

BEATRIZ ANGÉLICA CHARLOTTE THOMAZ

**ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO OVÁRIO DE
COELHAS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná
como requisito parcial para a
obtenção do grau acadêmico de
Mestre

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões

Coordenador: Prof. Dr. Waldemiro Gremski

CURITIBA

2005

**São fúteis e cheias de erros as ciências
que não nasceram da experimentação,
mãe de todo conhecimento.**

**Leonardo da Vinci
(1452 - 1519)**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldomiro Gremski, coordenador do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por proporcionar, junto à instituição, a possibilidade da realização desse estudo.

À Prof. ^a Dr. ^a Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões, muito mais do que orientadora, minha sincera amiga e exemplo de sabedoria, perseverança e disciplina.

A Gilberto van den Boogaard, meu tio, amigo e mecenas. Sem ele, eu não teria a coragem de iniciar esta jornada.

À Universidade Estadual de Maringá, por conceder as condições de experimentação.

Ao Dr. Álvaro Pigatto Ceschin, por me abrir as portas da pesquisa e acreditar em meu potencial.

Ao Dr. Carlos Gilberto Almodin e à equipe Materbaby.

Ao Dr. Sérgio Ioshii, pela orientação na leitura das lâminas.

À Paula Salini Abrahão, pela bem-vinda ajuda nos textos em inglês e na configuração da dissertação.

Ao Dr. Antonio Vazquez e ao Dr. Nélio Fiorenza, por permitir flexibilidade em meu horário de trabalho.

A meus verdadeiros amigos, que me incentivaram e tiveram a feliz idéia de me chamar para uma cervejinha quando estava à beira de um surto na elaboração deste estudo.

**Dedico este trabalho a meus pais, Arildo e Cornélia,
que me educaram no caminho do amor,
da honestidade e dos estudos.**

**Ao Eduardo, meu companheiro de
todos os momentos, pelo
incentivo e amor incondicional.**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	7
2 LITERATURA	8
2.1 EFEITOS GONADOTÓXICOS DA QUIMIO E RADIOTERAPIA	9
2.2 CRIOPRESERVAÇÃO	12
2.3 ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – PCNA.....	17
3 MÉTODOS.....	20
3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	21
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO	21
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.3.1 Anestesia.....	21
3.3.2 Preparo do animal	22
3.3.3 Laparotomia e ooforectomia	22
3.3.4 Preparo dos ovários	24
3.3.5 Descongelamento.....	25
3.3.6 Técnica de PCNA	25
3.3.7 Avaliação histológica geral.....	26
3.3.8 Análise imunohistoquímica	29
3.3.9 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA GERAL	31
4.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA POR PCNA	37
5 DISCUSSÃO	43
5.1 A RESPEITO DO MÉTODO.....	46
5.1.1 Animal de experimentação	46
5.1.2 Criopreservação	46
5.1.3 Exposição aos crioprotetores	48
5.1.4 Tipos de crioprotetores	51
5.1.5 Dificuldades da criopreservação	51
5.1.6 Vitrificação.....	52
5.2 A RESPEITO DOS RESULTADOS	53
5.2.1 Análise histológica geral	53
5.2.2 Análise imunohistoquímica.....	57
6 CONCLUSÃO	59
REFERENCIAS.....	61
NORMAS UTILIZADAS	72
ANEXOS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características histológicas encontradas nos grupos	31
Tabela 2 - Análise imunohistoquímica por PCNA das células lúteas e estromais do tecido não congelado e criopreservado.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Análise comparativa em relação ao tipo de tecido.....	39
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ovário direito contido por pinça hemostática	23
Figura 2 - Aspecto da síntese do plano peritônio-músculo-aponevrótico (↓).....	23
Figura 3 - Aspecto macroscópico de ovário normal não congelado.....	24
Figura 4 - Características histológicas encontradas nos grupos.....	33
Figura 5 - Fotomicrografia de ovário demonstrando folículo secundário em tecido não congelado (HE - 400X).....	33
Figura 6 - Fotomicrografia com folículo primário em tecido não congelado (HE- 400X) ...	33
Figura 7 - Fotomicrografia com visibilização de folículo primordial em tecido criopreservado (HE- 100 X)	34
Figura 8 - Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado demonstrando folículo primordial com contornos irregulares (HE - 400X)	34
Figura 9 - Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado em que se observa fragmentação do oócito (HE - 400X)	35
Figura 10 - Fotomicrografia de tecido ovariano demonstrando distribuição irregular da cromatina (HE - 400X)	35
Figura 11 - Fotomicrografia de ovário na qual se verificam vacuolizações citoplasmáticas (HE - 400X).....	36
Figura 12 - Fotomicrografia de tecido ovariano demonstrando fragmentação nuclear das células da granulosa (HE - 400X)	36
Figura 13: Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado com visibilização de degeneração hialina (HE - 400X).....	37
Figura 14 - Fotomicrografia de ovário demonstrando folículos primordiais e folículo secundário PCNA positivos em tecido não congelado (400X).....	40
Figura 15 - Fotomicrografia com folículo primário e células luteicas PCNA positivas e estromais PCNA negativas em tecido ovariano não congelado (400 X).....	40
Figura 16 - Fotomicrografia com folículos primários e primordiais e células luteicas PCNA positivos e células estromais PCNA negativas em tecido ovariano não congelado (400 X).....	41
Figura 17 - Fotomicrografia demonstrando folículos primordiais e células luteicas PCNA positivos e células estromais PCNA negativas em tecido ovariano criopreservado (400X).....	41
Figura 18 - Fotomicrografia onde se observam folículos primordiais e células luteicas PCNA positivos e células estromais PCNA negativas em tecido ovariano criopreservado (100 X).....	42

RESUMO

Com a finalidade de avaliar a preservação folicular e as características celulares do tecido ovariano criopreservado e comparar com o não congelado, dez coelhas brancas adultas, sob anestesia, foram submetidas a ooforectomia direita. O ovário ressecado foi dissecado, mantendo-se o córtex com uma espessura de, aproximadamente, 1,5 milímetros. O tecido foi fragmentado em pequenas secções, algumas reservadas para o estudo histológico de controle e outras destinadas à criopreservação. Passadas 6 semanas, efetuou-se o descongelamento do tecido ovariano e avaliou-se histologicamente. As amostras do controle e do experimento, após processamento histológico, foram coradas pela hematoxilina-eosina e tratados pela técnica imunohistoquímica do PCNA para avaliação da preservação do DNA. Identificaram-se as alterações histológicas presentes no tecido não congelado e no tecido criopreservado e a avaliação do potencial de viabilidade do tecido criopreservado. Observou-se que no tecido criopreservado só persistiram oócitos primordiais. Entre as alterações reversíveis identificou-se vacuolização citoplasmática ($p=0,039$), lise estromal ($p=0,022$) e oócitos com contornos irregulares ($p=0,022$). Encontraram-se as alterações irreversíveis: degeneração hialina ($p=0,210$) e picnose ($p=0,210$), ainda que em níveis não significantes. A análise imunohistoquímica demonstrou que os folículos em diferentes estágios de desenvolvimento no tecido não congelado e os folículos primordiais no tecido criopreservado apresentaram positividade para o PCNA, indicando a presença de DNA ativo.

DESCRITORES: Criopreservação. Ovário. PCNA. Coelhos. Histologia.

ABSTRACT

Ten grown up female white rabbits, under anesthesia, had been submitted to right oophorectomy to evaluate the follicular preservation and the histological characteristics of the cryopreserved ovarian tissue and compared to the fresh one. The dried ovary was dissected and maintained the cortex with 1,5 millimeters thickness, approximately. The tissue was fractionated in small sections, some reserved for the control histological study and others destined to the cryopreservation. Six weeks later the ovarian tissue was thawing and evaluated histologically. After histological processing, the control samples and the experiment ones were stained by the hematoxylineosin and treated immunohistochemistry by the PCNA technique for evaluation of the DNA preservation. Histological alterations present in the fresh tissue and in the cryopreserved one were identified, and the evaluation of the cryopreserved tissue viability was made. It was observed that in the cryopreserved tissue only primordial follicles persisted. It had been identified the reversible alterations: cytoplasmatic vacuolation ($p=0,039$), stromal lysis ($p=0,022$) and oocytes with irregular contours ($p=0,022$). Irreversible alteration: hyalin degeneration ($p=0,210$) and pycnosis ($p=0,210$) were found, even not in significant levels. The immunohistochemistry analysis demonstrated PCNA stained for follicles in different stages of development in the fresh tissue and primordial follicles in the tissue cryopreserved, indicating the presence of active DNA on both tissue.

KEY WORDS: Criopreservation. Ovary. PCNA. Rabbits. Histology.

1 INTRODUÇÃO

O ovário contém uma reserva de células germinativas que excede o número de folículos suficiente para todos os ciclos menstruais, desde a puberdade até a menopausa. Esse estoque é definido antes do nascimento e não pode ser repostado. Atualmente não há metodologia comprovada para impedir o declínio da reserva folicular, embora o processo de criopreservação permita uma opção para a manutenção, a longo prazo, dos oócitos.

O transplante ovariano data do século XIX, quando alguns acreditavam que conseguiriam o rejuvenescimento com o transplante de células produtoras de hormônios sexuais. Somente no século XX houve real interesse no transplante de órgãos reprodutivos. Apesar de várias tentativas do transplante ovariano alogênico nos anos de 1900, nenhum benefício clínico foi alcançado, principalmente devido às reações imunes. Um grande avanço ocorreu em 1948, quando o primeiro crioprotetor, o glicerol, foi descoberto. O desenvolvimento de métodos de congelamento utilizando os crioprotetores levou aos experimentos de transplante de tecido gonadal criopreservado de ratos, em 1954, com Deanesly e Parkes. Em 1960, Parrot obteve o nascimento de camundongos utilizando a criopreservação. Nos anos 90, os pesquisadores iniciaram o estudo das potenciais aplicações clínicas da criopreservação, utilizando novos crioprotetores. (LEE, OUHIBI e BATAGLIA, 2001).

A tecnologia de criopreservação pode potencialmente ser utilizada para preservar a fertilidade em pacientes a serem submetidos a tratamentos que levem à esterilização ou que tenham risco de menopausa precoce. Pacientes jovens, com câncer, que são submetidos a tratamentos de quimio e radioterapia, têm conseguido uma sobrevida prolongada e com qualidade, sem nenhum traço da

doença. Entretanto, este tipo de tratamento afeta as células germinativas, que são suscetíveis à toxicidade do tratamento, causando falência ovariana precoce (LUSHBAUGH, CASAREN, 1976; DAMEWOOD, GROCHOW, 1986; APPERLEY, REDDY, 1995; MEIROW, NUGENT, 2001). A infertilidade é a principal complicação imposta às pacientes jovens, especialmente àquelas que não têm nenhuma intenção de engravidar num futuro próximo. Apesar de parte das pacientes jovens apresentarem somente amenorréia temporária após a radioterapia, sabe-se que pode haver depleção severa da reserva de folículos e, em conseqüência, menopausa prematura (NEWTON, 1998). Um modelo matemático estima que a redução de 90% da população de células germinativas, em meninas com idade inferior a 14 anos, pode resultar na falência ovariana permanente até ao redor dos 27 anos de idade (FADDY, GOSDEN, GOUGEON, RICHARDSON e NELSON, 1992).

A criopreservação do esperma permite aos homens jovens, submetidos a tratamentos de câncer, preservar sua fertilidade (GOLDBERG, MASHA, FALCONE e KOVAC, 1999).

Infelizmente muitos autores observaram importante e inaceitável baixa da taxa de gravidez quando tentaram o congelamento de óvulos (MAZUR, LEIBO e CHU, 1972; TROUNSON e KIRBY, 1989; VINCENT, PICKERING e JONHSON, 1990; PORCU, FABRI, SERACCHIOLI, CIOTTI, MAGRINI e FLAMIGNI, 1997).

A criopreservação ovariana do tecido apresenta o mesmo objetivo para mulheres e poderia ser, também, uma opção para crianças. Entretanto, somente os folículos primordiais sobrevivem após o congelamento e a maturação folicular é necessária após o descongelamento. Este processo de maturação não foi realizado ainda em seres humanos; casos de gravidez foram obtidos somente em modelos animais.

Os folículos primordiais são as células germinativas mais importantes do tecido ovariano. Uma vez que esses folículos são

menores e metabolicamente menos ativos, são também mais tolerantes ao processo de criopreservação, que requer não somente a sobrevivência do oócito e das células da granulosa, mas também a manutenção das junções *gap* e do metabolismo essencial ao crescimento e desenvolvimento do oócito (BANU DEMIRCI, LORNAGE, SALLE, FRAPPART, FRANCK e GUERIN, 2001). Além disso, os folículos primordiais apresentam-se em quantidade abundante e com localização periférica.

Os fragmentos de tecido ovariano podem ser obtidos por biópsia coletada por laparoscopia ou pela dissecação total do córtex do ovário (GOSDEN, 2000).

A criopreservação de tecido ovariano pode ser realizada em procedimentos de ooforectomia curativa ou profilática, quando houver necessidade de quimioterapia com agentes alquilantes em grandes doses ou quando a radiação pélvica é necessária, particularmente em casos que requeiram quimioterapia combinada com radioterapia (AUBARD, PIVER, PECH, GALINA e TEISSIER, 2001).

Em algumas destas situações, o transplante de tecido criopreservado pode ser perigoso, uma vez que células cancerígenas poderiam remanescer nos enxertos assim como viroses incluindo HIV e hepatite. A melhor solução neste caso é a maturação folicular *in vitro* (PICTON e GOSDEN, 2000).

O congelamento do tecido ovariano tem sido feito, recentemente, com resultados muito satisfatórios, mantendo a viabilidade do tecido germinativo (NEWTON, AUBARD, RUTHERFORD, SHARMA e GOSDEN, 1996; HOVATTA, SILVER, KRAUSZ, ABIR, MARGARA, TREW, LASS e WINSTON, 1996; GOSDEN, 2000).

A restauração da fertilidade, com o uso deste tecido criopreservado, é ainda hipotética e sem um protocolo consensual (SALLE, DEMIRCI, FRANCK, RUDIGOZ, GRUERIN E LONAGE,

2002). Três alternativas foram descritas como possíveis: autotransplante ovariano (AUBARD, LAVIGNAC, GRANDJEAN, PIVER e TEISSIER, 1996; AUBARD, PIVER, COGNIE, FERMEAUX, POULIN e DRIANCOURT, 1999); transplante heterólogo ovariano (OKTAY, NEWTON e GOSDEN, 2000) e maturação de folículos ovarianos primordiais *in vitro* (CORTVRINDF, SMITZ e VAN STEIRTEGHEM, 1996; PICTON e GOSDEN, 2000). Nos casos em que se pretende utilizar o tecido ovariano para criopreservação ou para bancos de gametas, é importante a manutenção de sua integridade e da viabilidade. Para a avaliação da morfologia e funcionalidade folicular, os pesquisadores têm utilizado técnicas diversas como a análise histológica após coloração com hematoxilina-eosina (NEWTON et al., 1996; OKTAY et al., 2000; LUNDY, SMITH, O'CONNELL, HUDSON e MCNATTY, 1999); técnica de fluorescência por microscopia eletrônica (BAIRD, WEBB, CAMPBELL, HARKNESS e GOSDEN, 1999; GOOK, EDGAR e STERN, 1999), análise citológica de esfregaço vaginal (CANDY, WOOD e WHITTINGHAM, 1995); análise histológica e dosagens séricas de FSH e LH (SALLE, LORNAGE, FRANCK, ISOARD, RUDIGOZ e GUERIN, 1998; GOOK, EDGAR e STERN, 1999; NISOLLE, CASANAS-ROUX, QU, MOTTA e DONNEZ, 2000) e análises imunohistoquímicas com marcadores, como o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular – PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*).

O atual conhecimento dos mecanismos reguladores do ciclo celular tem levado à descoberta de alguns antígenos celulares expressos em células em proliferação (marcadores de proteínas), que podem ser identificados por métodos imunohistoquímicos, através da utilização de anticorpos específicos para esses antígenos (HUANG, COLTRERA, SCHUBERT, MORTON e TRUELOVE, 1994). O

PCNA é um desses marcadores e tem sido utilizado em estudos mostrando resultados promissores, principalmente como marcador diferencial entre lesões benignas e malignas. Uma grande vantagem desse marcador é a possibilidade de utilização em tecidos fixados pelo formol e incluídos em parafina, o método mais utilizado no preparo dos tecidos para exames histopatológicos.

O PCNA constitui um polipeptídeo com peso molecular de 36 quiloDalton (KURKI, VANDERLAAN, DOLBEARE, GRAY e TAN, 1986); está expresso em grande parte do ciclo celular, com exceção, apenas, da fase M (OKTAY et al., 1997) e vem sendo amplamente utilizado com o objetivo de identificar células com DNA ativo. (RABENHORST, BURINI e SCHMITT, 1993). Constitui uma proteína nuclear associada com o ciclo celular, que atua como co-fator para a DNA polimerase delta, uma proteína que aumenta a capacidade da polimerase em utilizar moldes que contenham regiões específicas à síntese de DNA. A polimerase delta possui uma atividade de exonuclease 3' para 5', importante na fidelidade da replicação do DNA. Isso sugere que ambas as polimerases, alfa e delta, poderiam atuar juntas na replicação do DNA (TOSCHI e BRAVO 1988). O PCNA foi originalmente detectado em 1978, durante experimentos com soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, em virtude de sua reação positiva com núcleos de células em proliferação e negativa com células restantes de tecido normal humano (MIYACHI, FRITZLER e TAN, 1978) e por BRAVO e CELIS (1980), através de estudos eletroforéticos em gel. Esses autores denominaram a proteína de Ciclina. Sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imunohistoquímicos.

Apesar de a expressão do PCNA, em algumas situações, poder refletir outros fenômenos, além de proliferação celular como, por

exemplo, reparo e replicação do DNA – e, ainda, apesar de ser essa expressão influenciada pela ação dos fatores de crescimento (EGF e TGF- α) (CLEARY, SNOW, PARIS, SHAW, COX e JENKIN, 2001), muitos trabalhos são realizados com o intuito de relacionar essa expressão com índices proliferativos de diversas alterações patológicas (ROBBINS, DE LA VEGA, OGATA, TAN e NAKAMURA, 1987; HALL, COATES, GOODLAD, HART e LANE, 1994).

1.1 OBJETIVO

Este estudo analisa os aspectos histológicos do ovário de coelhas após criopreservação bem como avalia a preservação folicular desse tecido, comparada ao tecido não congelado.

2 LITERATURA

2.1 EFEITOS GONADOTÓXICOS DA QUIMIO E RADIOTERAPIA

ATAYA, PYDYN, RAMAHI-ATAYA e ORTON (1995) estudaram a prevenção da falência ovariana provocada por radioterapia com o uso de agonistas do fator liberador do hormônio luteinizante (LHRH) em macacas. A pesquisa foi desenvolvida administrando acetato de Leuprolide antes, durante e após a radiação em dose de 200 rads/dia para um total de 4000 rads aos ovários de macacas *rhesus*. Coletaram amostras freqüentes do soro para dosagem de estradiol (E2) e do hormônio folículo estimulante (FSH). Após isso, efetuou-se a ooforectomia e a distribuição de contagem e de tamanho dos folículos foi determinada. Logo depois o início da radiação, os níveis de E2 caíram e permaneceram baixos; o nível sérico de FSH, baixo antes da radiação, aumentou logo após o início da radioterapia. As contagens foliculares não foram preservadas nas macacas tratadas com LHRH que receberam a radioterapia. Os dados não demonstraram nenhum efeito protetor do tratamento de LHRH à falência ovariana pós-radioterapia.

FEENEY, MOORE e LOOK (1995) realizaram a avaliação da eficácia da transposição ovariana na preservação da função ovariana normal, num estudo com 200 pacientes submetidas a tratamento de radioterapia para câncer cervical, após histerectomia. A transposição ovariana lateral foi feita em 132 pacientes (66%) e 28 (21%) receberam a terapia de radiação pélvica no pós-operatório. Os sintomas da menopausa (secura vaginal e calorões) e os níveis de FSH foram usados definir a função ovariana. Somente 3 de 104 pacientes (2.9%) que se submeteram à transposição ovariana lateral

sem radioterapia pélvica no pós-operatório desenvolveram sintomas menopausais; entretanto, os níveis de FSH nos três casos sugeriram preservação da função ovariana. Em 14 das 28 pacientes (50%) ocorreu a falência ovariana após o recebimento de radioterapia no pós-operatório, determinando que o risco de falência ovariana com a terapia de irradiação pélvica após a transposição ovariana lateral apresentou-se bastante significativo (preservação da função ovariana em somente 50% das pacientes).

BLUMENFELD, AVIVI e LINN (1996) avaliaram se a administração concomitante de um agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) com agentes quimioterápicos em pacientes jovens tratando de linfoma poderia facilitar a preservação da função gonadal. Um protocolo clínico prospectivo foi empreendido em 18 mulheres entre 15 e 40 anos. Treze pacientes sofriam da doença de Hodgkin e 5 de linfoma não-Hodgkin. Após consentimento informado, administraram uma injeção mensal de D-TRP6-GnRH, no período máximo de 6 meses, iniciadas antes da quimioterapia seguida ou não de radioterapia. O perfil hormonal (dosagem de LH, FSH, estradiol, testosterona, progesterona, fator de crescimento insulina-dependente e prolactina) foi feito antes do co-tratamento de GnRH/quimioterapia, e mensalmente após o tratamento, até recomeçar a ovulação e as menstruações espontâneas. Este grupo foi comparado a um controle de 18 mulheres com idade entre 17 e 40 anos que foram tratadas com a quimioterapia seguida ou não de radioterapia. A função gonadal foi determinada por exames clínicos, hormonais (LH, FSH, estradiol, progesterona), e por ultra-sonografia. Duas das pacientes em cada grupo morreram da doença refratária. Das 16 pacientes restantes, 15 (93.7%) recomeçaram as menstruações espontâneas e a ovulação dentro de 3-8 meses após o término do co-tratamento combinado. Por outro lado, somente 7 das 18 pacientes (39%) similarmente tratadas no grupo de controle (quimioterapia sem GnRH) recomeçaram a atividade cíclica ovariana (menstruações

regulares) e 11 pacientes apresentaram falência ovariana precoce (61%). Com esses dados, os autores sugeriram que o co-tratamento com GnRH permitiria um efeito protetor significativo aos danos ovarianos provocados pela quimioterapia.

HOWELL e SHALETT (1998) apresentaram um estudo de revisão no qual descreveram os principais agentes quimio e radioterápicos que apresentam efeito gonadotóxico. Agentes alquilantes, como ciclofosfamida e procarbazona, são os que apresentam mais comumente essas implicações. O estudo afirmou que a grande maioria dos homens que recebem tratamento para linfoma torna-se permanentemente infértil e que a quimioterapia com a cisplatina, para câncer testicular, resulta em azoospermia temporária em um grande número de pacientes, com uma recuperação da espermatogênese em aproximadamente 50% após 2 anos e em 80% após 5 anos. Os autores descreveram o epitélio germinativo como muito sensível aos danos provocados pela radioterapia, sendo a dose de 0.1 Gy suficiente para provocar alterações em espermatogônias e 2 Gy para causar esterilidade definitiva e esclareceram que a falência ovariana precoce, provocada pela quimioterapia, é idade e dose-dependente.

MEIROW, FASOULIOTIS, NUGENT, SCHENKER, GOSDEN e RUTHERFORD (1999) realizaram uma técnica laparoscópica para obter espécimes corticais de tecido ovariano para a manutenção da fertilidade em pacientes com câncer. O estudo foi feito com 20 voluntárias que se submeteram a procedimentos ginecológicos de laparoscopia rotineiros com idade entre 25 e 34 anos e 20 pacientes com idade entre 11 e 30 anos com o câncer avançado requerendo radio ou quimioterapia potencialmente esterilizante. Todos os espécimes das biópsias foram criopreservados e a avaliação histológica confirmou a presença de diversos folículos primordiais, o que levou os autores a concluir que a biópsia ovariana por

laparoscopia é um método seguro e eficiente para coletar o tecido ovariano para criopreservação em pacientes com câncer.

2.2 CRIOPRESERVAÇÃO

RALL (1987) estudou os fatores que afetam a sobrevivência de embriões de ratos criopreservados pela vitrificação e determinou que esses incluem a concentração e a composição da solução de vitrificação, o procedimento usado para o equilíbrio entre os crioprotetores e os embriões nesta solução, as circunstâncias de congelamento e de aquecimento e o procedimento usado na diluição da solução de vitrificação. Obtiveram taxas elevadas de sobrevivência quando os embriões foram desidratados antes da vitrificação nos meios constituídos por solução salina e concentrações multimolares de misturas de crioprotetores. A completa permeabilidade dos crioprotetores às células não é necessária e pode conduzir à toxicidade química e ao choque osmótico. A permeabilidade parcial e a concentração de macromoléculas citoplasmáticas endógenas aumentam extremamente a probabilidade de vitrificação intracelular. O autor concluiu que a vitrificação constitui um método prático para a criopreservação do embrião e oferece oportunidades novas de avaliar aspectos fundamentais da crioproteção e criolesão.

GOSDEN, BAIRD, WADE e WEBB (1994), em ovelhas, demonstraram a possibilidade da criopreservação e do reimplante de tecido ovariano. Os resultados obtidos quanto à evolução e à dinâmica da população folicular, assim como a distribuição e as características dos folículos individuais e a produção hormonal, são favoráveis ao transplante de secções de tecido ovariano. O estudo demonstrou que folículos primordiais podem sobreviver a pequenos períodos de isquemia e podem se desenvolver com produção de oócitos viáveis. Se os enxertos puderem ser inseridos em locais com

grande suprimento sangüíneo, a fim de diminuir o tempo de isquemia, ocorre a sobrevivência de maior número de folículos.

CANDY, WOOD e WHITTINGHAM (1995), em estudo com enxertos de tecido ovariano em cápsula renal a fresco e criopreservado de sagüi em camundongos da espécie *Nude*, demonstraram que a proporção de folículos normais apresenta-se similar em tecido a fresco e criopreservado, sugerindo que o processo de criopreservação não afeta substancialmente o tecido ovariano de sagüis, e que o enxerto desse tecido recuperou a capacidade de foliculogênese e secreção hormonal, comprovado pela presença de células cornificadas nos esfregaços vaginais das amostras após o transplante. Também demonstraram que o método de congelamento lento utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) é satisfatório.

NEWTON, AUBARD, RUHERFORD, SHARMA e GOSDEN (1996), em estudo realizado com camundongos, confirmaram a viabilidade do enxerto de tecido ovariano humano, bem como a sua revascularização e a sobrevida folicular após a criopreservação. O estudo demonstrou que a sobrevivência folicular após enxerto de tecido ovariano humano a fresco e criopreservado em camundongos com imunodeficiência combinada severa (SCID), atinge níveis entre 50 e 80%, sendo que folículos imaturos podem ser mais resistentes à criopreservação. Teoricamente, isso se deve ao fato de que eles são menores e sua zona pelúcida ser indiferenciada, apresentando baixo metabolismo. O trabalho indica a importância na escolha de um meio crioprotetor que ofereça a menor probabilidade de isquemia no tecido. Observaram que a criopreservação com dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PROH) e etilenoglicol (EG), apresentavam resultados significativamente melhores do que a com o glicerol (GLY). A análise histológica de cortes de tecido ovariano a fresco, após o processo de criopreservação e, decorrido o enxerto, foi

realizada pela coloração de hematoxilina-eosina e a observação feita em microscópio ótico.

OKTAY, NUGENT, SALHA, CHATTERJEE e GOSDEN (1997), estudando amostras de tecido ovariano de mulheres entre 25 e 32 anos, obtiveram, com sucesso, o isolamento de folículos primordiais tanto em tecido a fresco, quanto no criopreservado. Verificaram, em ambos os tecidos, a viabilidade folicular através da técnica da fluorescência por microscopia eletrônica, comprovando que a criopreservação e o isolamento folicular não acarretam dano celular.

GUANASENA, LAKEY, VILLINES, CRITSER e CRITSER (1997), pesquisando o transplante alogênico e xenogênico de tecido ovariano a fresco e criopreservado em camundongos sem o timo, demonstraram, através de dosagens hormonais, que houve a preservação endócrina dos implantes. A criopreservação não possuiu um efeito de detrimento na função ovariana do tecido transplantado, já que se observaram ciclos estrogênico e prenhez.

NEWTON, FISHER, ARNOLD, PEGG, FADDY e GOSDEN (1998) avaliaram a permeabilidade do tecido ovariano humano aos agentes crioprotetores no processo de criopreservação ovariana. Foram investigadas as difusões de quatro crioprotetores no tecido humano a 4° e a 37°C. Avaliaram também o efeito de concentrações diferentes de sacarose aos meios de congelamento usando a dosagem de liberação de lactato-desidrogenase como uma medida de seu efeito protetor. A 4 °C o glicerol e o propilenoglicol (PROH) penetraram o tecido de maneira significativamente mais lenta do que o etilenoglicol (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO). À temperatura de 37° , os quatro penetraram mais rapidamente, mas o aumento da toxicidade impediu o uso destas circunstâncias na prática. Avaliando os resultados, os autores sugeriram que o melhor método de preparar o tecido para a criopreservação é a exposição por 30 minutos a soluções de EG ou DMSO a 1.5 M, a 4°C, que permite uma permeabilidade de 80% da solução crioprotetora ao tecido ovariano. Os autores relataram que a

adição de concentrações baixas de sacarose ao meio de congelamento não apresenta efeito crioprotetor significativo.

SALLE, LORNAGE, FRANCK, ISOARD, RUDIGOZ e GUERIN (1998), em ovelhas, fizeram a avaliação histológica de fragmentos de tecido ovariano, comparando os resultados em autotransplante a fresco em pedúnculo ovariano e criopreservados em nitrogênio líquido por 15 dias. Os resultados demonstraram que, após o transplante, houve presença de folículos primordiais, primários, secundários e folículos com cavidade.

AUBARD, NEWTON, SCHEFFER e GOSDEN (1998), estudando o autotransplante ortotópico de tecido ovariano a fresco e criopreservado em ratos irradiados, demonstraram que o congelamento preserva uma proporção da população folicular. Concluíram que o tecido ovariano de ratos pode ser criopreservado em DMSO ou EG com sucesso, utilizando protocolo de congelamento lento e descongelamento rápido. Os enxertos criopreservados apresentaram, aparentemente, funções normais, indicando ainda que o tecido irradiado é capaz de aceitar o transplante.

BAIRD, WEBB, CAMPBELL, HARKNESS e GOSDEN (1999) em estudo semelhante ao de SALLE et al. (1998), com ovelhas, obtiveram resultados que indicavam que, apesar da redução do número de folículos primordiais, a função cíclica ovariana nesses animais foi preservada após o autotransplante de tecido ovariano criopreservado, isso demonstrado pela análise histológica e dosagens dos níveis séricos de FSH e LH.

NISOLLE, CASANAS-ROUX, QU, MOTTA e DONEY (2000), em estudo com transplante de tecido ovariano humano a fresco e criopreservado em camundongos *Nude*, compararam a histologia e as características ultraestruturais desses enxertos, tanto em região subcutânea quanto intraperitoneal, com as de biópsia ovariana. Maior fibrose foi encontrada em tecido criopreservado, porém o processo

pareceu não afetar a população de folículos primários e primordiais e suas características ultraestruturais.

CLEARY e NEVE (2001) avaliaram como o período decorrido entre a morte de uma rata doadora e a coleta de seu tecido ovariano, para posterior criopreservação, afeta a integridade e viabilidade dos folículos. Os ovários das ratas foram colocados em solução de salina fosfatada (PBS)+antibiótico *in vitro* ou *in situ* em ratas receptoras após terem permanecido a temperatura ambiente durante 0, 3, 6, 12, ou 24 horas seguidas da morte da doadora. Foram então criopreservados a 1°C/min em gelo seco ou 84°C negativo em *freezer* usando um dispositivo de refrigeração passiva ou protocolo de congelamento lento convencional (0.3 grau C/min). As amostras de ovário foram transplantados sob a cápsula renal de ratas ooforectomizadas e retiradas duas semanas mais tarde, determinando-se o tamanho e o número dos folículos dos implantes. O tecido ovariano criopreservado transplantado imediatamente após a morte do doador apresentou número maior de folículos saudáveis do que os tecidos mantidos a temperatura ambiente por tempos variáveis antes do transplante. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as diferentes taxas de refrigeração testadas, indicando que um recipiente refrigerador passivo que diminua a temperatura em 1°C/min constitui uma alternativa apropriada ao protocolo de congelamento lento convencional. Com o estudo, concluiu-se que o tecido ovariano deve ser criopreservado o mais rápido possível após a retirada ou a morte do animal a fim de assegurar a máxima sobrevivência folicular.

GOOK, Mc CULLY, EDGAR e Mc BAIN (2001), em estudo com enxertos de tecido ovariano humano a fresco e criopreservado, em camundongos com SCID, demonstraram que se pode utilizar os implantes ovarianos para a avaliação dinâmica de desenvolvimento folicular *in vivo*. A ausência de alteração morfológica dos folículos

confirmou a boa conservação com o uso do propanodiol e sacarose como crioprotetores.

ABIR, ORVIETO, RAANANI, FELDBERG, NITKE e FISCH (2003) compararam o desenvolvimento e a sobrevivência de folículos humanos fetais criopreservados com dimetilsulfóxido (DMSO) e propanodiol (PROH) em ratos com imunodeficiência a fim de estudar os efeitos do tratamento do receptor com FSH, e para comparar o transplante subcutâneo e sob a cápsula renal. O estudo histológico foi realizado pela análise morfométrica e imunocitoquímica para PCNA dos transplantes. Os resultados obtidos indicaram que os transplantes sob a cápsula renal, que foram criopreservados com DMSO, apresentaram maior viabilidade do que os congelados com PROH (79.6% em relação a 58.8%), mas o número de folículos encontrados foi significativamente maior em enxertos de tecido submetidos a esse crioprotetor ($p < 0.001$). O desenvolvimento folicular foi observado somente em camundongos tratados com FSH. A sobrevivência e o desenvolvimento folicular dos transplantes apresentaram-se melhores em enxertos sob a cápsula renal em relação ao implante subcutâneo, provavelmente por causa de sua maior vascularização. A administração de FSH ao receptor do transplante é essencial para o desenvolvimento folicular. Este foi o primeiro estudo mostrando o desenvolvimento de folículos fetais humanos em ratos com imunodeficiência.

2.3 ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – PCNA

MIYACHI, FRITZLER e TAN (1978) descobriram o PCNA durante experimentos com soro de pacientes com lúpus eritematoso

sistêmico, em virtude de sua reação positiva com os núcleos de células em proliferação e negativa com os das células restantes de tecido normal humano. Verificaram que sua distribuição no ciclo celular aumentava a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não eram identificados por métodos imunohistoquímicos.

OKTAY, SCHENKEN e NELSON (1985) concluíram que o PCNA constitui um marcador sensível dos eventos precoces de crescimento folicular. O aumento da expressão deste antígeno se correlaciona com os estágios iniciais do desenvolvimento das células da granulosa e, por isso, os oócitos iniciam a positividade para PCNA antes de sua expansão. Também obtiveram a informação de que a imunorreação para o PCNA permanece prevalecente em folículos nas células da granulosa e da teca em estágios subseqüentes de desenvolvimento folicular e diminui progressivamente na atresia.

KURKI, VANDERLAAN, DOLBEARE, GRAY e TAN (1986) demonstraram, através de análises de citometria de fluxo, que a expressão do PCNA é fortemente dependente da fase em que o ciclo celular se encontra. Ocorre um aumento insignificante da positividade do PCNA na maioria das células em G1 comparando-se às células em G0. Quando as células estão em G1 tardia, a expressão de PCNA aumenta visivelmente e continua a aumentar durante a síntese de DNA (fase S) do ciclo celular. Na fase G2-M, o conteúdo de PCNA diminui a valores intermediários entre aqueles encontrados entre as fases G1 e S. O aumento da expressão de PCNA não depende da progressão de células em S.

TOSCHI e BRAVO (1988) relataram estudo no qual avaliaram as mudanças da distribuição do PCNA durante o processo de reparação do DNA em fibroblastos quiescentes de pele humana irradiados com raios ultravioleta.

HUANG, COLTRERA, SCHUBERT, MORTON e TRUELOVE (1994) afirmaram que o atual conhecimento dos mecanismos reguladores do ciclo celular levou à descoberta de alguns antígenos celulares expressos em células em proliferação (marcadores de proteínas), que podem ser identificados por métodos imunohistoquímicos, através da utilização de anticorpos específicos para esses antígenos. O PCNA é um desses marcadores e tem sido utilizado em análises mostrando resultados promissores, principalmente como marcador diferencial entre lesões benignas e malignas. Uma grande vantagem desse marcador é a possibilidade de utilização em tecidos fixados pelo formol e incluídos em parafina, método mais utilizado no preparo dos tecidos para exames histopatológicos.

SCHONBORN, MINGUILLON, RELES, BARTEL e LICHTENEGGER (1996) determinaram o valor prognóstico da fração proliferativa de PCNA em comparação aos fatores clínicos e histomorfológicos convencionais (estágio FIGO, tipo do tumor, classificação histológica, *status* do nódulo de linfoma, tamanho do tumor residual) investigados em 81 pacientes com câncer de ovário e concluíram que o PCNA fornece informação adicional a fim de determinar estimativas prognósticas para o câncer ovariano.

KHAN-DAWOOD, DAWOOD e TABIBZADEH (1996), em estudo realizado com babuínos, fizeram uma análise imunohistoquímica da microanatomia dos ovários desses animais, determinando o grau semiquantitativo de imunorreatividade do PCNA para diversas partes anatômicas dos ovários e a manifestação do PCNA em atresia folicular.

LUNDY, SMITH, O'CONNELL, HUDSON e McNATTY (1999), em estudo realizado com ovelhas, utilizaram a técnica de PCNA para identificação do crescimento folicular relacionado à proliferação da camada da granulosa.

3 MÉTODO

3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Utilizaram-se 10 coelhas *Oryctologus cunicullus*, *Lagomorpha mammalia*, brancas, da linhagem Nova Zelândia, multíparas, com idade de um ano e três meses a dois anos e quatro meses, e peso de 3,5 a 4,5 kg.

3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Acondicionaram-se as coelhas em gaiolas individualizadas, próprias para a espécie, previamente identificadas, sob ciclo claro/escuro e temperatura e umidade ambientes, sem regulação artificial. Ofereceu-se como alimentação ração comercial própria para a espécie e água à vontade.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Desenvolveu-se o estudo no Laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Maringá, respeitando-se a legislação brasileira para o uso de animais de experimentação – Lei Federal n.º 6.638 (1979)¹ e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e da Universidade Estadual de Maringá.

3.3.1 Anestesia

¹ BRASIL. Lei Federal n.º 6638 de 08 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.1, 10 de maio de 1979.

Anestesiaram-se as coelhas com aceprazina 0,2% - 0,2 ml/kg; acedopina 0,1 ml/kg e cloridrato de 2-2,6-xilidina dihidrotiazina 3mg/kg e para a analgesia empregou-se cloridrato de quetamina 10% - 35 mg/kg, intramuscular.

3.3.2 Preparo do animal

Fez-se a tricotomia mecânica da parede ventral do abdômen indo das rebordas costais até 1,0 cm abaixo das pregas inguinais.

3.3.3 Laparotomia e ooforectomia

Seguiu-se a anti-sepsia com tintura de polivinilpirrolidona-iodo e colocação de campos estéreis. Efetuou-se a laparotomia mediana de aproximadamente 5 cm, incisando-se a pele, a tela subcutânea e a tríade peritoneal. Inventariou-se a cavidade abdominal, pois animais com doenças seriam desprezados e identificaram-se os ovários. Realizou-se a secção do meso-ovário entre ligaduras feitas com fio de categute simples 3.0, com retirada do ovário direito e revisão da hemostasia. Fez-se a laparorrafia com 2 planos de síntese, o primeiro, peritônio-músculo-aponevrótico e o segundo o da pele. Para ambos os planos utilizaram-se fios 4.0 monofilamentar de náilon.

Recuperados da anestesia, devolveram-se os animais às suas gaiolas onde permaneceram até a data prevista para a nova etapa do experimento.

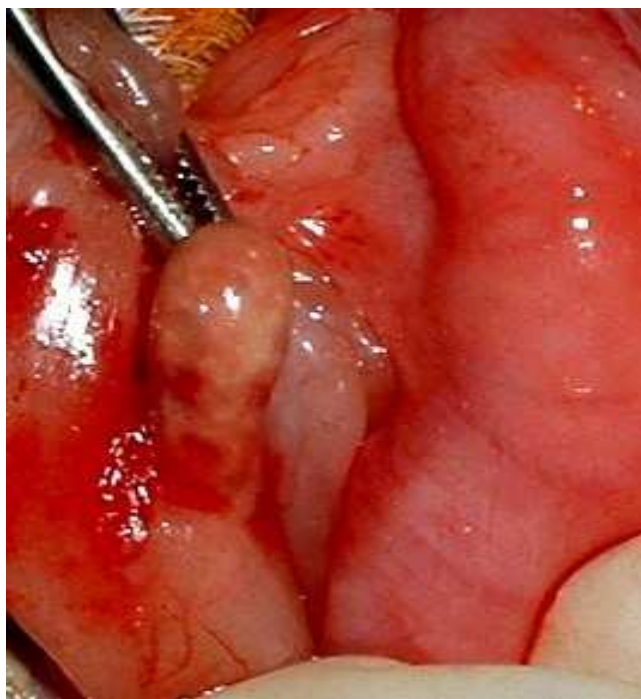


Figura 1 - Ovário direito contido por pinça hemostática

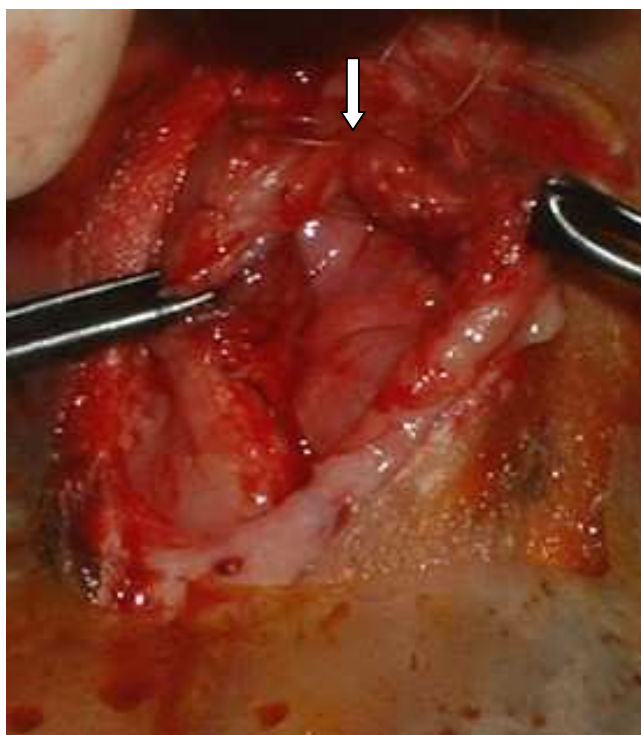


Figura 2 - Aspecto da síntese do plano peritônio-músculo-aponevrótico (↓)



Figura 3 - Aspecto macroscópico de ovário normal não congelado

3.3.4 Preparo dos ovários

O ovário direito, depois de removido, foi dissecado, mantendo-se o córtex com a espessura de, aproximadamente, 1,5 milímetros; e lavado diversas vezes em solução salina tamponada fosfatada (PBS) à temperatura ambiente a fim de se remover o excesso de sangue. O tecido foi fragmentado em pequenas secções. Alguns segmentos de cada ovário foram reservados para estudo histológico e outros foram congelados de acordo com o protocolo de congelamento lento/rápido descongelamento:

- as secções foram colocadas em PBS com glicose e piruvato contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,5 M e soro bovino fetal a 10%. Fez-se a homogeneização por 30 minutos a 4°C e introduziram-se as secções em *payettes*;
- o congelamento iniciou a 4°C até -9°C em um *freezer* programável (Biocool®), com diminuição da temperatura em 2°C por minuto;

- seguiu-se a indução da cristalização com o toque de um dos lados do *payette* com fórceps previamente refrigerado em nitrogênio líquido; e
- após 5 minutos, continuou-se o processo com diminuição da temperatura até -40°C, a 0,3°C por minuto, e então o tecido foi transferido a nitrogênio líquido a -196°C.

3.3.5 Descongelamento

Seis semanas após esse procedimento, colocaram-se os *payettes*, com tecido ovariano congelado, à temperatura ambiente por 2 minutos e então se imergiu em água a 37°C até a fusão do gelo (2-3 minutos). Retiraram-se as secções de tecido dos *payettes* e removeu-se a solução crioprotetora com repetidos banhos de meio PBS com glicose e piruvato. Fixaram-se as amostras do tecido criopreservado em formalina a 10%.

Seguiu-se a preparação dos blocos de parafina, das peças não congeladas e das criopreservadas e descongeladas dos quais se obtiveram cortes com 3 micrômetros de espessura e montaram-se estes cortes histológicos em lâminas. Procedeu-se à coloração pela hematoxilina-eosina para estudo histológico geral e ao método imunohistoquímico para avaliação da preservação e desenvolvimento folicular através da técnica de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*).

3.3.6 Técnica de PCNA

Utilizou-se o método da estreptavidina-biotina, usando-se o anticorpo anti-PCNA (PC-10 – Dako® A/S. Denmark – diluição: 1:100). Desparafinizaram-se os cortes histológicos com 2 banhos de Xilol por 10 minutos. Seguiram-se 2 banhos de álcool absoluto por 3

minutos; um banho de álcool 70% por 3 minutos e 2 banhos de água destilada por um minuto.

Objetivando-se a recuperação antigênica tecidual, submeteu-se o material a tratamento com solução tamponada de citrato de sódio e ácido cítrico (10 mM, pH 6,0) por 25 minutos a 95°C. Fez-se o bloqueio da peroxidase endógena esfriando-se as lâminas por 30 minutos, na própria solução de citrato e em seguida diluiu-se H₂O₂ a 30% em água destilada e banharam-se as lâminas por 5 minutos. Por fim enxaguou-se com água corrente.

Seguiu-se o banho com tampão PBS com detergente Tween[®] 20 por 5 minutos. Diluiu-se o anticorpo anti-PCNA na proporção 1:100. Identificaram-se as áreas dos cortes com caneta hidrófoba. Incubaram-se as lâminas com anticorpo monoclonal específico anti-PCNA (Ac primário) durante 60 minutos. Procedeu-se ao banho com tampão PBS com detergente Tween[®] 20 por 5 minutos. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário biotinilado (anti-Ig) (estreptavidina-biotina) durante 30 minutos e após a aplicação do cromógeno Diaminobenzina (DAB).

Fez-se a observação da “virada”, verificando-se, com uso de microscópio óptico, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. Seguiu-se banho de 3 a 5 minutos em água destilada para bloquear a reação e então se fez a contra-coloração das lâminas com Hematoxilina de Harris.

3.3.7 Avaliação histológica geral

Nos cortes corados com hematoxilina-eosina observou-se a presença e o número de folículos. Estudaram-se as características nucleares e citoplasmáticas dos folículos e das células da camada lútea (células do corpo lúteo que são derivadas das células

granulosas e das células da teca do folículo maduro) e do estroma (células do tecido conjuntivo de um órgão que são encontradas no tecido conjuntivo frouxo) e analisaram-se as condições histológicas do tecido conjuntivo do ovário e a vascularização.

Os folículos foram classificados de acordo com o critério modificado de OKTAY (1995), da seguinte maneira:

- **primordiais:** apresentam uma camada de células retangulares pré-granulosas ao redor do oócito (células esparsas);
- **primários:** ao menos uma das camadas de células pré-granulosas apresenta-se cubóide ou colunar até formarem uma única camada de células granulosas cubóides;
- **secundários:** duas ou mais camadas de células granulosas envolvem o oócito. Sem formação de antro; e
- **antrais:** três ou mais camadas de células granulosas, com cavidade antral.

Nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina pôde-se procurar alterações celulares como:

- **lise estromal:** quanto maior a histólise, menor a possibilidade de regeneração e maior a de cicatrização. A lise do estroma dificulta a regeneração, já que este funciona como guia e suporte (VASCONCELOS, 2000);

- **distribuição irregular da cromatina:** alteração da permeabilidade da membrana plasmática a corantes não vitais e vitais, e dissolução citoplasmática lenta, sem os fenômenos abruptos que caracterizam a lise celular. A cromatina adquire uma distribuição irregular, podendo acumular-se em grumos na membrana nuclear; havendo perda dos limites nucleares (SANTA ROSA, 2004);

- **lise celular:** proteínas citolíticas criam poros na membrana da célula que, sendo incapaz de excluir íons e água, resulta em uma expansão osmótica levando à morte por arrebentamento;
- **picnose:** o núcleo apresenta um volume reduzido e torna-se hipercondensado, tendo sua cromatina condensada; característico na apoptose;
- **cariólise ou cromatólise:** há dissolução da cromatina e perda da coloração do núcleo, o qual desaparece completamente.

As modificações citoplasmáticas, secundárias às nucleares, consistem na presença de granulações e espaços irregulares no citoplasma. Este se torna opaco, grosseiro, podendo estar rompida a membrana citoplasmática. Intensa eosinofilia é característica, decorrente de alterações lisossomais e mitocondriais. As alterações são:

- **degenerações hialinas:** decorrentes da produção e do acúmulo de proteínas no interior de células ou em tecidos, que tomam aspecto hialino (homogêneo e eosinófilo). Portanto, as proteínas têm, histologicamente, aspecto homogêneo e brilhante, ou refringente, que lembra vidro, e cor rósea forte quando coradas por hematoxilina-eosina.
- **vacuolização citoplasmática:** devida à entrada de fluido extracelular e de eletrólitos em uma célula, secundária à deficiência na atividade das enzimas de degradação da adenosina trifosfato - ATPases (bombas de Na/K) da membrana celular, levando ao acúmulo de água no citoplasma. É reversível, desde que não muito intensa ou prolongada.
- **atrofia:** diminuição adquirida do volume de um órgão ou tecido normalmente desenvolvido, através de redução no número ou no volume das células, ou ambos. (PAES, 2004).

3.3.8 Análise imunohistoquímica

Quantificou-se o índice de expressão do PCNA pela observação dos núcleos celulares marcados e não marcados com anticorpo monoclonal anti-PCNA em cada corte histológico. Para este experimento, consideraram-se PCNA-positivas todas as células com coloração nuclear acastanhada, independentemente da intensidade desta coloração. Para a análise imunohistoquímica contaram-se 100 células da camada de células lúteas; 100 células estromais e verificados os folículos com ao menos uma célula da granulosa PCNA positiva, sendo esses considerados como apresentando desenvolvimento inicial. Conduziu-se este processo em microscópio óptico comum munido de lente ocular de 10x e objetiva de 40x, com magnificação final de 400x. (Nikon-Eclipse® E200). Calculou-se a porcentagem de células PCNA positivas e negativas para as células estromais e lúteas de cada lâmina.

3.3.9 Análise estatística

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de tabela e gráfico. Para a comprovação do objetivo levantado nesse trabalho foi utilizado o teste não-paramétrico “Comparação entre duas Proporções” (através do software “*Primer of Biostatistics*”) e os testes paramétricos t de *student* e não paramétrico de Mann-Whitney. Estabeleceu-se $p \leq 0,05$ ou 5% como nível para rejeição da hipótese de nulidade.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA GERAL

Nos cortes histológicos submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina, observou-se, no tecido não congelado, a presença de todos os tipos foliculares, enquanto nos cortes criopreservados encontraram-se exclusivamente folículos primordiais. A Tabela 1 descreve as características histológicas encontradas no tecido não congelado e no tecido criopreservado.

Tabela 1 - Características histológicas encontradas nos grupos, em porcentagem

Características histológicas	Tec. Não Congelado	Tec.Criopreservado	Valor de p
Vacuolização citoplasmática	50,0	100,0	0,039
Pícnose	0,0	30,0	0,210
Lise estromal	30,0	50,0	0,648
Distribuição irregular da cromatina	10,0	70,0	0,022
Fragmentação das células da granulosa	30,0	80,0	0,072
Oócito com contornos irregulares	10,0	80,0	0,007
Degeneração hialina	0,0	30,0	0,210

Na comparação entre os grupos (tecido não congelado x tecido criopreservado - Figura 4) em relação às características histológicas, foi observada diferença estatisticamente significativa, com maior predomínio para o grupo de tecido criopreservado:

- vacuolização citoplasmática ($p=0,039$);
- distribuição irregular da cromatina ($p=0,022$);
- oócito com contorno irregular ($p=0,007$).

Na fragmentação das células da granulosa também foi observado predomínio para o grupo do tecido criopreservado ($p=0,072$), no entanto, sem diferença estatisticamente significativa (probabilidade limítrofe que indica tendência).

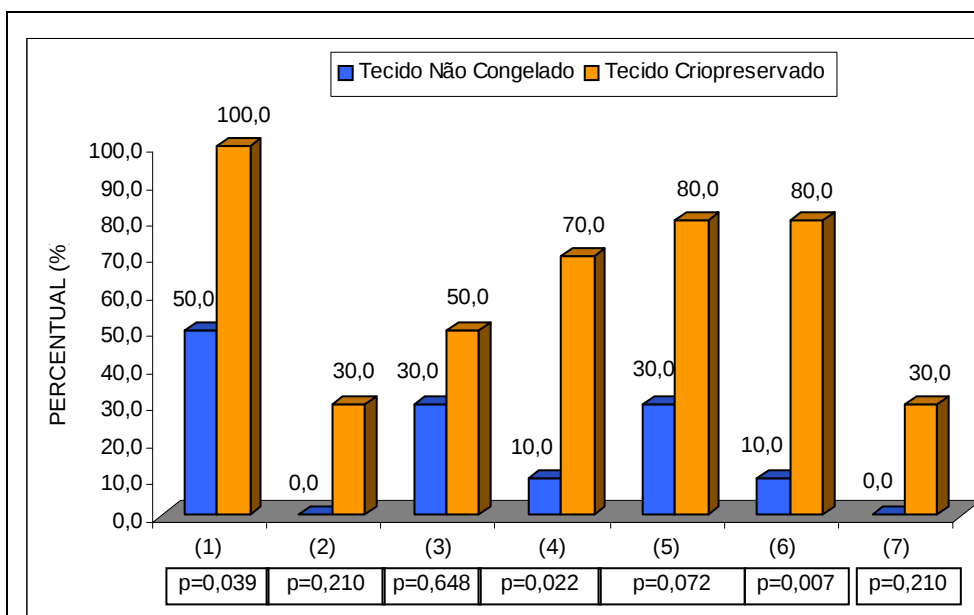


Figura 4 - Características histológicas encontradas nos grupos

Fonte: tabela 1

(1) Vacuolização citoplasmática

(2) Picnose

(3) Lise estromal

(4) Distribuição irregular da cromatina

(5) Fragmentação das células da granulosa

(6) Oócito com contornos irregulares

(7) Degeneração hialina

Nas fotomicrografias 5 a 13 observam-se as características histológicas visibilizadas em cortes de tecido ovariano corados com hematoxilina-eosina.



Figura 5 - Fotomicrografia de ovário demonstrando folículo secundário em tecido não congelado (HE - 400X)



Figura 6 - Fotomicrografia com folículo primário em tecido não congelado (HE- 400X)

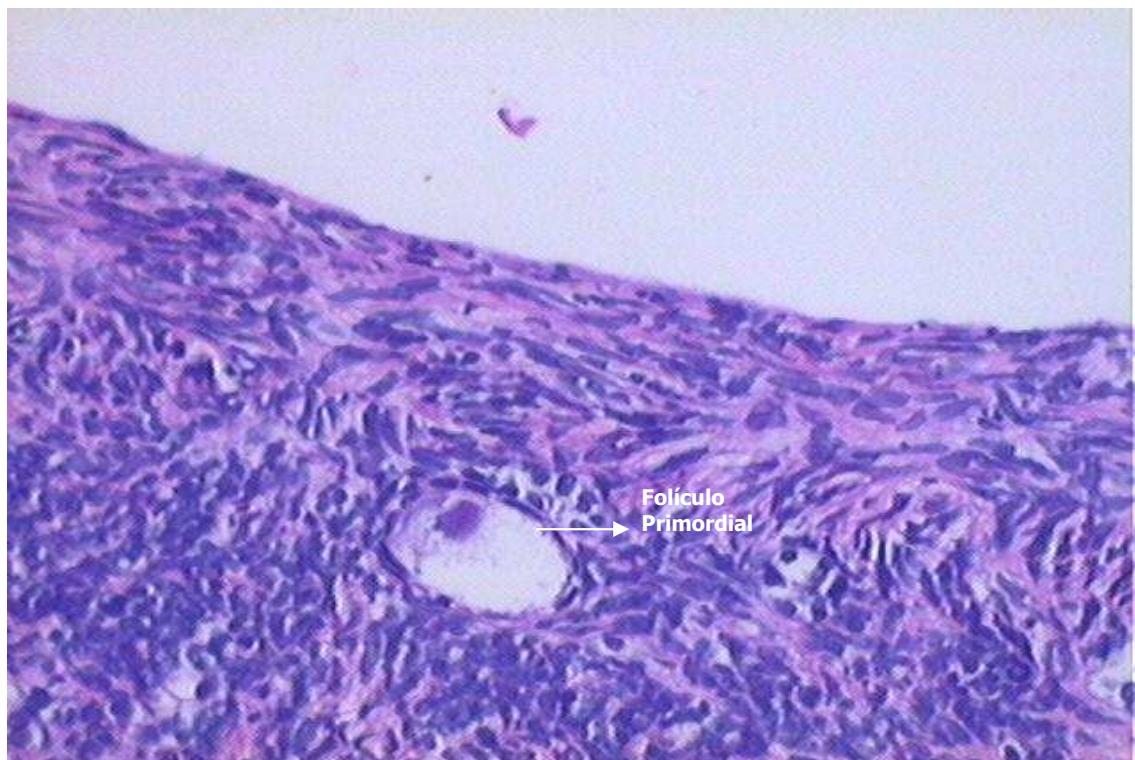


Figura 7 - Fotomicrografia com visibilização de folículo primordial em tecido criopreservado (HE- 100 X)



Figura 8 - Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado demonstrando folículo primordial com contornos irregulares (HE - 400X)

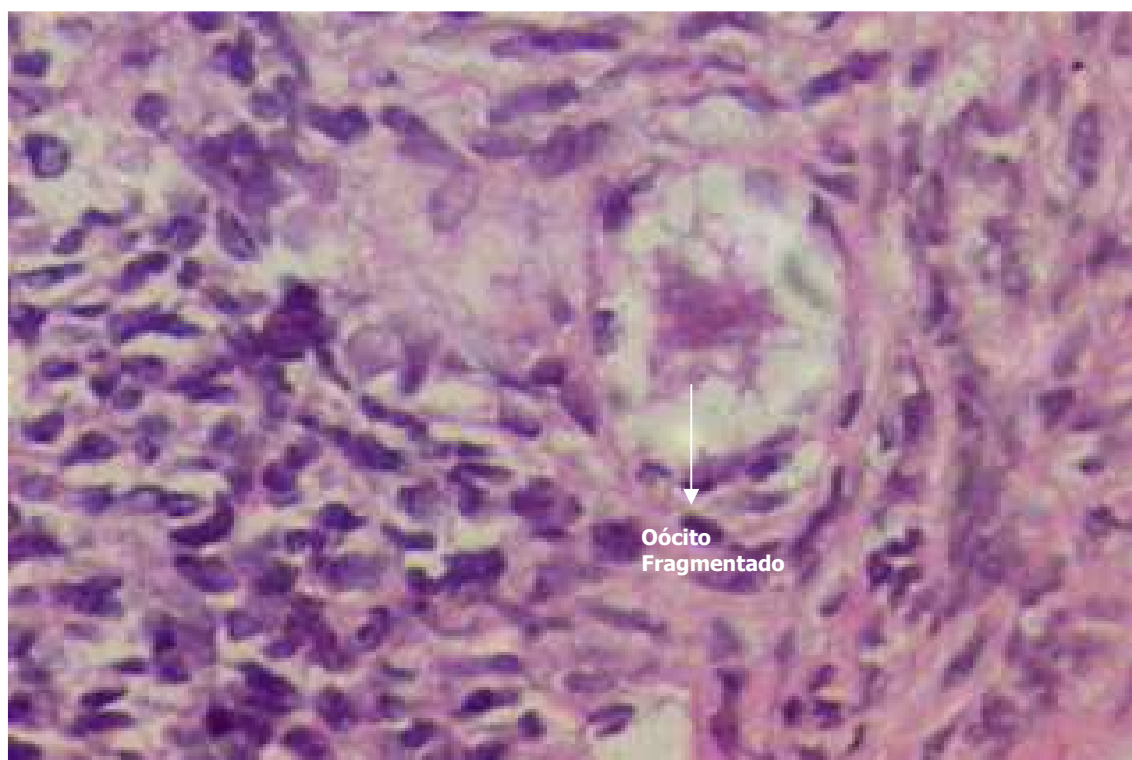


Figura 9 - Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado em que se observa fragmentação do oócito (HE - 400X)

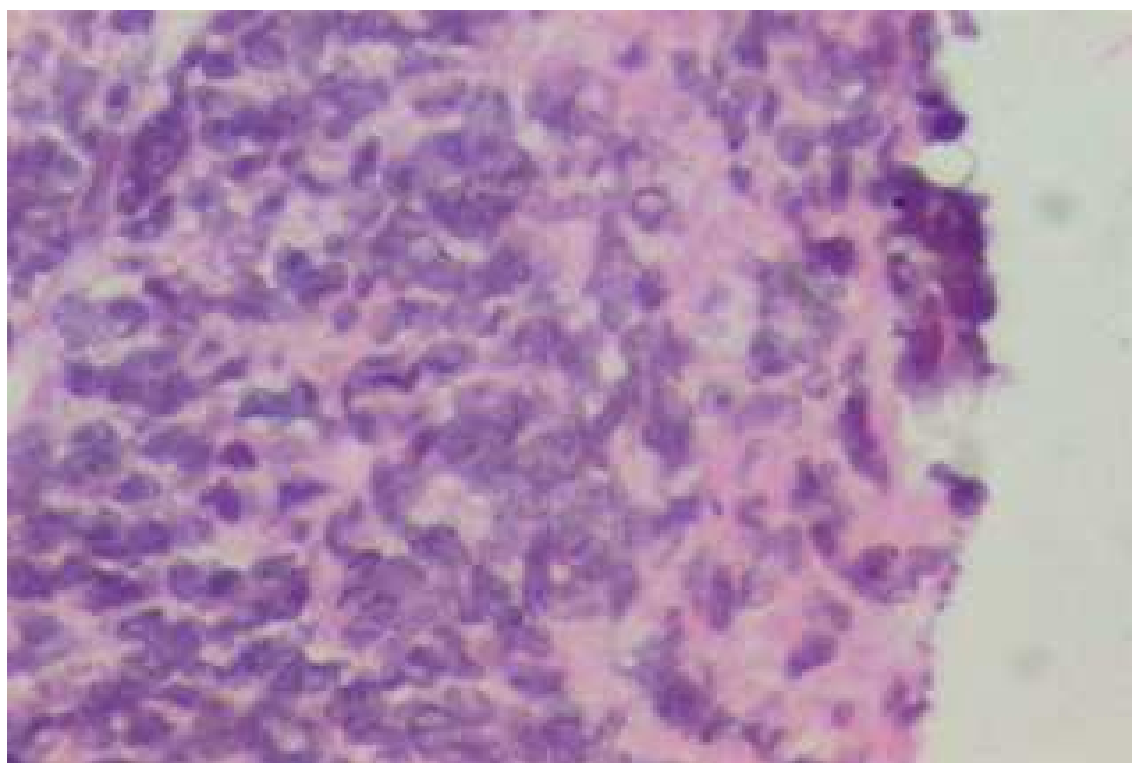


Figura 10 - Fotomicrografia de tecido ovariano demonstrando distribuição irregular da cromatina (HE - 400X)

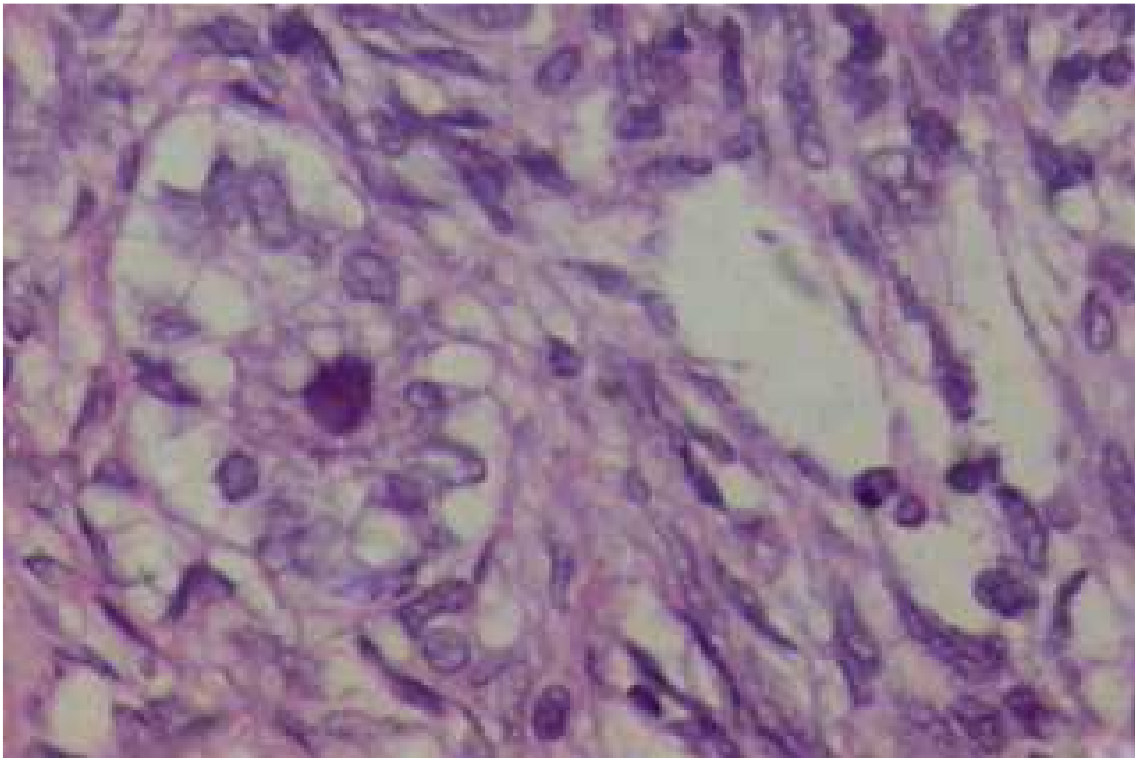


Figura 11 - Fotomicrografia de ovário na qual se verificam vacuolizações citoplasmáticas (HE - 400X)

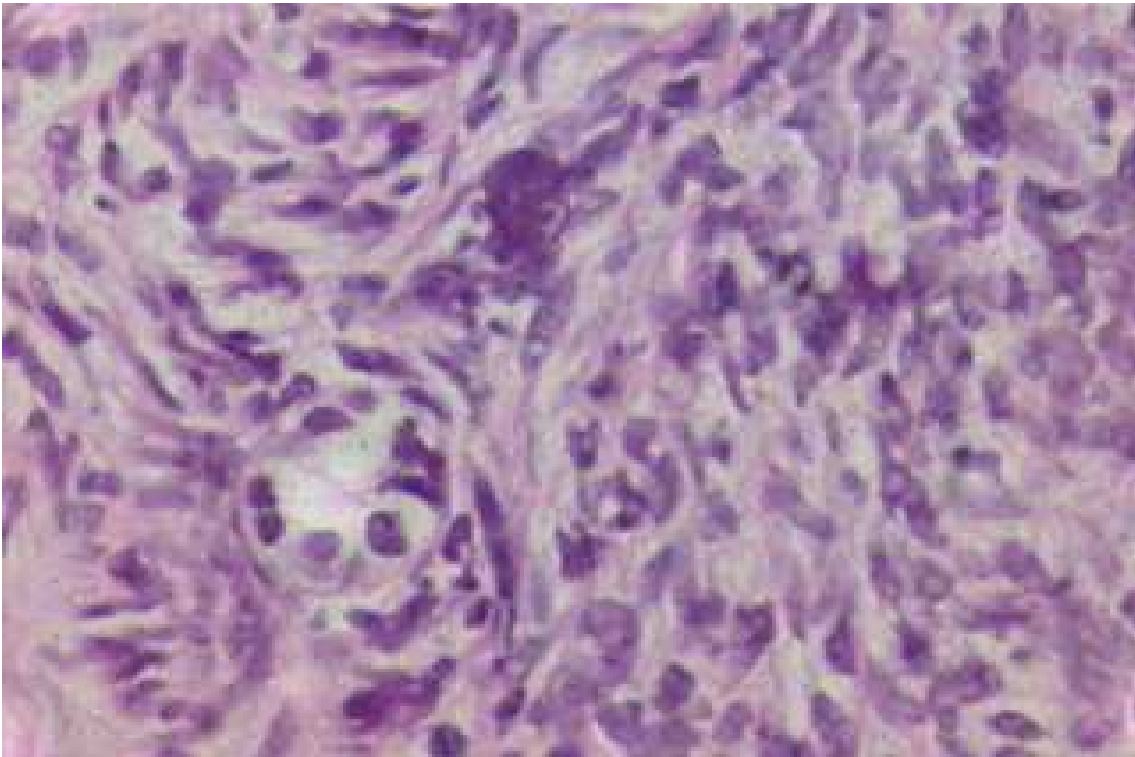


Figura 12 - Fotomicrografia de tecido ovariano demonstrando fragmentação nuclear das células da granulosa (HE - 400X)

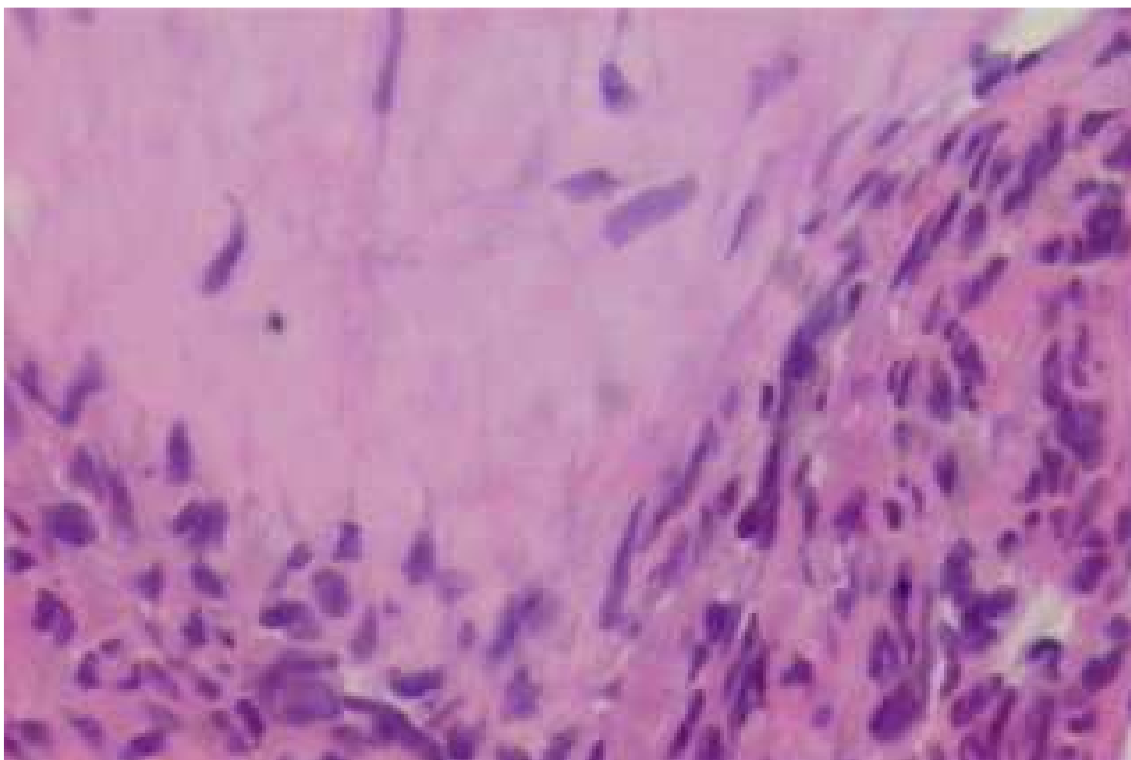


Figura 13: Fotomicrografia de tecido ovariano criopreservado com visibilização de degeneração hialina (HE - 400X)

4.2 Análise imunohistoquímica por PCNA

As lâminas submetidas à análise imunohistoquímica apresentaram positividade para PCNA semelhantes em tecido não congelado e tecido criopreservado, conforme indicado no Quadro 1 e Tabela 2. Na análise comparativa em relação ao tipo de tecido pode-se afirmar que os resultados encontrados no tecido não congelado não são estatisticamente diferentes dos resultados encontrados no tecido criopreservado, em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 2 - Análise imunohistoquímica por PCNA das células lúteas e estromais do tecido não congelado e criopreservado – valores em porcentagem de positividade

AMOSTRA	TECIDO NÃO CONGELADO				TECIDO CRIOPRESERVADO			
	CL – Células Lúteas		CE – Células Estromais		CL-Células Lúteas		CE-Células Estromais	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
1	74	26	17	83	89	11	25	75
2	77	23	12	88	68	32	35	65
3	69	31	10	90	64	36	10	90
4	74	26	16	84	62	38	12	88
5	72	28	25	75	59	41	11	89
6	80	20	13	87	69	31	12	88
7	75	25	28	72	68	32	25	75
8	63	37	18	82	80	20	10	90
9	54	46	23	77	62	38	25	75
10	84	16	22	78	63	37	11	89
Média	72,2	27,8	18,4	81,6	68,4	31,6	17,6	82,4
Desvio	8,6	8,6	5,9	5,9	9,3	9,3	9,0	9,0
Mínimo	54,0	16,0	10,0	72,0	59,0	11,0	10,0	65,0
Máximo	84,0	46,0	28,0	90,0	89,0	41,0	35,0	90,0
Mediana	74,0	26,0	17,5	82,5	66,0	34,0	12,0	88,0
%desvio	11,9	30,9	32,3	7,3	13,6	29,4	51,3	10,9

Quadro 1 - Análise comparativa em relação ao tipo de tecido – valores de porcentagem							
DADOS	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p ⁽¹⁾
CL Positiva							0,355
• Não Congelado	10	72,2	8,6	54,0	84,0	-	
• Criopreservado	10	68,4	9,3	59,0	89,0	-	
CL Negativa							0,173 ⁽²⁾
• Não Congelado	10	27,8	⁽³⁾ 8,6	16,0	46,0	26,0	
• Criopreservado	10	31,6	9,3	11,0	41,0	-	
CE Positiva							0,543 ⁽²⁾
• Não Congelado	10	18,4	⁽³⁾ 5,9	10,0	28,0	17,5	
• Criopreservado	10	17,6	⁽³⁾ 9,0	10,0	35,0	12,0	
CE Negativa							0,817
• Não Congelado	10	81,6	5,9	72,0	90,0	-	
• Criopreservado	10	82,4	9,0	65,0	90,0	-	

(1) t de Student.

(2) Mann-Whitney

(3) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

Nas fotomicrografias 14 a 18 pode-se observar a imunorreação ao PCNA em cortes submetidos à técnica de imunohistoquímica.

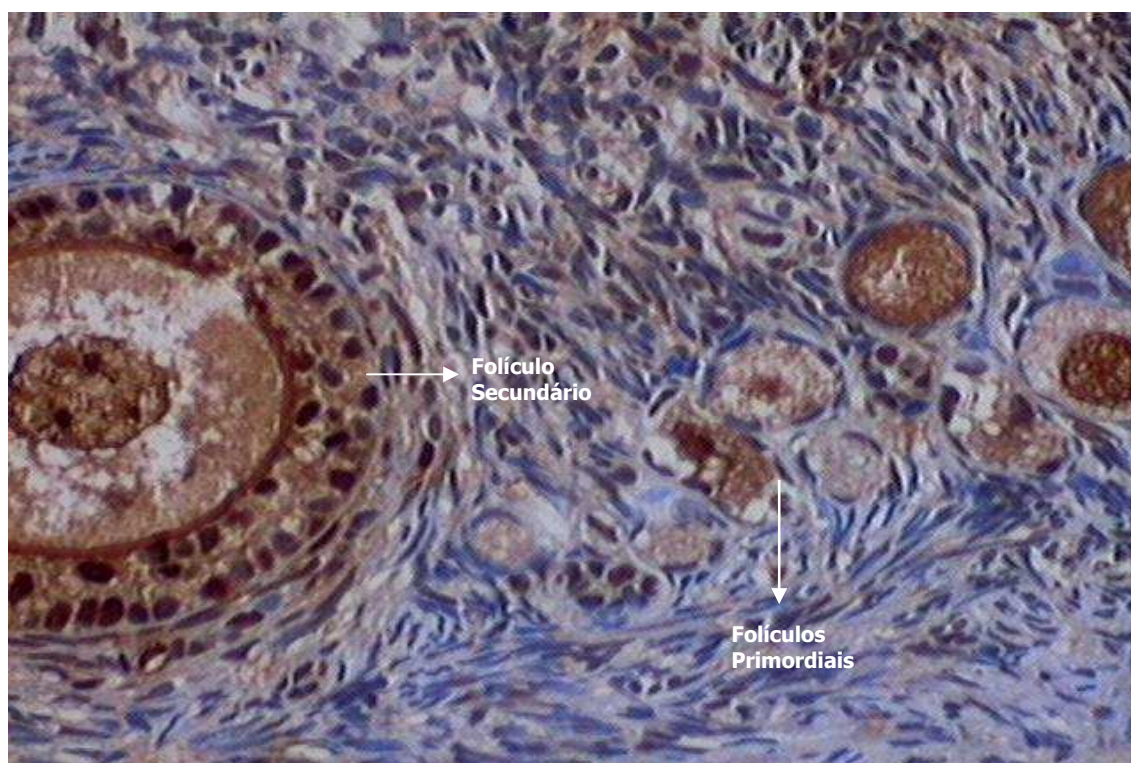


Figura 14 - Fotomicrografia de ovário demonstrando folículos primordiais e folículo secundário PCNA positivos em tecido não congelado (400X)

Os núcleos celulares com positividade ao PCNA coram-se em castanho e os PCNA negativos em azul.

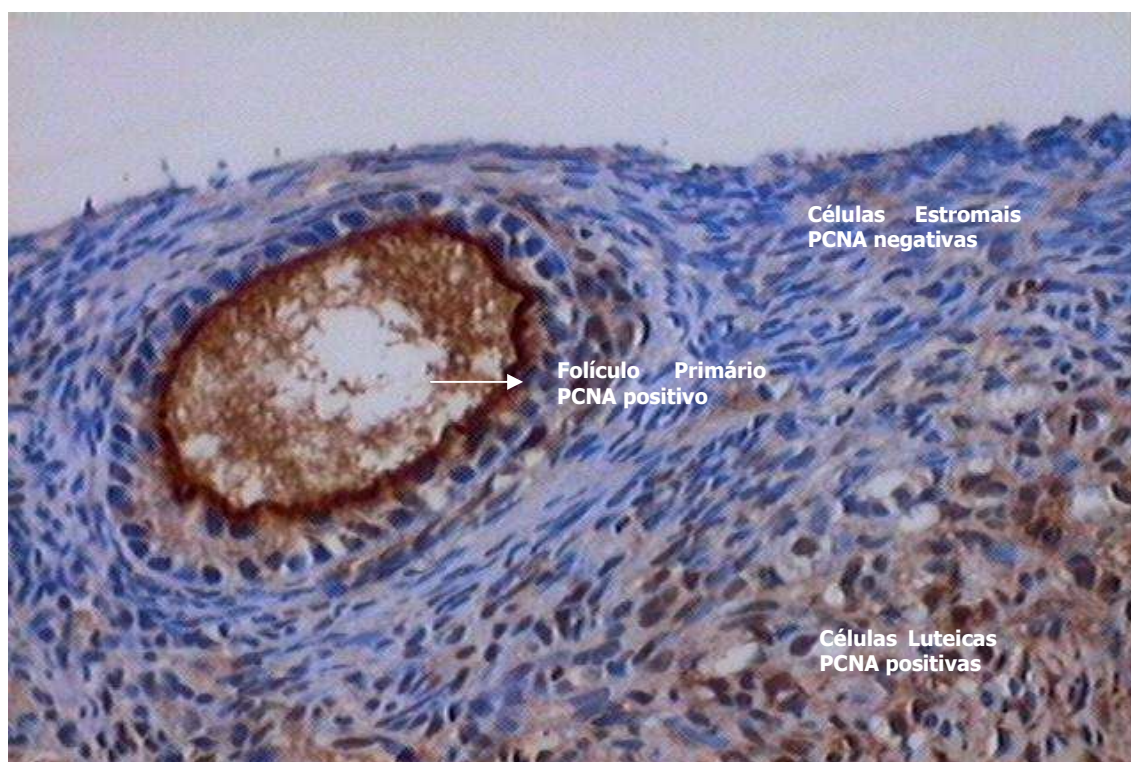


Figura 15 - Fotomicrografia com folículo primário e células luteicas PCNA positivas e estromais PCNA negativas em tecido ovariano não congelado (400 X)

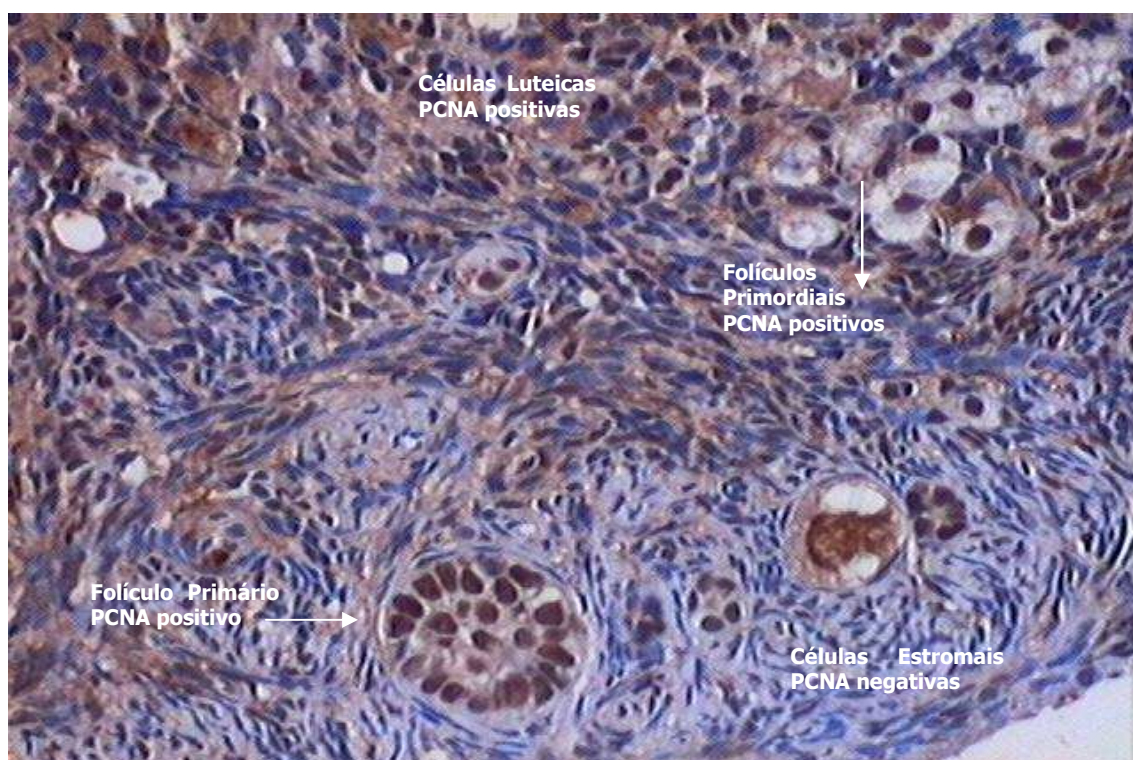


Figura 16 - Fotomicrografia com folículos primários e primordiais e células luteicas PCNA positivos e células estromais PCNA negativas em tecido ovariano não congelado (400 X)

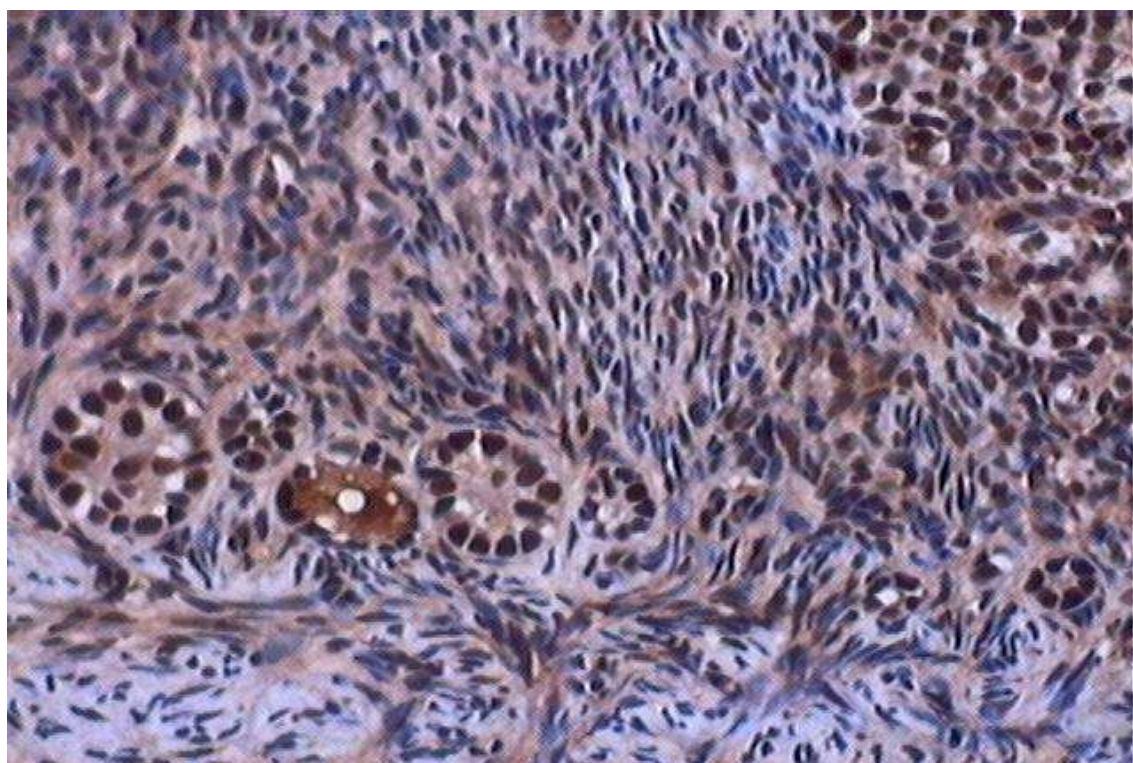


Figura 17 - Fotomicrografia demonstrando folículos primordiais e células luteicas PCNA positivos e células estromais PCNA negativas em tecido ovariano criopreservado (400X)

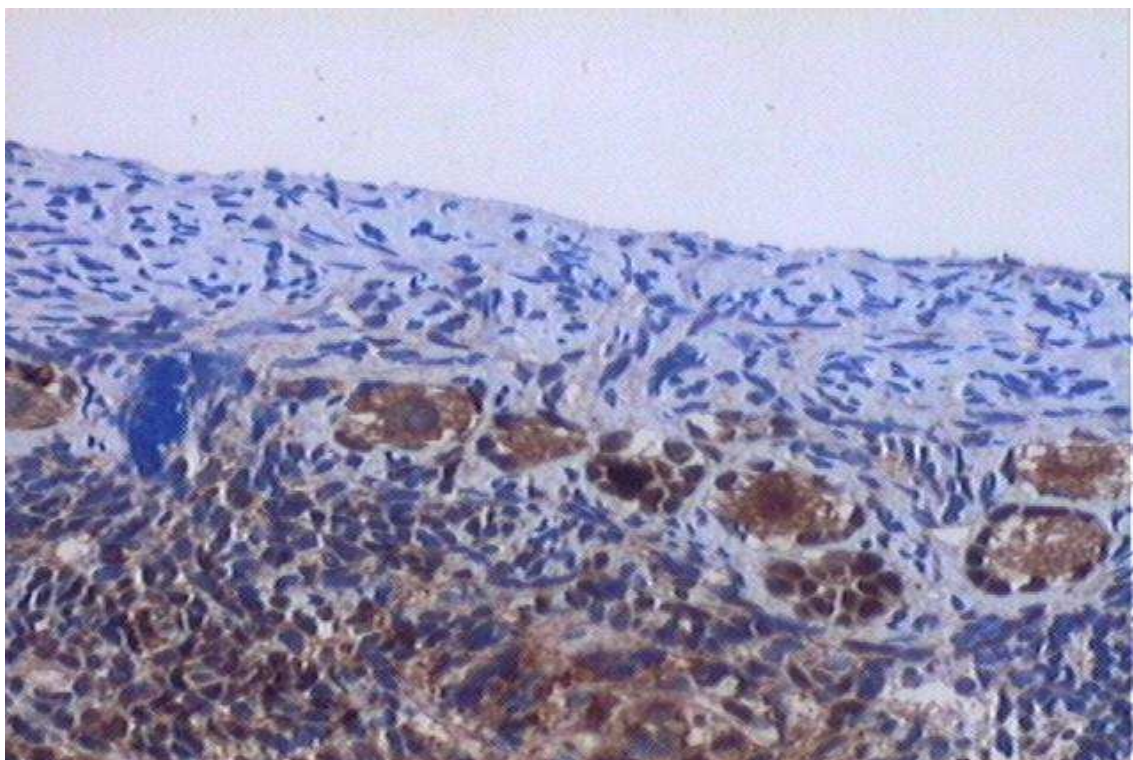


Figura 18 - Fotomicrografia onde se observam folículos primordiais e células luteicas PCNA positivos e células estromais PCNA negativas em tecido ovariano criopreservado (100 X)

5 DISCUSSÃO

Atualmente as opções para manter a fertilidade em pacientes a serem submetidas à quimio e/ou radioterapia são um tanto limitadas. A quimioterapia vem sendo utilizada, além do tratamento de câncer, num número crescente de condições não-malignas tais como doenças autoimunes e talassemias (NUGENT et al., 1997).

BLATT (1999) estimou que a proporção de sobreviventes de câncer da infância será aproximadamente de um em 250 por volta de 2010. Com isso, aumentou a necessidade de atenção à fertilidade dessas pacientes. Sabe-se que a quimioterapia, especialmente com agentes alquilantes, é gonadotóxica, sendo a incidência da falência ovariana dose-dependente (HOWELL et al., 1998). O andamento clínico pós-tratamento é imprevisível, a oligomenorréia pode ser seguida por menstruações normais ou pela falência ovariana prematura. A menstruação não indica, necessariamente, que tenha ocorrido ovulação, da mesma forma que a amenorréia não quer dizer obrigatoriamente, a falência das gônadas.

A perda da função ovariana é mais comum em mulheres com mais de 40 anos do que em pacientes mais jovens, mas essas também são suscetíveis. Após o tratamento pode ocorrer o retorno das menstruações, mas 42% das mulheres desenvolverá a falência ovariana prematura ao redor de 31 anos. A radiação apresenta alta toxicidade aos ovários. A exposição a 4 Gy de irradiação pélvica constitui a dose letal aos oócitos. Também, nesse caso, as pacientes mais novas são menos suscetíveis do que as mulheres com mais de 40 anos. A combinação da quimio com a radioterapia é particularmente devastadora (De VITA, HELMANN, ROSENBERG, 2000).

A transposição ovariana para fora do campo da radiação, na tentativa de reduzir a esterilidade provocada pelo tratamento às

vezes não é eficaz. Estudo feito por FEENEY et al. (1995) apresentou falência ovariana em 50% das pacientes com câncer cervical que receberam irradiação pélvica após prévia transposição ovariana.

Outra tentativa é o pré-tratamento, de pacientes a serem submetidas à quimioterapia, com agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Esse método foi utilizado após observar-se que a esterilidade induzida pela quimioterapia é menos provável em pacientes mais novas do que em mulheres com mais idade. Desse modo, o tratamento serviria para induzir a pituitária a um estado pré-púbere no qual os ovários são menos suscetíveis aos efeitos gonadotóxicos da quimioterapia. Esse método, porém, é limitado por não apresentar proteção à irradiação. BLUMENFELD et al. (1996) demonstraram o ressurgimento espontâneo da menstruação em 93% das pacientes tratadas de linfoma que receberam previamente agonistas de GnRH, comparado a 39% das pacientes do controle, mas a maioria das pacientes do controle foi tratada com ciclofosfamida, um potente gonadotóxico.

As pacientes com câncer também podem ser submetidas à realização da fertilização *in vitro* (IVF) pré quimio ou radioterapia. O problema é a falta de tempo para que a paciente se submeta à estimulação ovariana antes do início do tratamento para o câncer. Além disso, a IVF é imprópria à população pediátrica.

Uma outra opção é o congelamento de oócitos maduros e não fertilizados. Isto impede o dilema ético de produzir embriões “órfãos” resultantes de procedimentos de fertilização em situações nas quais a paciente não sobreviva ao câncer. Entretanto, a eficiência desta tecnologia é ainda limitada devido às baixas taxas de sucesso (aproximadamente 13% em seres humanos,). Além disso, os oócitos maduros somente podem ser coletados após o estímulo com gonadotrofinas, e em número limitado (LEE et al., 2001).

A criopreservação do tecido ovariano como meio potencial de preservar a fertilidade e a função endócrina em pacientes tratados de câncer ou para mulheres em envelhecimento reprodutivo apresenta-se atualmente como grande foco de estudo. A tecnologia envolve congelar os folículos primordiais imaturos *in situ* no córtex ovariano.

5.1 A RESPEITO DO MÉTODO

5.1.1 Animal de experimentação

A escolha de coelhas justifica-se pelo fato de estas, diferentemente de ratas e camundongos, apresentarem desenvolvimento ovariano precoce, com presença folicular e oogônias em meiose durante um extenso período de tempo após o nascimento (BYSKOV e HOYER, 1994). Nesse trabalho, utilizaram-se animais com idade entre um ano e três meses e dois anos e quatro meses, portanto em idade fértil, com peso entre 3,5 e 4,5 Kg, não-obesas, a fim de evitar a possível influência hormonal promovida pelo excesso de tecido adiposo.

5.1.2 Criopreservação

Uma vez que o tecido ovariano é congelado, há, teoricamente, diversas opções disponíveis para sua utilização futura, incluindo autotransplante, xenoenxerto e a maturação *in vitro* (LEE et al., 2001).

A técnica do autotransplante consiste no transplante do tecido ovariano de volta à doadora de quem foi obtido. Pode ser executado ortotopicamente, isto é, recolocando o tecido junto do pedículo ovariano, ou heterotopicamente, isto é, implantando o tecido em local diferente da sua origem, como por exemplo, sob a pele. O autotransplante mostra diversas vantagens. Primeiramente, o tecido ovariano apresenta um grande número de folículos primordiais. Uma secção de 1mm³ do córtex ovariano pode conter centenas de oócitos.

Em segundo lugar, o transplante autólogo de tecido ovariano preserva, teoricamente, a função endócrina das pacientes, ao contrário da IVF e da criopreservação dos oócitos, técnicas dirigidas somente à manutenção da fertilidade. Em terceiro lugar, a criopreservação ovariana não posterga o tratamento do câncer tanto quanto a criopreservação de embriões ou oócitos. A ooforectomia ou a biópsia ovariana podem geralmente ser feitas por laparoscopia, técnica bastante simples se comparada às semanas de tratamento necessárias ao estímulo ovariano. Os folículos primordiais consistindo de oócitos imaturos rodeados por uma única camada de células da pré-granulosa, são menores, metabolicamente menos ativos e assim o congelamento é menos prejudicial do que o de oócitos em metáfase II. Finalmente, os oócitos descongelados e transplantados ainda imaturos sofreriam um amadurecimento *in vivo*, obviamente necessitando de um estímulo exógeno de gonadotrofinas (MEIROW et al., 1999).

O xenoenxerto envolve o transplante do tecido ovariano de uma espécie a outra, por exemplo, da espécie humana para ratos com SCID. No autoenxerto há a preocupação com relação a reintrodução de focos malignos ao reimplantar o ovário na paciente submetida ao tratamento para câncer. Assim pesquisas foram desenvolvidas com relação ao transplante do tecido ovariano humano criopreservado em hospedeiro animal. Com esta técnica, a possibilidade de transmissão do câncer e a reincidência podem ser minimizadas, já que a maturação dos folículos primordiais ocorre no anfitrião animal. Além disso, o xenoenxerto pode beneficiar pacientes nas quais a estimulação ovariana é difícil ou relativamente contra-indicada (por exemplo: pacientes com síndrome do ovário policístico e câncer de mama). O xenoenxerto subcutâneo apresenta diversas vantagens: a simplicidade do procedimento, a fácil monitoração do desenvolvimento folicular e o acesso direto para a aspiração do folículo. Entretanto, o xenoenxerto pode levantar algumas

considerações éticas óbvias e questiona sobre a possibilidade de transmitir agentes infecciosos ou potencialmente teratogênicos (LEE et al., 2001).

Na maturação *in vitro* de oócitos criopreservados, considera-se que uma vez que o tecido ovariano é descongelado, teoricamente a fertilidade pode ser restaurada executando a maturação *in vitro*. Os oócitos são cultivados e, após amadurecimento, são fertilizados por injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), e os embriões resultantes são transferidos ao útero. A limitação desta técnica é o escasso conhecimento sobre as circunstâncias ideais necessárias à maturação, motivo de estudo da comunidade científica mundial.

5.1.3 Exposição aos crioprotetores

Quando as soluções aquosas são congeladas, a água da célula é removida na forma de gelo, fazendo com que as células tornem-se cada vez mais concentradas durante o decréscimo da temperatura. O inverso ocorre durante o descongelamento. Além disso, enquanto as células são congeladas, essas reagem osmoticamente às grandes alterações de concentrações de fluidos extracelulares (NEWTON et al., 1998).

A primeira etapa essencial a todo protocolo de criopreservação tanto para oócitos e folículos como para amostras isoladas de córtex ovariano deve promover um equilíbrio entre as células e o crioprotetor. Os crioprotetores devem ser completamente miscíveis em água, com baixa toxicidade mesmo em concentrações elevadas e facilmente permeáveis às membranas da célula. Os crioprotetores são utilizados na proteção das células estabilizando proteínas intracelulares, reduzindo ou eliminando a formação de gelo intracelular e moderando o impacto da concentração de eletrólitos intra e extracelulares (MAZUR, 1963).

O principal fator que influencia a resposta de uma célula ao congelamento é a relação entre sua superfície e seu volume. Em

geral, quanto maior a célula, mais lentamente deve ser o congelamento. Conseqüentemente, os oócitos humanos requerem muito mais tempo para alcançar o equilíbrio osmótico quando expostos a crioprotetores, do que os espermatozóides, por exemplo, (LEIBO et al., 1999).

Além disso, em temperaturas próximas a 0°C, deve-se tomar o cuidado necessário para evitar flutuações extremas do volume da célula durante o equilíbrio com crioprotetores, já que alterações abruptas de volume podem danificar imediatamente as células e torná-las mais suscetíveis ao estresse durante os procedimentos subseqüentes de refrigeração e descongelamento (NEWTON et al., 1999).

Embora muitos pesquisadores atribuam os danos celulares durante a criopreservação unicamente à toxicidade dos crioprotetores, outros afirmam que as alterações celulares são devidas inteiramente ao choque osmótico. Ao diminuir a temperatura abaixo de zero, quando as células são congeladas em concentrações molares de crioprotetores, sua sobrevivência é fortemente dependente das rampas de refrigeração e de descongelamento, sendo a melhor rampa a que permite a maior sobrevivência conforme o tipo e a concentração de crioprotetor (PICTON, GOSDEN e LEIBO, 2000).

Estudos de criobiologia demonstraram que tipos diferentes de células, mesmo se congeladas na mesma solução, exibem condições de descongelamento diferentes. Este fato é especialmente relevante na criopreservação do córtex ovariano, já que os tecidos são constituídos por diversos tipos de células e cada tipo tem seu tamanho, forma e propriedades de permeabilidade característicos. Desse modo, utilizando um protocolo de criopreservação que permita melhores condições de sobrevivência a um tipo de célula do córtex ovariano, pode ser que esse não seja o melhor meio de congelamento a outro tipo celular. Devido à alta complexidade da

arquitetura ovariana, a sobrevivência do tecidos criopreservado depende não somente das rampas de congelamento e descongelamento, mas também dos métodos de remoção dos crioprotetores (MAZUR, 1963, PEGG, 1996).

O conhecimento dos mecanismos que promovem a proteção ou levam à lesão de tecidos e células, durante o processo de criopreservação, permite melhor utilização dessa técnica, estabelecendo tempos de congelamento e de descongelamento que provoquem o mínimo de efeitos deletérios.

A criopreservação de vários tipos celulares tem sido bem descrita na literatura. De maneira geral, o bom protocolo de congelamento celular é aquele que propicia a estabilidade das reações cruzadas entre as moléculas no ambiente intracelular e também permite a sobrevivência celular após o descongelamento. O tecido deverá não somente permitir a sobrevivência celular, como também exibir a mesma arquitetura inicial, com as mesmas junções intercelulares, interações e ligações moleculares (ROSSI, L. M, 2004).

Segundo MAZUR, LEIBO e CHU (1972), o processo de lesão durante a criopreservação resulta da interação de duas categorias de fatores: numa técnica de congelamento muito rápida, as células são danificadas pela formação de gelo em seu interior e conseqüente “inchamento” durante o descongelamento. Se a criopreservação for feita por método muito lento, ocorre morte celular pelo maior tempo de exposição à maioria das alterações produzidas em soluções intra e extracelulares na conversão de água em gelo. Essas alterações incluem a concentração e precipitação de solutos, desidratação e mudanças de pH.

A dificuldade para conseguir a permeabilidade adequada dos fragmentos de tecido ao crioprotetor pode ser superada utilizando secções finas de tecido, com aproximadamente 1 a 2 milímetros de espessura, que fornecem maior área de contato para a penetração do

soluto (NEWTON et al., 1998). Esse foi o procedimento utilizado no estudo ora apresentado.

5.1.4 Tipos de crioprotetores

NEWTON et al. (1998) compararam a sobrevivência folicular após a criopreservação com diferentes tipos de crioprotetores. Os resultados com DMSO, 1,2- propanodiol e EG não se apresentaram significativamente diferentes (com valores entre 44 e 84%). O glicerol demonstrou resultados insatisfatórios (ao redor de 10%), provavelmente devido ao estresse osmótico excessivo criado pela lenta penetração do crioprotetor (NEWTON et al., 1996).

AUBARD et al. (1998) compararam a eficiência do DMSO e do EG e concluíram que o tecido ovariano de ratas pode ser criopreservado com sucesso, utilizando o protocolo de congelamento rápido/descongelamento lento, com ambos os crioprotetores.

HOVATTA et al. (1996) utilizaram DMSO e propanodiol-sacarose como crioprotetores no congelamento de tecido ovariano humano e concluíram que ambos apresentam grande eficiência no processo de preservação folicular durante a criopreservação.

Muitos autores demonstraram a possibilidade de restaurar a fertilidade em fêmeas de ratos que receberam o transplante ovariano do tecido congelado com DMSO (COX et al., 1996; GUANASENA et al., 1997; SZTEIN et al., 1998), ou com glicerol (PARROT, 1960). Atualmente há consenso de que a recuperação após a criopreservação, usando DMSO, é de alta qualidade, com maior preservação do tecido germinativo; por este motivo utilizou-se o DMSO como crioprotetor no estudo aqui demonstrado.

5.1.5 Dificuldades da criopreservação

O congelamento de tecido ovariano apresenta a dificuldade de estar sujeito aos interesses usuais de segurança de armazenamento,

a longo prazo, em *containers* de nitrogênio líquido. Sabe-se dos riscos da transmissão viral nesses tanques. TEDDER, ZUCKERMAN, GOLDSTONE, HAWKINS, FIELDING, BRIGGS, IRWIN, BLAIR, GORMAN e PATTERSON (1995) relataram a transmissão de hepatite B em *containers* de criopreservação. Durante um período de 25 meses, seis pacientes que se submeteram ao tratamento citotóxico para malignidades hematológicas e outras desenvolveram infecção aguda por hepatite B. A medula óssea e as células do sangue periférico tinham sido coletados dos seis pacientes e armazenados no mesmo tanque do criopreservação para possível transplante. O DNA humano, o antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), e o DNA do vírus da hepatite B (HBV) com as seqüências idênticas àquelas de quatro pacientes com infecções relacionadas foram encontrados subsequente no nitrogênio líquido. Esse incidente reforçou a exigência de que os recipientes usados na criopreservação de tecido humano sejam selados de maneira que se impeça a troca de material entre o espécime e o nitrogênio líquido.

Em crianças, a possibilidade do armazenamento a longo prazo de tecido ovariano levanta também a questão do tempo de armazenamento. Em casos de tecido ovariano criopreservado de pacientes jovens é importante assegurar-se de que o paciente ou o responsável consinta em estabelecer um prazo máximo para o armazenamento e também para a eliminação do tecido em caso de morte ou de incapacidade mental.

5.1.6 Vitrificação

A vitrificação constitui um processo físico no qual uma solução aquosa passa a um estado sólido vítreo amorfo, menos prejudicial às células do que a cristalização. Vários métodos diferentes foram usados para vitrificar oócitos e embriões humanos antes da implantação, com diferentes taxas de sucesso. Os métodos incluem o

uso de *payettes* convencionais, utilizando uma cânula denominada *cryoloop* e a vitrificação das células usando grades de microscopia eletrônica para sustentação.

Basicamente, a vitrificação é feita com concentrações elevadas de um crioprotetor ou da junção de diversos crioprotetores em uma taxa de congelamento extremamente elevada (2000°C/min). Tais circunstâncias impossibilitam a formação intracelular de cristais. Os *freezers* programáveis, automatizados, usados geralmente para protocolos de congelamento lento não são requeridos para a vitrificação e o tempo real para criopreservar os espécimes é diminuído significativamente. Apesar destas aparentes vantagens, a elevada toxicidade devido à alta concentração de crioprotetores usados em protocolos de vitrificação pode causar choque osmótico severo e comprometer a sua sobrevivência após o descongelamento (RALL e FAHY, 1985; RALL, 1987; VAJTA, HOLM, KUWAYAMA, BOOTH, JACOBSEN, GREVE e CALLESEN, 1998; LANE, BAVISTER, LYONS e FOREST, 1999; MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996).

5.2 A RESPEITO DOS RESULTADOS

5.2.1 Análise histológica geral

O tecido ovariano viável é aquele com capacidade da função hormonal, isto é, com secreção de estrogênio e de progesterona, e da função geradora, traduzida pela maturação dos folículos primordiais, presentes nos ovários no momento do nascimento, até os estágios foliculares mais desenvolvidos, ovulação e formação do corpo lúteo (BASTOS, 1998).

Histologicamente os folículos classificam-se como: a) saudáveis, quando apresentam lâmina basal intacta e oócito com não mais do que três vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinal intacta e nucléolo; b) em início de atresia, quando apresentam mais do que

três vacúolos citoplasmáticos e início de condensação da cromatina; c) moderadamente atrésico, quando mostram fragmentação citoplasmática do oócito e cromatina bem condensada; e d) em atresia tardia, quando o oócito se apresenta completamente segmentado ou ausente (CUSHMAN, WAHL e FORTUNE, 2002).

A coloração com hematoxilina-eosina é uma técnica que permite visibilizar as características estruturais dos cortes histológicos (ROSS e ROWRELL, 1993).

CANDY et al. (1995), GUANASENA et al. (1997), AUBARD et al. (1998) SZTEIN et al. (1998) e NISOLLE et al. (2000) utilizaram o corte histológico corado com hematoxilina-eosina na observação do tecido a fresco (teoricamente com histologia normal, utilizado como controle) e no tecido enxertado e recuperado. Puderam observar a viabilidade e, por meio da contagem de folículos, fazer a determinação cinética e a avaliação dos estágios de desenvolvimento folicular. Porém a análise histológica do tecido criopreservado, antes do implante, não foi realizada.

DISSEN et al. (1994) puderam observar, com esta coloração, a presença de tecido necrosado, o grau de neovascularização e a expressão celular de fatores angiogênicos após reimplante de tecido ovariano criopreservado.

HOVATTA et al. (1996), após realizarem o congelamento de tecido ovariano humano, fizeram a análise histológica do tecido criopreservado através de amostras coradas com hematoxilina-eosina e concluíram que os oócitos apresentavam morfologia semelhante aos encontrados em folículos não submetidos ao congelamento.

Nesse estudo, utilizou-se a avaliação da preservação folicular e das características celulares como critério de análise histológica do tecido ovariano criopreservado em comparação com o tecido não congelado.

A limitação desse estudo é o fato de que a observação da integridade morfológica não é indicação fiel de que as condições funcionais das células foram mantidas após o processo de criopreservação. Entretanto, em estudo anterior desta linha de pesquisa, em 2001, ALMODIN, CESCHIN, KRIGER, MINGUETTI-CÂMARA, FERREIRA e MEISTER obtiveram a recuperação da fertilidade em ovelhas, através de falência ovariana induzida por radioterapia, com implante sub-cortical de tecido germinativo criopreservado. Seis meses após o procedimento, as ovelhas que receberam os implantes tornaram-se espontaneamente prenhas, enquanto as ovelhas submetidas à radioterapia, e que não receberam o implante, não apresentaram gestação até um ano e meio após o experimento. Através desse estudo observou-se que a fertilidade em ovelhas com falência ovariana pode ser recuperada com o implante de tecido germinativo, ou seja, as células do tecido criopreservado mantiveram as suas características funcionais. Não houve, porém, avaliação das características do tecido criopreservado antes do implante.

Observou-se, nos resultados obtidos nessa pesquisa, que somente os folículos primordiais sobreviveram ao processo de criopreservação. Esse resultado foi semelhante ao encontrado em outras pesquisas nessa área. (MEIROW et al., 1999, LEE et al., 2001, ROSSI, 2004).

Isso se justifica pelo fato de os folículos primordiais serem menores e metabolicamente menos ativos, portanto mais tolerantes ao processo de criopreservação.

Os oócitos imaturos, presentes nos folículos primordiais, não apresentam polimerização dos microtúbulos e formação de fusos mitóticos, assim a criopreservação de pequenos oócitos nesses folículos pode livrar as células da grande maioria dos efeitos deletérios ao DNA. (HOVATTA et al., 1996 e SMITH, 2004).

Nesse estudo, os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, permitiram a identificação das alterações histológicas presentes no tecido não congelado e no tecido criopreservado e a avaliação do potencial de viabilidade do tecido criopreservado, já que a maioria dessas alterações são reversíveis. Observaram-se:

- vacuolização citoplasmática: reversível desde que não muito intensa, ou seja, com presença de até 3 vacúolos; essa condição foi encontrada em 50% das amostras de tecido não congelado e em 100% das amostras de tecido criopreservado ($p= 0,039$);
- lise estromal: dificulta a regeneração tecidual, porém é reversível, observada em 50% das amostras de tecido criopreservado em comparação a 30% das amostras de tecido não congelado ($p= 0,648$);
- distribuição irregular da cromatina: presente em 10% das amostras de tecido não congelado e em 70% das amostras de tecido criopreservado; constitui a alteração da permeabilidade da membrana plasmática a corantes e a dissolução citoplasmática lenta, sem os fenômenos abruptos que caracterizam a lise celular, portanto é reversível ($p= 0,022$);
- fragmentação das células da granulosa: reversível desde que não atinja o estágio de lise celular; presente em 30% das amostras de tecido não congelado e em 80% das amostras de tecido criopreservado. ($p=0,072$). Ressalta-se que nesse estudo não se observou lise celular.
- oócito com contorno irregular: presente em 10% das amostras de tecido não congelado e em 70% das amostras de tecido criopreservado. O oócito pode apresentar função normal mesmo que a sua membrana esteja irregular, desde que não ocorram alterações nucleares ($p= 0,007$).

Essas características histológicas foram significativamente mais presentes no tecido criopreservado, ou seja, a maioria das alterações

histológicas promovidas pela criopreservação, ainda que reversíveis, determinam dano tecidual.

No tecido criopreservado encontraram-se 2 alterações histológicas irreversíveis, ambas em 30% das amostras analisadas:

- degeneração hialina ($p=0,210$), uma alteração histológica que antecede a fibrose e é decorrente da produção e do acúmulo de proteínas no interior de células ou em tecidos, que tomam aspecto hialino;
- picnose ($p=0,210$): característica da apoptose.

Como essas condições (degeneração hialina e picnose) são consideradas irreversíveis, mas foram encontradas em apenas 30% das amostras, justificam-se os resultados de recuperação da fertilidade em estudos anteriores com reimplante de tecido ovariano criopreservado.

5.2.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

O PCNA constitui um marcador sensível dos eventos precoces de crescimento folicular. Ocorre o aumento da expressão deste antígeno nos estágios iniciais de desenvolvimento das células da granulosa e, assim, os oócitos iniciam a positividade para PCNA antes de sua expansão. A imunorreação para o PCNA permanece prevalente em folículos nas células da granulosa e da teca em estágios subseqüentes de desenvolvimento folicular e diminui progressivamente na atresia (OKTAY et al., 1985).

Nesse estudo, verificou-se a positividade para o PCNA em todos os folículos observados, indicando que esses não se apresentavam atrésicos.

Uma grande vantagem do PCNA é a possibilidade de utilização em tecidos fixados pelo formol e incluídos em parafina, o método

mais utilizado no preparo dos tecidos para exames histopatológicos (HUANG et al., 1994).

Os cortes histológicos dos ovários desse experimento foram submetidos à análise imunohistoquímica e apresentaram positividade para PCNA semelhantes em tecido não congelado e tecido criopreservado, conforme indicado no Quadro 1 e Tabela 2. Na análise comparativa em relação ao tipo de tecido, pode-se afirmar que os resultados encontrados no tecido não congelado não são estatisticamente diferentes dos resultados encontrados no tecido criopreservado, em nenhuma das amostras analisadas. Através da tabela 2 pôde-se verificar a predominância de células lúteas PCNA positivas tanto no tecido não congelado, quanto no criopreservado. Também os folículos em diferentes estágios de desenvolvimento no tecido não congelado e os folículos primordiais no tecido criopreservado apresentaram positividade para o PCNA, indicando a presença de DNA ativo e determinando, conseqüentemente, a viabilidade das células.

Outro índice de viabilidade importante na avaliação do tecido ovariano criopreservado é a contagem de células marcadas para apoptose. Não foi possível esta análise no experimento aqui descrito, porém antígenos marcadores de apoptose estão sendo utilizados na continuação desse estudo.

6 CONCLUSÃO

A análise comparativa dos resultados, nas condições deste experimento, permite concluir que, no tecido ovariano criopreservado, observam-se:

1. a sobrevivência de somente folículos primordiais.
2. alterações histológicas reversíveis significantes: vacuolização citoplasmática, lise estromal, fragmentação das células da granulosa e oócitos com contornos irregulares.
3. alterações irreversíveis, em níveis não significantes: degeneração hialina e picnose.
4. presença de PCNA positivo em todos os folículos, indicando a presença de DNA ativo e determinando, conseqüentemente, a viabilidade das células.

REFERÊNCIAS

1. Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril* 2004; 81:160-4.
2. Apperley, Reddy N. Mechanism and management of treatment related gonadal failure in recipients of high dose chemo-radiotherapy. *Blood Rev* 1995; 9:93-116.
3. Ataya K, Pydyn E, Ramahi-Ataya A, Orton CG. Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists? Pre-liminary observations. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:790-5.
4. Aubard Y, Lavignac C, Grandjean MH, Piver P, Teissier MP. Autogreffes orthotopiques de fragments ovariens chez le rat avec grossesse. *Contracept Fertil Sex* 1996; 24:852-5.
5. 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 Obst Gynecol Rep Biol* 1998; 79:83-7.
6. Aubard Y, Piver P, Cognie Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod* 1999; 14:2149-54.
7. Aubard Y, Piver P, Pech JC, Galinat S, Teissier MP. Ovarian tissue cryopreservation and gynecologic oncology: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97:5-14.
8. Baird DT, Webb R, Campbell BF, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation autograft stored at -196°C . *Endocrinol* 1999; 40: 462-71.

9. Banu Demirci DVM, Lornage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 2001; 75:754-62.
10. Bastos AC. *Ginecologia*. 10.ed. São Paulo:Atheneu, 1998. p.412.
11. Blatt J: Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33:29-33.
12. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S: 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; 11:1620-6.
13. Bravo R, Celis JE. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84:795-802.
14. Byskov AG, Hoyer PE. *Embriology of mammalian gonads and ducts: the physiology of reproduction*, Raven, New York:1994. p. 487-540.
15. Callejo JS, Vilaseca Ordi J, Cabré S, Lailla JM, Balasch J. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: long-term evaluation of effects on ovarian structure and function. *Fertil Steril* 2002; 77:396-402.
16. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reprod* 1995; 10:2334-8.
17. Ceschin AP, Biondo-Simões MLP, Thomaz BAC, Totssugui J. Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratas. *Acta Cir Bras* 2004; 19:27-30.
18. Cleary M, Snow M, Paris M, Shaw J, Cox SL, Jenkin G. Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an Ischemic environment. *Cryobiology* 2001; 42:121-33.

19. Cooper JE. Ethics and laboratory animals.:the veterinary records 1985; 116:594-5.
20. Correa L. Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.Disponível em: <http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoartenec.htm>. Acesso em 28 mai 2004.
21. Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC. In vitro maturation fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. Hum Reprod 1996; 11:2656-66.
22. Cox SL, Shaw J, Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipient in mice. J Reprod Fertil 1996; 107:315-22.
23. Cushman RA, Wahl C, Fortune JE. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. Hum Reprod 2002; 17:48-54.
24. Damewood MD, Grochow LB. Prospects for fertility after chemotherapy or radiation for neoplastic disease. Fertil Steril 1986; 45:443-59.
25. de Vita JV, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: principles and practice of oncology. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins. 2000, 3504 p.
26. Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR. Immature rat ovaries become revascularized rapidly dependent increase in angiogenic factor gene expression. Endocrinol. 1994; 134:1146-54.
27. Erickson GF, Magoffin D A, Dyer C A, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. Endocr Rev 1985; 6:371-99.

28. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implication for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7:1342-4.
29. Feeney D, Moore DH, Look KY. The fate of the ovaries after radical hysterectomy and ovarian transposition. *Gynecol Oncol* 1995; 56:3-7.
30. Glantz SA. *Primer of Biostatistics - Version 4.0* - McGraw Hill. Fourth Edition. New York; 1997, 473 p.
31. Goldberg RG, Masha F, Falcone T, KOVAC GT. Comparison of intrauterine and intracervical insemination with frozen donor sperm: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1999; 72:792-5.
32. Gook DA, Edgar DH, Stern C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:125-9.
33. Gook DA, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum Reprod* 1999; 14:2061-8.
34. Gosden R.G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:125-9.
35. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Human Reprod* 1994; 9:597-603.
36. Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:125-9.
37. Guanasena KT, Lakey JRT, Villines PT, Critser ES, Critser JK. Allogenic and xenogenic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol. Reprod.* 1997; 57:226-31.

38. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Campjohn R, Dover R, Wassem NH, lane DP. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunolocalization in Paraffin Sections: an Index of Cell Proliferation with Evidence of Deregulated Expression in some Neoplasms. *J Pathol* 162:285-94.
39. Hall PA, Coates PJ, Goodlad RA, Hart IR, lane DP. Proliferating cell nuclear antigen expression in non-cycling cells may be induced by growth factors in vivo. *Br J Cancer* 1994; 70: 244-7.
40. Hovatta O, Silver R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996; 11:1268-72.
41. Howell SJ, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin* 1998; 27:927-43.
42. Huang WYF, Coltrera M, Schubert M, Morton T, Truelove E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994; 78:748-754.
43. Khan-Dawood FS, Yusoff Dawood M, Tabibzadeh S. Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. *Biol Reprod* 1996; 54:734-42.
44. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare J, Gray J, Tan Em. Expression of Proliferating Cell Antigen (PCNA)/Cyclin during the Cell Cycle. *Experimental Cell Research* 1986; 166:209-19.
45. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos—adapting a proven method for flash-cooling protein crystals to the cryopreservation of live cells. *Nat Biotechnol* 1999; 17:1234–6.

46. Lee D, Ouhibi N, Battaglia D. Cryopreservation of ovarian tissue: banking reproductive potential for the future. *Women's Health Reports* 2001; 1:152-6.
47. Lee VH, Britt JH, Dunbar BS. Localization of laminin proteins during early follicular development in pig and rabbit ovaries. *J Reprod Fertil* 1996; 108:115-22.
48. Leibo SP, Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C. *The male gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Vienna:Cache River Press, 1999; p:501–16.
49. Lundy T, Smith P, O'Connell A, Hudson NL, McNatty KP. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fertil* 1999; 115:251-62.
50. Lushbaugh CC, Casaren G W. The effect of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review. *Cancer* 1976; 37:1111-20.
51. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54:1059–69.
52. Mazur P, Leibo SP, Chu HY. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp Cell Res* 1972; 71:345-55.
53. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47:347–9.
54. Meirow D, Fasouliotis SJ, Nugent D. A laparoscopic technique for obtaining ovarian cortical biopsy specimens for fertility conservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 1999; 71:948-51.
55. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001; 7:535-43.
56. Migaldi M, Criscuolo M, Zunarelli E, Lo Bianco L, Martinelli AM, Barbolini G. 120 and AgNOR nucleolar protein expression: a

comparison with nuclear proliferation markers in oral pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:189-96.

57. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121:228-34.
58. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. 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, Pegg DE, Barrass R, Gosden RG. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. *J. Reprod Fertil* 1999; 117:27–33.
61. Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Hum Reprod Update* 1998; 4:237-47.
62. Nisolle M, Casanas-Roux FBS, Qu J, Motta P, Donnez J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil.Steril* 2000; 74:122-9.
63. Nugent D, Meirow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 1997; 3:267–80.
64. Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 2000; 73:599-603.
65. Oktay K, Nugent D, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and

- cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril* 1997; 67:481-6.
66. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995; 53:295-301.
 67. Paes RA. Disponível: <http://www.fcm.unicamp.br/departamentos/anatomia/lamdegn22.html>. Acesso em 25 de maio de 2004.
 68. Parrot DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* 1960; 1:230-41.
 69. Pegg DE. Cryopreservation: a perspective. In: Rifle G., Vuitton D and Herve P. (eds): *Organ Transplantation and Tissue Grafting*, London:John Libbey 1996; p:375-8.
 70. Picton HL, Gosden RG, Leibo SP. Cryopreservation of Oocytes and Ovarian Tissue: Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. *Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction*, WHO Headquarters 2001; set: 17-21.
 71. Picton HM, Gosden RG. In vitro growth of human primordial follicles from frozen-banked ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166:27-35.
 72. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti P M, Magrini O, Flamigni C. Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68:724-6.
 73. Rabenhorst SH, Burini RC, Schmitt FCL. Marcadores de proliferação celular. *Rev Bras Patol Clin* 1993; 29:24-9.
 74. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573-5 .
 75. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24:387-402.
 76. Robbins B A, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear

- antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 1987; 111:841-5.
77. Ross MH, Rowrell LJ. Histologia: texto e atlas. 2.ed, São Paulo: Editorial Médica Panamericana, 1993. p. 2, p.779.
 78. Rossi IM. Criopreservação de parênquima ovariano. Disponível em:
<http://www.sbra.com.br/informativo.asp?codigo=95&tipo=norma>.
 Acesso em: 30/05/2004.
 79. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Gruerin JF, Lomage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. Fertil Steril 2002; 77:403-8.
 80. Salle B, Lornage J, Franck M, Isoard L, Rudigoz RC, Guerin JF. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. Fertil. Steril 1998; 70:124-8.
 81. Santa Rosa GL. Disponível em:
<http://multipolo.com.br/histologia/apoptose.htm>. Acesso em 7 mai 2004.
 82. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 2000; 53:59–72.
 83. Smith, GD. New developments in vitrification of oocytes. In Preserving fertility through advances in cryobiology. Irvive Scientific. São Paulo, 2004.
 84. Song YC, Khirabadi FI. Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. Nat Biotechnol 2000; 18:296-99.
 85. Stevens A, Lowe J. Histologia humana. 2.ed. São Paulo:Manole, 2001, p.338-44.
 86. Sztejn J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. Biol Reprod 1998; 58:1071-4.

87. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346:137–40.
88. Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107:1623-8.
89. Trounson A, Kirby C. Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethylsulphoxide. *Fertil Steril* 1989; 7:95-103.
90. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:53-8.
91. Vasconcelos AC. Patologia Geral em Hipertexto. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2000. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/pat/reparacao.htm>. Acesso em 27 mai 2004.
92. Vasconcelos LS, Petroianu A, Alberti LR, Leite JM, Castro LPF, Machado VMM. Avaliação endócrina e morfológica de transplante ovariano homogêneo. *Acta Cir Bras* 2003; 18(Supl 3):16-27.
93. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The Hardening effects of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fertil* 1990; 9:253-9.

NORMAS UTILIZADAS

Goldenberg S. Orientação normativa para elaboração de tese. Acta Cir Bras 1993; 8(1):1-10.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina anatomica veterinaria. 3rd ed. New York: Ithaca; 1983.

International Organization for Standardization. Documentation: rules for abbreviation on title words of publication / Documentation: regles pour l' abbreviation des mots dans les titres et des publications. 2nd ed. Paris:ISO; 1984.

International Serial Data system & International Organization for Standardization. Liste d' abbreviations des mots des titres des publications on series: conforme ISO 4-1984 / List of serial title word abbreviation in accordance with ISO 4-1984. Paris: ISDS/ISO, 1985.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Inter Med 1997; 126(1):36-47.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14.724. Informação e documentação. Trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002. 6p.

Brasil. Lei Federal n.º 6.638 de 08 de maio de 1979: estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências. Diário Oficial [República Federativa do Brasil], Brasília, p.1, 10 mai 1979.

ANEXOS

Terminologias

- Células tecais: células de tecido conjuntivo localizadas no folículo ovariano.
- Células granulosas: células da membrana granulosa que reveste o folículo ovariano que dará origem às células lúteas após a ovulação.
- Células lúteas: células do corpo lúteo que são derivadas das células granulosas e das células da teca do folículo maduro (ou de Graaf).
- Células estromais: células do tecido conjuntivo de um órgão que são encontradas no tecido conjuntivo frouxo. Estas células são mais frequentemente associadas com a mucosa uterina e o ovário, bem como com o sistema hematopoiético e outras regiões em geral.
- Folículos Ovarianos:
 - Primordiais: após a migração das células germinativas primordiais para a crista gonadal ocorre o envolvimento destas pelas células foliculares que se originam e passa a ser chamado de folículo primordial. Assim o folículo primordial consta de um oócito envolvido por uma camada única de células epiteliais achatadas.
 - Secundários: folículos com 2 ou 3 camadas de células epiteliais cuboidais. Nestes folículos já ocorre a formação da membrana pelúcida.
 - Terciários: produzem estrogênio. À medida que ocorre processo de multiplicação das células foliculares, ocorre aumento no número de camadas e formação de lacunas repletas por líquido rico em estrogênio, devido à coalescência dessas células. Também ocorre a diferenciação da parede do folículo, que passa a ter 2 camadas chamadas de teca e granulosa. A camada da Teca pode ainda ser dividida em duas camadas: a teca externa de estrutura fibrosa e a teca interna celular e produtora de hormônio esteróide.

- Atrésicos: correspondem a folículos em qualquer estágio (I, II ou III) em processo de degeneração que acabam desaparecendo e deixando apenas uma estrutura vestigial com aspecto hialino chamada de *Corpus fibrosum*.
- Folículo de Graaf: agregação celular, em forma de esfera, localizada no ovário e que contém um oócito. Consiste de um envoltório fibrovascular, um envoltório interno de células nucleadas e um fluido transparente composto por albumina no qual o oócito está suspenso.
 - Corpo Lúteo: massa glandular amarela formada no ovário a partir de folículos ovarianos que romperam e expulsaram o oócito.
 - Óvulo: célula germinativa feminina expulsa do ovário durante a ovulação.
 - Fibrose: qualquer condição patológica em que os tecidos conectivos fibrosos invadem qualquer órgão, normalmente como consequência de inflamação ou outra lesão.
 - PCNA: antígeno nuclear com a função de síntese de DNA, reparo de DNA, e progressão de ciclo celular. O PCNA é necessário para a síntese coordenada tanto na condução quanto revestimento das fitas na forquilha de replicação durante a replicação do DNA. A expressão do PCNA correlaciona-se com a atividade proliferativa em diversos tipos de células malignas e não malignas.
 - Imunohistoquímica: localização histoquímica de substâncias imunoreativas utilizando anticorpos marcados como reagentes.
 - Viabilidade celular: medida da viabilidade de uma célula caracterizada pela capacidade para realizar determinadas funções como metabolismo, crescimento, reprodução, alguma forma de responsividade e adaptabilidade.
 - Criopreservação: preservação de células, tecidos, órgãos ou embriões por congelamento. Em preparações histológicas, a criopreservação ou criofixação é utilizada para manter a forma,

estrutura e composição química existente, de todos os elementos constituintes das amostras.

- Citometria de fluxo: técnica que utiliza um sistema instrumental para fabricação, processamento e exibição de uma ou mais medidas em células individuais obtidas de uma suspensão de células. As células são geralmente coradas com um ou mais corantes, específicos aos componentes de interesse da célula, por exemplo, DNA, e a fluorescência de cada célula é medida rapidamente pelo feixe de excitação transversa (laser ou lâmpada de arco de mercúrio). A fluorescência provê uma medida quantitativa de várias propriedades bioquímicas e biofísicas das células, bem como uma base para separação das células. Outros parâmetros óticos incluem absorção e difusão da luz, a última sendo aplicável a medidas de tamanho, forma, densidade, granularidade e compreensão da coloração da célula.
- Microscopia eletrônica: microscopia visual e fotográfica na qual feixes de elétrons, com comprimentos de onda centenas de vezes mais curtos que a luz visível, são usados no lugar da luz, o que significa permitir uma magnificação muito maior.
- Transplante alogênico: transplante entre indivíduos de uma mesma espécie. Geralmente se refere a indivíduos geneticamente diferentes ao contrário do transplante isogênico para indivíduos geneticamente idênticos.

HISTOLOGIA OVARIANA

- Constituição do Córtex Ovariano:

- estroma de sustentação
- estruturas produtoras de gametas e seus derivados

O estroma cortical é composto por células fusiformes semelhantes a fibroblastos, densamente compactadas. As células fusiformes estão dispostas ao acaso ou em padrões espiralados. O citoplasma dessas células é rico em ribossomos e microfilamentos; as mitocôndrias também são numerosas e tendem a se reunir ao redor do núcleo.

As fibras reticulares e colágenas entre as células do estroma são particularmente proeminentes na parte externa do córtex. O aumento progressivo do teor de colágeno nesta área inicia-se precocemente na vida reprodutiva e se torna mais intenso com o tempo, desta maneira, na época da menopausa, o colágeno é quase universal.

A celularidade do estroma ovariano e a quantidade de lipídio que as células contêm são ambos dependentes do estímulo hormonal. O aumento no acúmulo de lipídeos nas células do estroma é chamado luteinização das células do estroma.

- Produção de gametas e maturação

Embriologicamente os gametas são derivados de células germinativas primordiais, que se desenvolvem no saco vitelínico e migram para os ovários em desenvolvimento. As divisões das células germinativas primordiais produzem oogônias que se multiplicam por mitoses. Durante o segundo trimestre de gestação, as divisões mitóticas cessam e as numerosas oogônias aumentam de tamanho e passam a denominar-se oócitos primários. Nesse estágio seu número equivale a vários milhões em cada ovário, mas muitos se degeneram.

Ao nascimento, cada ovário contém cerca de um milhão de oócitos. No início da puberdade esse número passa a cerca de 250 mil.

Os oócitos primários sobreviventes à degeneração no segundo trimestre entram em prófase da primeira divisão meiótica e permanecem nessa fase por muitos anos. Adquirem uma única camada de células achatadas arredondadas (células da granulosa) e assim denominam-se folículos primordiais. Ao nascimento, o córtex ovariano apresenta-se repleto de numerosos folículos primordiais inseridos no estroma cortical.

Na puberdade, a secreção cíclica de FSH da hipófise estimula o desenvolvimento de um pequeno número de folículos primordiais. Ocorre aumento do oócito, associado ao aumento do tamanho das células da granulosa, que se tornam cúbicas ou colunares e o folículo passa a chamar-se folículo primário unilaminar. As células da granulosa se dividem e produzem um envoltório com várias camadas ao redor do oócito em crescimento, enquanto uma lâmina glicoproteica se forma entre o oócito e essas células: a zona pelúcida. O folículo agora é conhecido como folículo primário multilaminar.

Com a maturação contínua dos folículos, a cápsula externa das células do estroma ovariano começa a se diferenciar em duas camadas: camada interna (teca interna), que apresenta células secretoras de estrógenos e é altamente vascularizada e a camada externa (teca externa), que permanece pequena e compacta e não possui função secretora. O folículo, nesse estágio, é denominado secundário. Pequenas lacunas preenchidas com líquido aparecem na camada das células da granulosa circundando o oócito formando o antro, que aumenta progressivamente de tamanho. O fluido é ligeiramente viscoso e é rico em ácido hialurônico. O oócito apresenta-se separado do líquido por uma camada de células da

granulosa denominada *cumulus oophorus* e o folículo, completamente maduro e pronto para a ovulação é chamado folículo de Graaf.

Completa-se o primeiro estágio da meiose para a produção de um gameta haplóide e um pequeno corpo polar.

- Atresia Folicular

A atresia pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, mas é mais marcante durante a vida intra-uterina, quando o número de oócitos primários é reduzido. Quando os folículos são pequenos (primários e secundários), os componentes foliculares sofrem degeneração e completa reabsorção, sem deixar cicatriz. Folículos maiores, com substancial componente celular, sofrem desintegração gradual e substituição por tecido fibroso hialino. O oócito se desintegra e as células da granulosa se separam e degeneram, enquanto que a zona pelúcida se colapsa e se retrai, mas permanece identificável. Geralmente uma membrana vítrea se desenvolve entre as células da granulosa em degeneração e a teca externa, podendo proliferar transitoriamente, talvez gerando a fonte para o tecido fibroso fibrocolagenoso que geralmente substitui o folículo atrésico. Quando um folículo grande sofre atresia, uma cicatriz colagenosa substancial pode se formar, um corpo fibroso (STEVENS e LOWE, 2001).

CARACTERÍSTICAS DE COELHAS



Coelhos de todas as variedades são utilizados em pesquisas laboratoriais, principalmente em estudos de bacteriologia, fisiologia e nutrição. São também usados em laboratórios clínicos, em estudos sobre hormônios e para produção de vacinas e soros.

Os coelhos são normalmente obtidos de criadores que entregam os animais em número e tamanho exato para determinado experimento. Devem ser manuseados o menos possível, com exceção dos futuros reprodutores. É muito fácil causar lesões de coluna vertebral em coelhos, a menos que certos cuidados sejam observados. Os coelhos, em geral, não oferecem resistência ao serem manuseados por pessoas em quem confiam.

Este animal elimina dois tipos de fezes: as fezes “diurnas” são duras, secas e redondas; as fezes “noturnas” são moles e envolvidas por uma membrana. As fezes noturnas são ingeridas pelo coelho e são importantes fontes de nutrientes. Animais em jejum, com estômago totalmente vazio são difíceis de ser obtidos, em decorrência do hábito da coprofagia.

Os coelhos recém adquiridos devem ser isolados por um período mínimo de 21 dias. Se engaiolados, devem sempre dispor de espaço suficiente na gaiola para se esticarem em todo seu comprimento, que é a sua posição normal de descanso. A gaiola deve também ser suficientemente alta, para permitir que o coelho sente sobre suas patas traseiras.

Coelhos
Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

Temperatura ambiente ideal: 20 - 25°C Umidade 50% (geralmente não controlada) Luz 14 horas/dia	Batimentos cardíacos/minuto 205 (123 - 304) Frequência respiratória/minuto 51 (38 - 60) Temperatura corporal 39,4°C (37,5°C - 40,1°C)
Peso adulto macho: 4 - 5,5kg fêmea: 4,5 - 6,4kg Peso ao nascer láparos 100g (8 semanas de idade: 1,8kg)	Maturidade sexual fêmea: 5 - 6 meses; peso 4,5kg macho: 6 - 7 meses; peso 4kg Ciclo estral: poliestro
Gestação 30 - 32 (media 31 dias) Desmame 8 semanas (peso 1,8kg) Tamanho da ninhada 1 - 8 (média 8)	Cobertura pós-parto 14 - 28 dias Vida reprodutiva fêmea: 1 - 3 anos macho: 1 - 3 anos Colônia 1 macho para 6 -10 fêmeas
Consumo diário de água a vontade Início do consumo de alimentos sólidos 14 - 16 dias	Consumo diário de alimento macho adulto: 110 - 175g fêmea grávida: 175 - 225g fêmea em lactação: 225 - 1.000g - fase de crescimento: 3 - 6 semanas: 0,5 - 0,75 kg/dia - ninhada com 7 - 8 animais: 6 - 8 semanas: 0,5 - 1kg/dia

Disponível em : <http://bio.ufpr.br/unidades/bioterio/convencionais/coelhos.htm>

Acesso em 07/11/2004.