

ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DE OVÁRIOS ECTOPICAMENTE TRANSPLANTADOS APÓS VITRIFICAÇÃO E DESVITRIFICAÇÃO SEGUIDAS DE ESTIMULAÇÃO EXÓGENA

Thalys J. M. Alves^{1*}, Marco Tulio Dias¹, Luiza Aparecida A. C. Pereira¹, Paulo Henrique A. Campos-Junior²

1. Estudante de IC da Universidade Federal de São João Del Rei

2. Professor do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João Del Rei

Resumo:

O adiamento da maternidade e a falência ovariana a partir da utilização de quimio/radioterapias são causas de infertilidade nas mulheres. As técnicas atuais para preservação da fertilidade estão disponíveis apenas para mulheres na menacme e para a utilização destas, o tratamento oncológico deve ser adiado. Para vencer tais barreiras o presente trabalho propõe a vitrificação de tecido ovariano seguido de transplante autólogo. O objetivo desse estudo foi avaliar a foliculogênese e cinética de perfusão vascular em ovários de camundongos após vitrificação/desvitrificação seguidas de autotransplante, os níveis de estradiol e o ciclo estral dos animais. Foi observado que os ovários foram mantidos saudavelmente pelo camundongo receptor, hábeis a produzir estradiol que pôde restaurar o ciclo estral desses animais e que os enxertos foram satisfatoriamente perfundidos. Nossos achados indicam que a técnica proposta é exequível e extremamente promissora.

Autorização legal:

CEUA UFSJ 009/2015

Palavras-chave: Ovário. Transplante. Vitrificação.

Apoio financeiro: CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFSJ

Introdução:

A mulher, já no nascimento, tem uma redução no número de folículos no ovário que continua em decréscimo e 97% desse esgotamento é alcançado aos 40 anos. Isso prediz uma infertilidade total por volta dos 50 anos de idade. Paralelamente, a adequação de quimio/radioterapias acarretou em aumento na sobrevivência de mulheres em período reprodutivo a tumores. Os ovários são muito sensíveis aos tratamentos oncológicos resultando em crescente número de pacientes com falência ovariana prematura e consequente infertilidade [1,2]. Assim, propõe-se alternativas para a preservação da fertilidade dessas mulheres, a fim de mudar essa realidade e possibilitar uma concepção futura.

As técnicas disponíveis atualmente, baseadas em criopreservação de embriões e oócitos, dependem de uma estimulação ovariana que demanda tempo que pode adiar o tratamento oncológico e abrangem apenas mulheres em idade reprodutiva. Para solucionar tais entraves, propõe-se a criopreservação de tecido ovariano como alternativa que pode apresentar resultados promissores [2,3,4,5].

A criopreservação baseia-se no congelamento de tecido ovariano com todo o pool folicular em diferentes fases de progressão. Dessa maneira preserva-se o maior número possível de gametas para posterior progressão da foliculogênese. Após o descongelamento do tecido, pode haver então o reimplante autólogo do tecido com restauração da função fértil e endócrina da paciente. Este procedimento pode ser rapidamente executado a qualquer momento, com nenhum atraso no tratamento oncológico, e é uma opção para preservar a fertilidade de mulheres na pré-puberdade [6].

Assim, a padronização do uso da vitrificação na criopreservação ovariana seguida de autotransplante justifica-se por ser promissora e pode propiciar uma revolução na preservação da fertilidade feminina, por incluir pacientes até então não assistidas. Para isso é necessária uma profunda análise deste processo na dinâmica ovariana, foliculogênese e produção de gametas, bem como seu uso na

restauração da função endócrina dos receptores do transplante para enfim estabelecer aplicabilidade clínica dessas técnicas.

De maneira geral, esse trabalho objetiva avaliar a foliculogênese e cinética de perfusão vascular em ovários de camundongos após vitrificação/desvitrificação seguidas de autotransplante ectópico, bem como os níveis de estradiol e o ciclo estral destes animais.

Metodologia:

Camundongos Balbc fêmeas (60 dias, n=24) foram subdivididos em quatro grupos: A- Controle, B- Ovariectomizados, C- Ovariectomizados e autotransplantados com tecido fresco e D- Ovariectomizados e autotransplantados com tecido vitrificado/desvitrificado. Para tanto, os animais submetidos à cirurgia (Grupos B/C/D) foram anestesiados com Ketamina/Xilazina e ovariectomizados bilateralmente. Os ovários frescos (Grupo C) foram mantidos em solução tampão (PBS) durante o procedimento. Os ovários do Grupo D foram colocados em PBS e posteriormente vitrificados/desvitrificados usando os kits IngáMed®, seguindo as instruções do fabricante. Estes ovários foram transplantados no subcutâneo dorsal dos camundongos. Diariamente a fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) foi analisada através de citologia de esfregaço vaginal. Além disso, a perfusão vascular foi avaliada 1, 5, 8, 12, 15, 19, 21 e 23 dias após o autotransplante, através da técnica de laser doppler e estimada por valores obtidos no sítio do transplante (Grupos C/D) menos a perfusão da pele de não-receptores (Grupos A/B), sendo então analisadas com testes ANOVA e Neuman Keus [7, 8]. Após 21 dias, parte dos animais transplantados (n=6) receberam 5UI de eCG (gonadotropina coriônica equina, Novormon 5000®) e, após 48h, 5UI de hCG (gonadotropina coriônica humana, Vetecor®), análogos ao FSH e LH respectivamente; os outros animais receberam PBS (n=6, controle). Após três dias, os receptores foram eutanasiados, os enxertos recuperados, processados para histologia (HE) e analisados qualitativamente. Além disso, amostras sanguíneas foram coletadas e os níveis plasmáticos de estradiol foram quantificados por quimioluminescência.

Participaram desse estudo integrantes do grupo de pesquisa em biologia da reprodução da UFSJ, incluindo alunos de iniciação científica dos cursos de Medicina e Ciências Biológicas, e colaboradores externos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Resultados e Discussão:

Foram observados folículos primordiais, primários, multilaminares e antrais nos ovários frescos, com e sem estimulação hormonal. Nos tecidos submetidos a vitrificação/desvitrificação sem estímulo, a foliculogênese progrediu até o estágio multilaminar, e naqueles com estimulação, houve maior densidade folicular, com folículos em estágio pré-ovulatório. Folículos atresícos foram observados em todos os grupos. Os níveis plasmáticos de estradiol entre os animais transplantados (Grupos C/D) não foram estatisticamente diferentes (17.2pg/ml-1 e 18.3pg/ml-1, respectivamente; $p>0.05$), todavia, foram menores que nos animais controle (Grupo A) (22.3pg/ml-1; $p<0.05$) e maiores que naqueles ovariectomizados (Grupo B) (10.3pg/ml-1; $p<0.05$). Corroborando tais achados, a análise do ciclo estral mostrou que os receptores (Grupos C/D) apresentaram frequência de fases diferente dos animais ovariectomizados (Grupo B) (proestro 10.9% vs 0.0%, estro 56.3% vs 0.0%, metaestro 18.1% vs 13.3% e diestro 14.5% vs 86.6% respectivamente). Além disso, a PV analisada no local de transplante não mostrou diferença entre grupos fresco e vitrificado (Grupos C/D). Assim, embora tenha ocorrido progressão da foliculogênese em todos os tecidos, o uso de superestimulação exógena trouxe melhores resultados.

Conclusões:

Esse estudo mostra, pioneiramente, a exequibilidade da técnica de vitrificação de tecido ovariano sem danos morfo-funcionais aparentes, com ovários (i) mantidos saudavelmente pelo camundongo receptor, (ii) hábeis a produzir estradiol que pôde (iii) restaurar o ciclo estral desses animais e que os enxertos foram (iv) satisfatoriamente perfundidos desde o transplante. De maneira geral os resultados mostram a exequibilidade da técnica de vitrificação de tecido ovariano como alternativa de preservação da fertilidade feminina, sendo uma técnica muito promissora e que requer mais estudos.

Referências bibliográficas

1. DITTRICH R, MALTARIS T, HOFFMANN I, OPPELT PG, BECKMANN MW, MUELLER A. **Fertility preservation in cancer patients**. *Minerva Ginecol.* 2010 62; 63–80. pmid:20186115
2. LOTZ L, MAKTabi A, HOFFMANN I, FINDEKLEE S, BECKMANN MW,

- DITTRICH R. **Ovarian tissue cryopreservation and retransplantation—what do patients think about it?** *Reprod Biomed Online*. 2016 32(4):394–400. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.12.012. pmid:26825247
3. AMORIM CA, DOLMANS MM, DAVID A, JAEGER J, VANACKER J, CAMBONI A. **Vitrification and xenografting of human ovarian tissue.** *Fertil Steril*. 2012 98; 1291–8.e1-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1109. pmid:22883570
4. LOTZ L, SCHNEIDER H, HACKL J, WACHTER D, HOFFMANN I, JURGONS R. **Does stimulation with human gonadotropins and gonadotropin-releasing hormone agonist enhance and accelerate the developmental capacity of oocytes in human ovarian tissue xenografted into severe combined immunodeficient mice?** *Fertil Steril*. 2014 101; 1477–84. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.038. pmid:24602750
5. LOTZ L, MONTAG M, VAN DER VEN H, VON WOLFF M, MUELLER A, HOFFMANN I, et al. **Xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with ovarian tumors into SCID mice—no evidence of malignant cell contamination.** *Fertil Steril*. 2011 30;95(8):2612–4.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.003. pmid:21621205
6. DONNEZ J, DOLMANS MM. **Fertility preservation in women.** *Nat Rev Endocrinol*. 2013 9; 735–49. doi: 10.1038/nrendo.2013.205. pmid:24166000
7. CAMPOS-JUNIOR PH, SILVA CA, GRAZIA JG, SOARES MB, SANTOS RR, VIANA JH. **Use of ultrasound biomicroscopy to evaluate induced ovarian follicular growth and ovulation in mice.** *Lab Anim*. 2011 45; 254–8. doi: 10.1258/la.2011.011031. pmid:21903700
8. CAMPOS-JUNIOR PHA, MARINHO ASSUNCAO C, CARVALHO BC, BATISTA RI, GARCIA RM, VIANA JH. **Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of different strains of mice.** *Reprod Biol*. 2012a 12; 41–55.