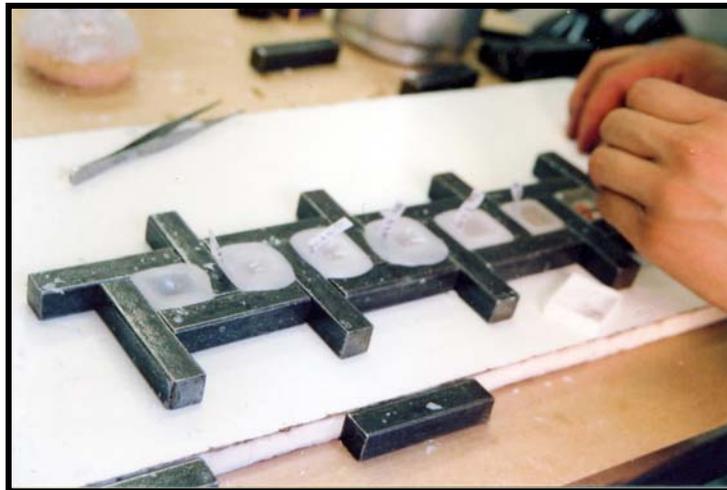
**Figura 5.11**  
**Armazenamento em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}$**



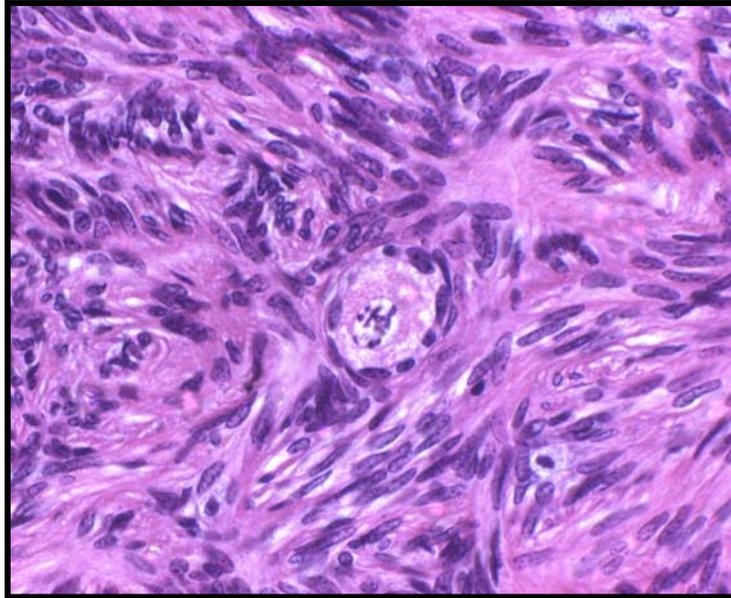
**Figura 5.12**  
**Retirada do crioprotetor em diluições decrescentes, após o descongelamento**



**Figura 5.13**  
**Fixação em bouin**



**Figura 5.14**  
**Embloração dos fragmentos em parafina, na etapa do preparo para histologia**



**Figura 5.15**

**Histologia do ovário: folículo primário normal de fragmento com 2mm que foi criopreservado**

#### 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado um experimento laboratorial controlado. Os dados foram descritos por proporções de sucesso estratificados por tamanho de fragmento e congelamento. Preliminarmente, as proporções foram calculadas por qui-quadrado de Pearson. A ocorrência de folículos normais entre os métodos congelado e controle foi comparada para fragmentos maiores de 2mm versus fragmentos de 2mm utilizando-se o teste de qui-quadrado de heterogeneidade de riscos relativos de Mantel-Haenszel. O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ , sendo os dados analisados com auxílio do programa P.E.P.I. (Programs for Epidemiologists), versão 4.0.

## 5.5 RESULTADOS

Foram analisados 1618 folículos, sendo 839 com os oócitos completos (núcleo e citoplasma), que denominamos folículos completos (Figura 5.16A), e 779 folículos somente com o citoplasma dos oócitos, que denominamos folículos incompletos (Figura 1.16B). O percentual de folículos completos morfológicamente normais nos controles e pós-congelamento nos fragmentos de 2mm e maiores de 2mm, estão representados na Tabela 5.1. Foi observado um percentual baixo de folículos normais pós-criopreservação no grupo dos fragmentos maiores de 2mm (34%). Quando comparados os dois grupos dos fragmentos criopreservados, observamos também que há uma diferença estatisticamente significativa de folículos normais entre os fragmentos de 2mm e os fragmentos maiores de 2mm ( $p < 0,001$ ). Em relação aos tipos de alterações encontradas após o congelamento, a retração do citoplasma foi a mais freqüente (Figura 5.16C), tanto nos fragmentos de 2mm (Tabela 5.2), quanto nos fragmentos mais espessos (Tabela 5.3). Observamos que neste estudo o tamanho, isoladamente, também contribuiu para uma diminuição na qualidade de folículos normais. O grupo controle dos fragmentos com 2mm apresentou 89% dos folículos normais, enquanto nos fragmentos maiores de 2mm, encontramos 73% dos folículos normais ( $p < 0,001$ ).

No grupo de folículos em que o corte histológico não se deu em nível do núcleo do oócito (folículos incompletos), os achados foram bastante semelhantes aos encontrados no estudo com o folículo completo: os fragmentos com 2mm apresentaram uma taxa de folículos normais de 64% de normais, enquanto nos fragmentos mais espessos essa taxa foi de 32% ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5.4). A alteração predominante também foi a retração do citoplasma (95%). Novamente, o tamanho dos fragmentos demonstrou exercer importância nos achados, pois no grupo controle dos

fragmentos com 2mm, 88% dos folículos eram normais, enquanto nos controles dos fragmentos maiores de 2mm, essa taxa cai para 77% ( $p < 0,001$ ).

Quando comparadas as taxas de sucesso nos fragmentos com 2mm, observamos que, havendo a preservação de folículos normais em 89% no grupo controle e em 56% no grupo dos fragmentos criopreservados, obteve-se um risco relativo de 0,63 para a manutenção dos folículos normais pós-congelamento. Realizando o mesmo comparativo nos fragmentos maiores de 2mm, onde a taxa de folículos normais foi de 73% no grupo controle e de 34% no grupo criopreservado, observamos um risco relativo para a preservação dos folículos pós-congelamento menor, de 0,47. A comparação desses dois riscos relativos mostrou de forma significativa (qui-quadrado de heterogeneidade  $p = 0,022$ ) que o impacto do congelamento na redução das taxas de sucesso foi maior nos fragmentos criopreservados que tinham medidas maiores de 2mm (Figura 5.17).

Na segunda comparação, analisando somente o citoplasma dos oócitos contidos nos folículos (folículos incompletos), o risco relativo para a preservação dos folículos normais pós-congelamento nos fragmentos com 2mm foi de 0,72, e nos fragmentos com mais de 2mm foi de 0,43. Esses dois riscos relativos, avaliados no procedimento de qui-quadrado de heterogeneidade também apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) na redução das taxas de sucesso nos fragmentos maiores de 2mm. Novamente, o impacto do congelamento na redução da preservação folicular foi mais intenso nos fragmentos maiores de 2mm (figura 5.18).

**Tabela 5.1**

**Numero total e percentagens de folículos normais em fragmentos com 2mm e com mais de 2mm, comparativo entre os grupos controle (não tratados) e os grupos que foram cripreservados (tratamento):  
análise dos folículos completos**

	2mm			>2mm		
	n	Normais	%	n	Normais	%
Controle	169	150	89	273	201	73
Tratamento	219	123	56*	178	62	34* **

\*p< 0,001 diferença do controle

\*\*p< 0,001 diferença do tratamento com 2mm

**Tabela 5.2**

**Alterações encontradas nos grupos controle e criopreservado (tratamento) nos fragmentos com 2mm:  
análise dos folículos completos**

	Total	Citoplasma retraído	%	Núcleo picnótico	%	Outras*	%
Controle	19	4	21	8	42	7	36
Tratamento	96	54	56	26	27	16	17

\* Outras alterações: ooplasma não homogêneo, lâmina basal incompleta.

**Tabela 5.3**

**Alterações encontradas nos grupos controle e criopreservado (tratamento) nos fragmentos maiores de 2mm:  
análise dos folículos completos**

	Total	Citoplasma retraído	%	Núcleo picnótico	%	Outras*	%
Controle	72	30	41	29	40	13	19
Tratamento	116	99	85	6	5	11	10

\* Outras alterações: ooplasma não homogêneo, lâmina basal incompleta.

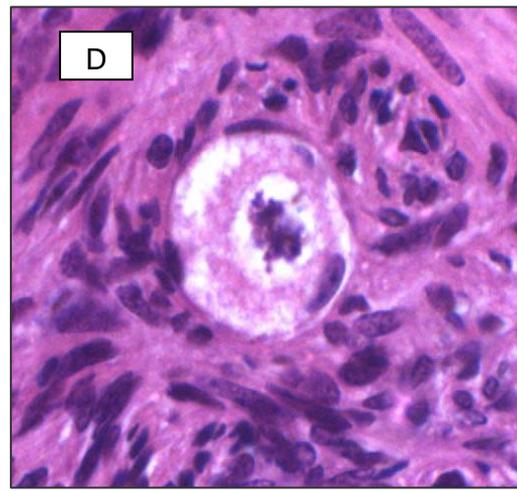
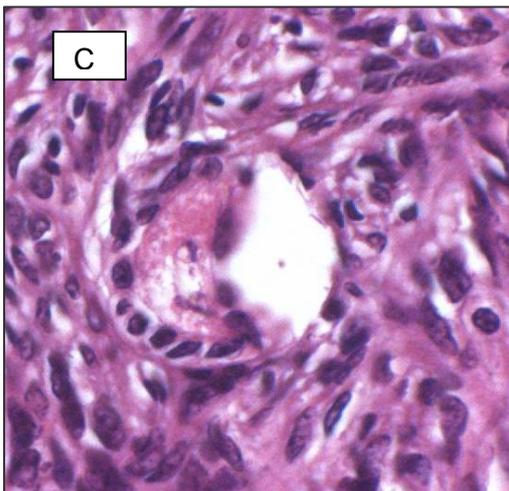
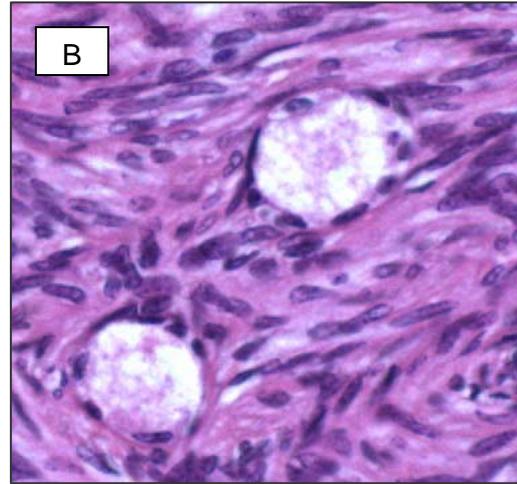
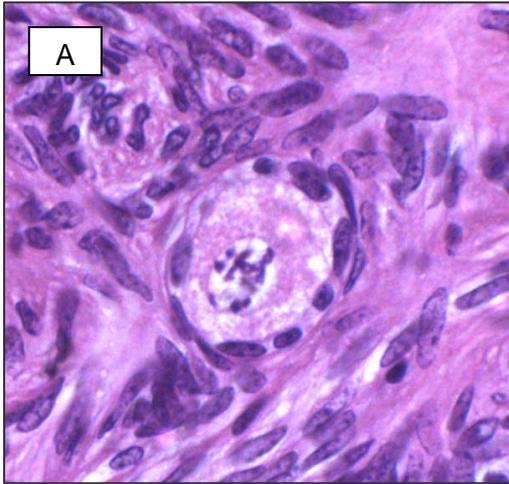
**Tabela 5.4**

**Numero total e percentagens de folículos normais em fragmentos com 2mm e com mais de 2mm, comparativo entre os grupos controle e cripreservado (tratamento): análise dos folículos incompletos**

	2mm			>2mm		
	n	Normais	%	n	Normais	%
Controle	156	138	88	211	162	77
Tratamento	245	156	64*	167	54	32*, **

\*p< 0,001 diferença do controle

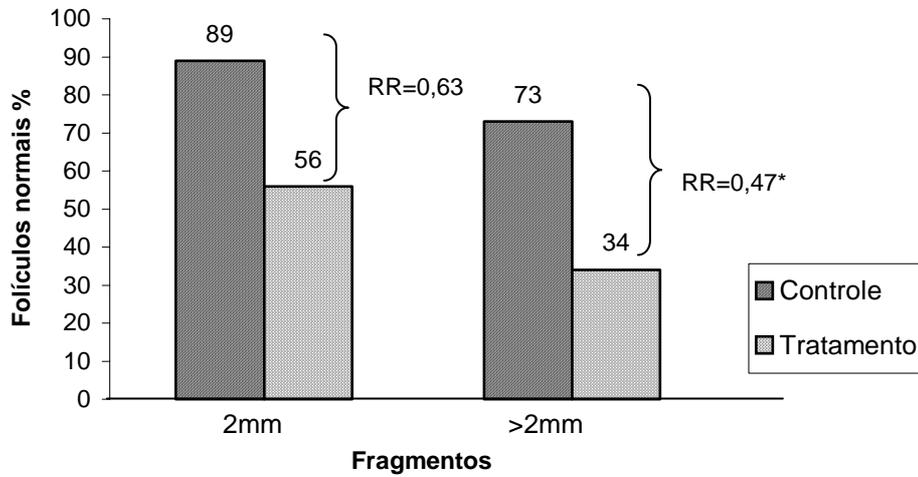
\*\*p< 0,001 diferença do tratamento com 2mm



**Figura 5.16**

**Corte histológico de tecido ovariano corado com hematoxilina e eosina**

- (A) Folículo primordial morfológicamente normal.**
- (B) Folículo primordial incompleto normal (o corte histológico não foi realizado em nível do núcleo do oócito).**
- (C) Folículo primário anormal, com retração do citoplasma e separação das células da granulosa da lâmina basal folicular.**
- (D) Folículo primordial anormal, com presença de núcleo picnótico.**

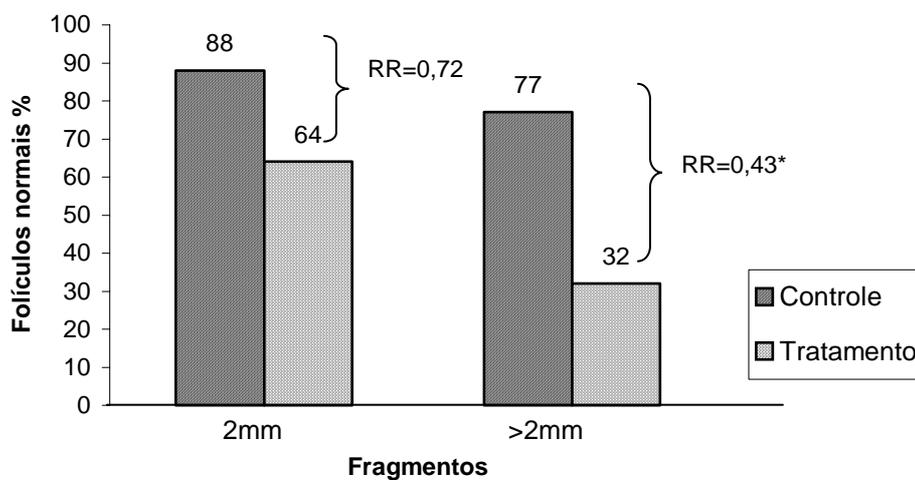


**Figura 5.17.**

**Taxas de folículos normais nos grupos controle e pós-congelamento (tratamento) nos fragmentos com 2mm e nos fragmentos maiores de 2mm: análise dos folículos completos**

RR: risco relativo na ocorrência de sucesso (preservação dos folículos).

\*Redução das taxas de sucesso significativamente maior (p=0,022).



**Figura 5.18**

**Taxas de folículos normais nos grupos controle e pós-congelamento (tratamento) nos fragmentos com 2mm e nos fragmentos maiores de 2mm: análise dos folículos incompletos**

RR: risco relativo na ocorrência de sucesso (preservação dos folículos).

\*Redução das taxas de sucesso significativamente maior ( $p < 0,001$ ).

## 5.6 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que, apesar dos benefícios que existem no congelamento de fragmentos ovarianos maiores, há um significativo comprometimento da estrutura folicular quando não há pelo menos uma das medidas com 2mm. Observamos que fragmentos com medidas maiores que 2mm apresentaram uma taxa de 34% de folículos morfolologicamente normais, enquanto que fragmentos com 2mm apresentaram uma taxa de 56% ( $p < 0,001$ ).

Os poucos trabalhos realizados comparando fragmentos de tecido ovariano demonstram algumas vantagens no uso de fragmentos maiores. Jeremias e cols. (45) estudaram fragmentos de ovários de porcas com a mesma espessura (1mm), porém com tamanhos diferentes e demonstraram que fragmentos maiores ( $5 \times 1 \times 1\text{mm}^3$ ), após o congelamento, apresentavam uma quantidade de folículos por campo de alta magnificação significativamente maior do que nos fragmentos menores ( $1 \times 1 \times 1\text{mm}^3$ ). Recentemente Denschlag e cols. (48) realizaram o primeiro estudo comparando dois diferentes tamanhos de fragmentos ovarianos frescos transplantados heterotopicamente em ovelhas e concluiu que fragmentos grandes, (2cm de diâmetro), com espessuras de 2mm e de 3mm demonstraram viabilidade funcional equivalente, sem diferença em termos de vascularização e sobrevivência dos folículos primordiais.

Estudos anteriores de criopreservação ovariana foram realizados com fragmentos que poderíamos classificar como grandes, porém sempre mantendo uma medida das medidas com 2mm. Radford e cols. (14) relataram a restauração de função ovariana em humanos usando fragmentos medindo  $1\text{mm} \times 5\text{mm} \times 10\text{mm}$ . Oktay (25) realizou autotransplante ortotópico em humanos com fragmentos medindo  $2 \times 2$  a  $5 \times 10\text{mm}$ , Salle e cols. (18) descreveram gestações em ovelhas com autotransplante de fragmentos medindo  $1\text{mm} \times 10\text{mm} \times 20\text{mm}$ . As principais vantagens dos fragmentos maiores são uma quantidade maior de folículos disponíveis, uma

maior praticidade na manipulação e um risco menor de lesarmos a camada cortical do ovário, onde se encontram os folículos. Porém, para se obter uma ótima crioproteção, é essencial que os protocolos permitam uma penetração uniforme dos crioprotetores através do tecido ovariano.

Tratando objetivamente das medidas dos fragmentos, Oktay (38) refere que os ovários humanos são muito grandes e fibrosos e que a córtex ovariana tem que ser cortada com 1-2mm de espessura para que os crioprotetores penetrem no tecido. Falcone e cols. (46) relataram que a criopreservação de pequenos fragmentos (1-2mm) da córtex ovariana tem sido usada para uma maior eficácia da crioproteção, pois a velocidade da permeabilidade do crioprotetor é afetada pela quantidade de tecido que os agentes tem que ultrapassar, por difusão.

Sabendo das vantagens dos fragmentos maiores e, mesmo sendo recomendado pela maioria dos autores pelo menos uma das medidas com 1 a 2mm, não encontramos, no entanto, na literatura, nenhum trabalho que avaliasse o quanto seria prejudicial não ter pelo menos uma das dimensões com 2mm ou menos.

É importante comentar que, em nosso estudo, observamos uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre as taxas de folículos normais encontradas entre os fragmentos controles de 2mm (89%) e os fragmentos controles maiores de 2mm (73%). Por esse achado, o tamanho dos fragmentos, acabou tendo impacto nos resultados, com um comprometimento maior dos fragmentos com mais de 2mm. Não vemos uma razão para o tamanho do fragmento, isoladamente, influenciar a preservação dos folículos. Considerando que todos os fragmentos foram de um único ovário, foram cortados pela mesma pessoa, foram congelados e descongelados juntos, examinados pelo mesmo examinador, e que a análise foi cega, acreditamos que a fixação histológica possa ter influenciado negativamente os fragmentos mais espessos.

Como o nosso objetivo foi avaliar o dano causado pela dificuldade de penetração dos crioprotetores e, para retirarmos a influência do viés de confusão causado pelo tamanho do fragmento, comparamos os riscos relativos para a redução de sucesso (folículos normais pós-congelamento) entre os dois grupos de fragmentos pelo procedimento de qui-quadrado de heterogeneidade. Podemos afirmar que o risco relativo para a preservação dos folículos indica, de forma estatisticamente significativa, que os fragmentos que possuem uma das medidas com 2mm têm menor probabilidade de sofrerem danos pelo congelamento quando comparados a fragmentos maiores de 2mm. A redução nas taxas de preservação de folículos normais pós-congelamento foi significativamente maior nos fragmentos maiores de 2mm, achado observado tanto na análise dos folículos inteiros, ( $p=0,022$ ), quanto no grupo em que estudamos somente as alterações no citoplasma ( $p<0,001$ ).

O efeito das medidas do fragmento sobre a morfologia folicular pós-congelamento fica também evidente quando comparamos nossos resultados com aqueles de Lucci e cols. (47), os quais utilizaram o mesmo protocolo de congelamento. Esses autores obtiveram uma taxa superior à nossa de preservação folicular pós-congelamento, talvez pela menor espessura dos fragmentos (1mm) utilizada naquele estudo. Não cremos que utilizando um tempo de equilíbrio maior aumente a taxa de folículos morfologicamente normais pós-congelamento, visto que a exposição prolongada ao crioprotetor a temperatura ambiente acarreta efeitos tóxicos e irreversíveis (49). Sabe-se que a difusão dos crioprotetores em tecidos multicelulares é muito mais lenta, o que significa que a exposição deve ser prolongada para alcançar a adequada penetração no centro do tecido; porém, dessa maneira as células mais superficiais ficam expostas à excessiva toxicidade (37).

Não foi encontrado na literatura nenhum estudo experimental delineado com o objetivo semelhante ao nosso, de verificar especificamente o efeito do tamanho do fragmento ovariano no sucesso pós-congelamento, apesar de outros autores já terem

feito observações sobre o comprometimento causado pelo tamanho do tecido no congelamento ovariano. Newton e cols. (37) estudando a permeabilidade dos crioprotetores em tecidos ovarianos humanos com 2mm de espessura, comentaram que a diferença entre o equilíbrio de dimetilsulfoxido (DMSO) de 76% que seu estudo observou e a de 45% que Thomas e cols.(50) haviam obtido usando o mesmo crioprotetor, com o mesmo tempo (20 minutos) em ovários de porcas, se devia à temperatura mais baixa e à maior espessura do fragmento (3-5mm). Bedaiwy e cols. (31) observaram que em ovários intactos de ovelhas que haviam sido criopreservados por perfusão e transplantados heterotopicamente, não havia sinais de necrose a 1mm da superfície da cortical, porém, havia necrose da maioria dos folículos em crescimento, denotando que não haviam sobrevivido devido à isquemia e ao processo de congelamento.

O congelamento de tecido ovariano é mais uma ferramenta para a preservação da fertilidade em pacientes oncológicas, já tendo alcançado importantes progressos. Porém, mais investigações são necessárias para a ampla aplicação da técnica com a reprodutibilidade dos bons resultados. A curva de congelamento lento, o uso dos crioprotetores DMSO e PROH e fragmentos com medidas de 1-2mm têm sido recomendados pela maioria dos autores com satisfatória taxa de sobrevivência folicular. No entanto, quando da implantação do enxerto, a isquemia na revascularização tecidual é o maior fator limitante na sobrevivência dos folículos. Esse prejuízo é mais pronunciado nos fragmentos maiores, pois os fragmentos são avasculares, e a capacidade das células de obter oxigênio e nutrientes antes da revascularização permanente depende da difusão através dos tecidos adjacentes.

Em vista da escassez de informações experimentais acerca do tamanho do fragmento ovariano a ser congelado, nosso estudo é mais uma contribuição para o conhecimento dos fatores que afetam o sucesso do procedimento de criopreservação ovariana. Os resultados do presente trabalho concordam com o consenso existente e

com a recomendação da maioria dos autores de que os fragmentos, para serem criopreservados, devam ter em uma das medidas o máximo de 2mm.

## 5.7 REFERÊNCIAS

1. Blatt J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:29–33.
2. Mc Vie J. Cancer treatment: the last 25 years. *Cancer Treat Rev* 1999;25:323-31.
3. Byrne J, Fears TR, Gail MH. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescent. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:788-93.
4. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med* 1973;289:1159–62.
5. Meiorow, D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility on female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hematological neoplasia and other cancers. *Leuk Lymphoma* 1999;33:65-76.
6. Wallace WHB, Shalet SM, Hendry J H, e cols. Ovarian failure following ovarian irradiation in childhood. The radiosensitivity of human oocyte. *Br Radiol* 1989; 62:995-98.
7. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum Reprod* 1996;11:1620 –26.
8. Tilly JL. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol Lett* 1998;102:497–01.
9. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril* 2000;74:743–48.
10. Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry [editorial]. *Fertil Steril* 2004; 81:1207-20.
11. The European IVF-monitoring programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE *Hum Reprod* 2005;20:1158-76.

12. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16:411–16.
13. Chen S, Lien Y, Chen H, Chang L, Tsai Y, Yang Y. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod* 2005;24:1-6.
14. Radford JA, Lieberman BA, Brison R, Smith AR, Critchlow JD, Russel SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden R *et. al.* Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high dose chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2001;357:1172-15.
15. Parkes AS, Smith AU. Preservation of ovarian tissue at  $-79^{\circ}$  C for transplantation. *Acta Endocrinol* 1954;17:313-20.
16. Danesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol* 1954;11:197-00.
17. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196^{\circ}$  C. *Hum Reprod* 1994;9:597–03.
18. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002;77:403–08.
19. Sztejn J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biol Reprod* 1998;58:1071–74.
20. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 2000;15:1300–04.
21. Aubard Y, Newton H, Scheffer G, Gosden R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;79:83–7.
22. Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, Wolf DP. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature* 2004;11:137-38.
23. Gook D, Edgar DH, Borg J, Archer J, Lutjen PJ, McBain JC. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2003;18:1772-81.
24. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila J, Balasch J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4489 – 94.
25. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;342:1919

26. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837-40.
27. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet j, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10.
28. Eppig J, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197-07.
29. Picton HM, Gosden RG. *In vitro* growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000;166:27-35.
30. Revel A, Elami A, Bor A, Yavin S, Natan Y, AravA. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertil Steril* 2004;82:1714-15.
31. Bedaiwy, M; Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein M, Siemianow M., Biscotti C, e Falcone T Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2003;79:594-02.
32. Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002;415:385.
33. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004;82:1390-94.
34. Bedaiwy M, Falcone T. Ovarian tissue banking for cancer patients: Reduction of post-transplantation ischaemic injury: intact ovary freezing and transplantation. *Hum Reprod* 2004;19:1242-44.
35. Yin H, Wang X, Kim S, Chen H, Tan S, Gosden R. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003;18:1165-72.
36. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13:376-80.
37. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996;11:1487-91.
38. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications. *Hum Reprod Update* 2001;7:526-34.
39. Hovatta O, Sylie R, Krausz T, Abir R, Margara R. Cryopreservation of human tissue using dimethylsulfoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Rep* 1996;11:1268-72.

40. Gook D, McCully BA, Edgar DH, McBain JC. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2001;16:417-22.
41. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen thwed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 2000;74:122-29.
42. Poirot C, Vacher-Lavenu M. Human ovarian tissue cryopreservation: indication and feasibility. *Hum Reprod* 2002;17:1447-52.
43. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997;67:481–86.
44. Hreinsson J, Zhang P, Swahn M, Hultenby K, Hovatta O. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue: comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Hum Reprod* 2003;18:2420-28.
45. Jeremias E, Bedaiwy M, Nelson D, Biscotti C, Falcone T. Assessment of tissue injury in cryopreserved ovarian tissue. *Fertil Steril* 2003;79:651-56.
46. Falcone T, Marjan Attaran M, Bedaiwy, M, Goldberg J. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril* 2004;81:243-57.
47. Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bao SN. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* 2004;61:1101-14.
48. Denschlag D, Knobloch C, Kockrow A, Baessler A, Goebel H, Wellens E, Haberstroh J, Tempfer C, Keck C. Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue in sheep. *Fertil Steril* 2005;83:501-03.
49. Bos-Mikich A, Whittingham DG. Analysis of the chromosome complement of frozen-thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1995;42:254-60.
50. Thomas N, Busza A, Cooper A e cols. Measurement of permeating levels of cryoprotectant during ovarian tissue cryopreservation using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in human and porcine ovaries. *Cryoletters* 1997;18:179–84.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6.1 CONCLUSÃO GERAL

Quando comparados histologicamente os efeitos da criopreservação entre fragmentos de diferentes tamanhos, concluímos que houve um maior comprometimento quando os fragmentos tinham todas as medidas maiores de 2mm.

## 6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

a) A principal alteração histológica dos folículos criopreservados foi a retração do citoplasma, tanto nos fragmentos com 2mm, quanto nos fragmentos maiores de 2mm.

b) Para a criopreservação de tecido ovariano, nossos resultados dão sustentação à literatura quanto ao uso de fragmentos que tenham pelo menos uma das medidas com 2mm.

## **7. ANEXO**

## ANEXO 7.1

Obtenção das medidas dos folículos utilizando o programa Image-Pro plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics, USA)

