



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**Cultura de tecido ovariano – padronização e análise  
histológica**

**Alessandra Leal Bottini**

Porto Alegre, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**Cultura de tecido ovariano - padronização e análise  
histológica**

**Alessandra Leal Bottini**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena von Eye Corleta

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

Porto Alegre, 2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Bottini, Alessandra Leal  
Cultura de tecido ovariano - padronização e análise  
histológica / Alessandra Leal Bottini. -- 2020.  
69 f.  
Orientadora: Helena von Eye Corleta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Ovário . 2. Cirurgia de readequação sexual. 3.  
Reserva ovariana. 4. Preservação da fertilidade. 5.  
Técnicas de Cultura de tecido . I. Corleta, Helena von  
Eye, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Se as coisas são inatingíveis...ora!

Não é motivo para não querê-las.

Que triste os caminhos, se não fora  
a mágica presença das estrelas!

DAS UTOPIAS

Mário Quintana

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Helena Von eye Corleta, pelo exemplo e inspiração na profissão, pelos aprendizados desde a graduação e incentivo à carreira acadêmica. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas, confiança e amizade.

À Profa. Lúcia Kliemann, por também, desde a graduação, me inspirar e ensinar. Obrigada pelo carinho e por toda a ajuda neste trabalho.

Ao Prof. Edison Capp, pela inspiração como pesquisador, pela dedicação na formação de profissionais comprometidos com a produção de ciência e pelo auxílio na conclusão deste projeto.

À Profa. Ilma Simone Brum da Silva, pelo apoio durante minha jornada no universo de um laboratório de pesquisa, pelo estímulo e valorização da pesquisa básica, de suma importância na produção científica.

Aos demais professores e aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, pela ajuda e disponibilidade, pelo compartilhamento de informação e auxílio.

À Vânia, grande parceira, essencial para a realização deste trabalho, por me apresentar com muita paciência as rotinas de um laboratório, por compartilhar comigo seus conhecimentos de forma sempre carinhosa, por sempre estar disponível para me auxiliar a transpor as dificuldades ao longo do caminho, pelo apoio constante e amizade.

À minha grande amiga Alícia Dornelles, por sempre estar ao meu lado incentivando e dividindo comigo seus conhecimentos. Obrigada pela disponibilidade, suporte e apoio, essencial para a realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, por compartilharem comigo os altos e baixos deste período do Mestrado.

Aos demais amigos, por torcerem e vibrarem as minhas vitórias.

Aos meus pais, por sempre acreditarem e apoiarem, pela torcida e incentivo constantes, por fazerem o possível para ajudar na realização dos meus sonhos, por serem meu porto seguro, pelo amor e carinho.

A minha avó Marli Rodrigues, que desde sempre mantém fé inabalável no meu potencial e no meu sucesso.

Ao meu noivo Lucas Jardim pela parceria ao longo deste e de tantos outros desafios, sempre compreensível diante de minhas ausências, pelo suporte, pelo carinho, por ser minha paz.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte financeiro.

À UFRGS pelo conhecimento proporcionado, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DA LITERATURA	19
1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	19
2 Mapa conceitual esquemático	21
3 Anatomia e histologia ovariana	23
4 Desenvolvimento folicular	24
5 Hormônios regulares da foliculogênese	27
5.1 Via da Fosfatidilinositol-30-cinase	30
5.2 Hormônio Antimulleriano	33
6 Reserva Ovariana	35
7 Câncer e Infertilidade	36
8 Métodos de preservação ovariana	38
8.1 Cultura de folículos – Maturação <i>in vitro</i>	41
9 Cultura de tecido ovariano	44



10 Cirurgia de redesignação de sexo	46
JUSTIFICATIVA	48
OBJETIVOS	49
HIPÓTESE	50
ARTIGO	51
CONCLUSÕES	54
PERSPECTIVAS FUTURAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt: Proteína cinase B

AMH: Hormônio anti-mulleriano

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

CC: Células do cumulus

CY: Ciclofosfamida

DHEA: Desidroepiandrosterona

FSH: Hormônio folículo estimulante

FSHR: Receptor do hormônio folículo estimulante

FOP: Falência ovariana precoce

FOXO3: *Forkhead Box O3*

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

GnRHa: Análogos do GnRH

HCG: Gonadotrofina coriônica humana

IOP: Insuficiência ovariana precoce

LH: Hormônio luteinizante

LHRHa: Agonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante

mTORC1: *Mammalian target of rapamycin complex 1*

Pi3K: Fosfatidilinositol-30-cinase

Pi3K-Akt: Via de sinalização fosfatidilinositol-30-cinase

PIP: *Phosphatidylinositol phosphate*

PKA: Proteína cinase A

PTEN: *Phosphatase and tensin homologue*

RNAm: RNA mensageiro

TGF -  $\beta$ : Fator de crescimento transformador  $\beta$

PCOS: Síndrome dos ovários policísticos

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca na literatura

Figura 2. Mapa conceitual esquemático desta dissertação

Figura 3. Organização, estrutura e desenvolvimento dos folículos ovarianos

Figura 4. Representação esquemática do crescimento folicular a partir do *pool* de folículos primordiais e a influência da via simplificada da Pi3K na ativação folicular

## RESUMO

**Introdução:** A utilização de agentes quimioterápicos citotóxicos no tratamento de diversas doenças, com potencial de desenvolvimento de insuficiência ovariana precoce e consequente infertilidade, exige que técnicas de preservação ovariana sejam estudadas e constantemente aprimoradas. Para isso, a padronização da cultura de tecido ovariano é importante e deve estar bem estabelecida. Os pacientes transgêneros masculinos submetidos à cirurgia de redesignação de sexo oportunizam a possibilidade de estudo deste órgão nobre em pesquisa. **Objetivo:** Descrever as características histológicas do tecido ovariano humano submetido a cultura *in vitro* a partir de ovários dos pacientes transgêneros masculinos. **Método:** Estudo experimental *in vitro*. As amostras foram coletadas durante cirurgia de redesignação de sexo dos pacientes transgêneros masculinos. O córtex ovariano foi cortado em fragmentos de 2, 3 e 4 mm e dispostos em placa de 96 poços próprias para cultivo por 2, 4, 6 e 8 dias e lâminas destes fragmentos foram confeccionadas, coradas em HE e analisadas por patologista experiente. **Resultados:** A histologia dos fragmentos ovarianos foi analisada nos tempos zero, 2, 4, 6 ou 8 dias de cultura, sendo observada hiperplasia estromal em todas as amostras. A presença de hiperplasia estromal não está associada com a obtenção de folículos primordiais ou primários. A hipocelularidade periférica foi outro achado recorrente. Folículos primordiais e primários foram identificados com padrão heterogêneo entre os fragmentos de um mesmo paciente e entre pacientes diferentes, sendo que folículos em estágios mais avançados de desenvolvimento (secundários e antrais) não foram encontrados. Houve associação entre o diâmetro dos

fragmentos ovarianos e a identificação de folículos primários ( $p=0,036$ ). O número de dias em cultura apresentou associação com sinais histológicos de sofrimento tecidual nos fragmentos ( $p=0,002$ ). O número total de folículos identificados nas amostras de 2 mm de diâmetro foi significativamente menor do que nas amostras de 4 mm ( $p=0,031$ ). **Conclusão:** Os ovários destes pacientes, mesmo após exposição prolongada a testosterona, apresentavam folículos primordiais e primários viáveis, mantendo a viabilidade com o passar dos dias expostos à cultura. A obtenção de folículos em estágios mais avançados de desenvolvimento não foi identificada no tempo basal, nem após 8 dias de cultura.

**Palavras-chave:** Ovário, Reserva ovariana, Preservação da fertilidade, Técnicas de cultura de tecido, Cirurgia de readequação sexual.

## ABSTRACT

**Background:** The use of cytotoxic chemotherapeutic agents in the treatment of various diseases, with the potential to develop early ovarian insufficiency and consequent infertility, requires that techniques of ovarian preservation to be studied and constantly improved. For this, the standardization of ovarian tissue's culture is important and must be well established. Transgender male patients undergoing sex reassignment surgery provide the opportunity to study this noble organ in research. **Aim:** To describe the histological characteristics of human ovarian tissue subjected to *in vitro* culture from the ovaries of male transgender patients. **Method:** *In vitro* experimental study. The samples were collected during sex reassignment surgery for male transgender patients. The ovarian cortex was cut into fragments of 2, 3 and 4 mm and placed in a 96-well plate for 2, 4, 6 and 8 days, slides of these fragments were made, stained in HE and analyzed by an experienced pathologist. **Results:** The histology of the ovarian fragments was analyzed at time zero, 2, 4, 6 or 8 days of culture, with stromal hyperplasia being observed in all samples. Stromal hyperplasia was observed in all samples. Presence of stromal hyperplasia wasn't associated with obtaining primordial or primary follicles. Peripheral hypocellularity was another recurrent finding. Primordial and primary follicles were identified with a heterogeneous pattern between fragments from the same patient and between different patients, and follicles in more advanced stages of development (secondary and antral) were not found. There was an association between the diameter of the ovarian fragments and the identification of primary follicles ( $p=0.036$ ). The number of days in culture was associated with histological signs of tissue suffering in the

fragments ( $p=0.002$ ). The total number of follicles identified in the 2 mm diameter samples was significantly lower than in the 4 mm diameter samples ( $p=0.031$ ).

**Conclusion:** The ovaries of these patients, even after prolonged exposure to testosterone, presented viable primordial and primary follicles, maintaining viability over the days exposed to the culture. Obtaining follicles at more advanced stages of development was not identified at baseline, nor after 8 days of culture.

**Keywords:** Ovary, Ovarian reserve, Fertility preservation, Tissue culture techniques, Sex reassignment surgery.



## INTRODUÇÃO

Os ovários apresentam um número definido de folículos primordiais ao nascimento, os quais constituem a reserva ovariana. A ativação desses folículos é responsável pelo declínio irreversível da função reprodutiva ao longo dos anos (1), sendo a taxa desta redução variável entre as mulheres. (2)

Uma das grandes causas de redução da reserva ovariana potencialmente evitável é o uso de drogas quimioterápicas gonadotóxicas utilizadas no tratamento de alguns tipos de neoplasias. Estas drogas desencadeiam ativação folicular exacerbada e levam a depleção acelerada e prematura da reserva folicular. Desta forma, estudos são realizados visando evitar ou atenuar os efeitos adversos a longo prazo dos tratamentos, como a insuficiência ovariana precoce (IOP) (3). Prevenir a disfunção ovariana induzida pela quimioterapia seria importante para preservar as possibilidades de concepções naturais ou medicamente assistidas após os tratamentos (4).

Os métodos atualmente utilizados para preservar a fertilidade das pacientes submetidas a tratamentos citotóxicos são a criopreservação de embriões, de oócitos e de tecido ovariano. Entretanto, estas técnicas apresentam indicação limitada à idade da paciente e ao *status* clínico. Além disso, são procedimentos invasivos e que podem demandar tempo, não sendo adequadas nos casos de meninas pré-pubescentes e nos casos em que o atraso no início do tratamento não é aceitável (5). A criopreservação de tecido ovariano com posterior reimplante é uma técnica experimental, considerada uma alternativa em potencial para preservar a fertilidade em meninas pré-pubescentes, porém, com possível risco de reimplante de células neoplásicas (6).

O desenvolvimento de condições de cultura para células germinativas imaturas é um dos maiores desafios da medicina reprodutiva, tendo como objetivo obter oócitos competentes. O crescimento completo *in vitro* de folículos primordiais com subsequente fertilização *in vitro*, seguida de transferência de embrião vivo foi alcançada, até agora, somente em camundongos (7).

Tendo em vista o complexo sistema regulatório do desenvolvimento folicular, permanece o desafio de criar sistemas de cultura cada vez mais elaborados e complexos a fim de promover um ambiente similar ao ovário *in vivo* e assim, através de fragmentos de tecido ovariano criopreservados, suportar o crescimento folicular. A impossibilidade de acesso ao tecido ovariano humano, livre de doenças, de mulheres jovens - por aspectos éticos - resulta na dificuldade de estabelecer uma cultura ovariana *in vitro* eficiente.

A cirurgia de redesignação de sexo dos transgêneros masculinos, a qual contempla a exérese dos ovários, possibilita que as gônadas possam ser estudadas. A longa terapia com testosterona utilizada por estes leva à amenorréia reversível, com folículos ovarianos preservados, sem esgotar ou afetar o desenvolvimento dos folículos primordiais. (8)

Sendo assim, devido à quantidade limitada de tecido humano disponível para uso em pesquisa, bem como números reduzidos de folículos em amostras obtidas de pacientes mais velhas ou com doença ovariana, viu-se nos ovários dos pacientes transgêneros masculinos submetidos a cirurgia de redesignação de sexo uma oportunidade de estudo deste órgão nobre em pesquisa. Nesta dissertação serão descritas as características histológicas do tecido ovariano humano submetido à cultura.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A estratégia de busca foi estabelecida a partir da pesquisa dos “*MeSH (Medical Subject Headings) Vocabulary*” e dos termos livres associados na base de dados PubMed/SCOPUS, combinando-se duas estratégias parciais. A primeira foi elaborada para busca de artigos sobre preservação ovariana em pacientes submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida e a segunda para busca de artigos sobre realização de cultura de tecido ovariano.

As palavras chaves utilizadas foram as seguintes: *ovary, drug-therapy, cyclophosphamide, anti-mullerian hormone, fertility preservation, ovary explant, tissue culture techniques*. O total de artigos encontrados foi de 1716, sendo selecionados 143 artigos, dos quais 51 foram incluídos, conforme critérios adotados a partir da leitura dos títulos e resumos na íntegra (figura 1). A busca também incluiu as referências bibliográficas dos artigos selecionados.

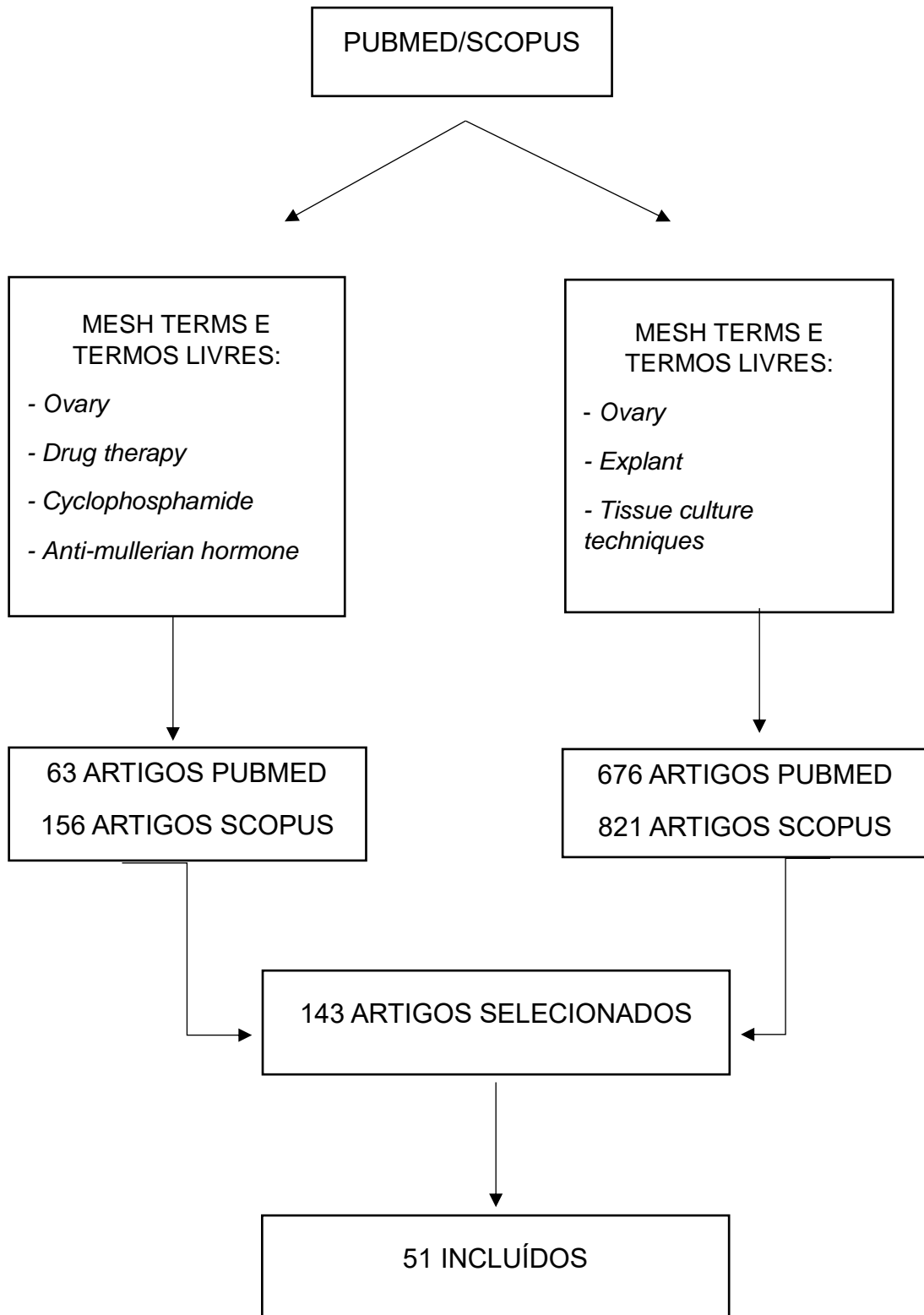


FIGURA 1. Estratégia de busca na literatura

## 2. MAPA CONCEITUAL

O desenvolvimento de novos métodos de preservação ovariana é relevante nos casos em que a criopreservação de oócitos ou embriões não é possível. Entretanto, é necessário o desenvolvimento de modelos experimentais utilizando tecido humano para melhor compreensão dos mecanismos da foliculogênese e, desse modo, suportar o crescimento e desenvolvimento folicular em fragmentos de tecido ovariano criopreservados. A cirurgia de redesignação sexual, realizada nos pacientes transsexuais masculinos, apresenta uma oportunidade de tecido ovariano jovem e saudável para pesquisa (figura 2).

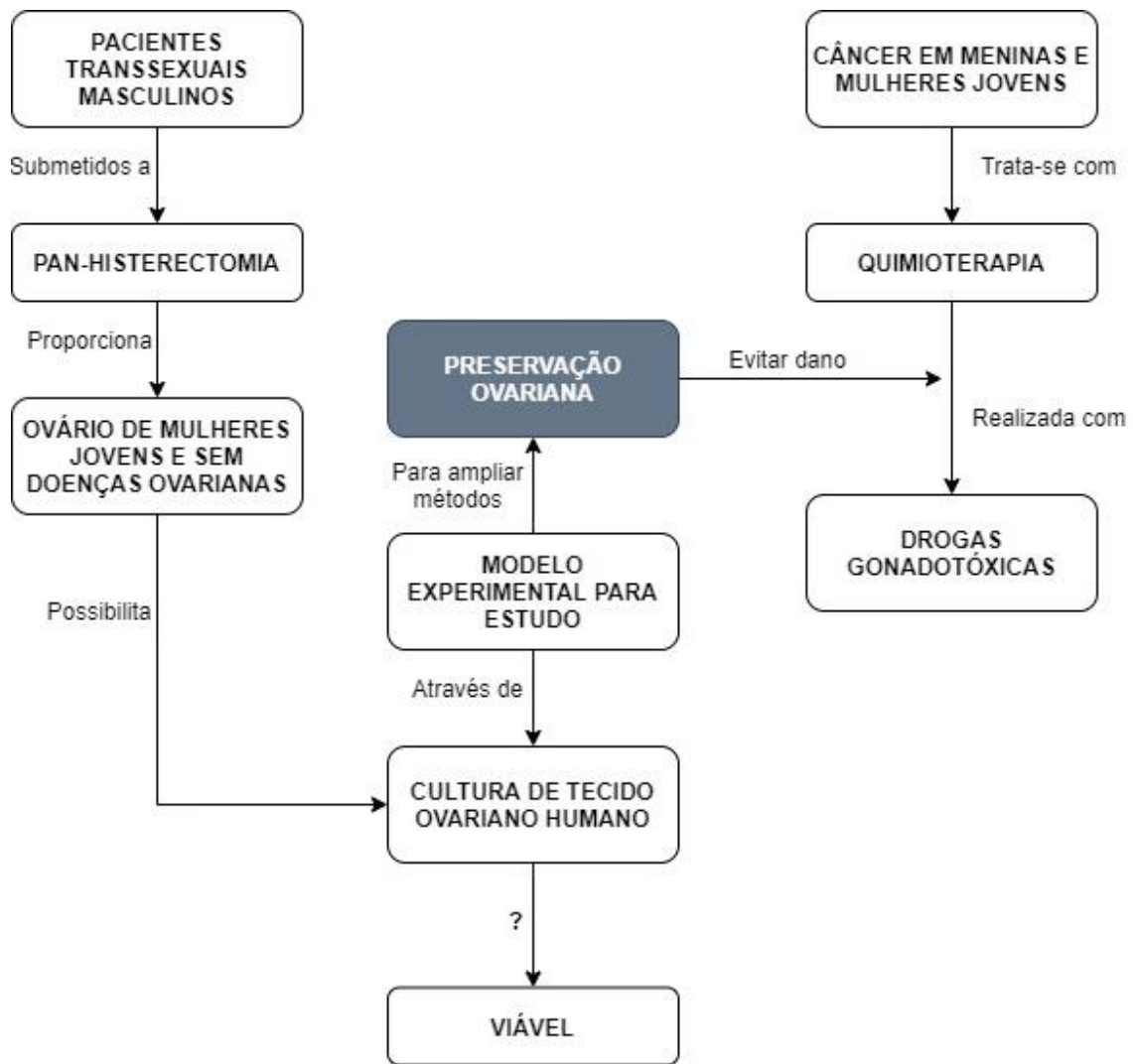


FIGURA 2. Mapa conceitual esquemático desta dissertação.

### 3. ANATOMIA E HISTOLOGIA OVARIANA

A principal função da gônada feminina (ovário) é a diferenciação e liberação do oócito maduro para fertilização e manutenção da espécie. São glândulas endócrinas, que sintetizam hormônios reprodutivos, permitem o desenvolvimento de características sexuais secundárias femininas e a gestação. Localizam-se na pelve, dentro da cavidade peritoneal, suspensos por pregas peritoneais e fixados no útero pelos ligamentos útero-ováricos (9,10).

O ovário pode ser dividido em três porções principais: o córtex externo, a medula central e o hilo. O hilo é ponto de ligação do ovário ao mesovário, contém nervos, vasos sanguíneos e células do hilo. A porção mais externa do córtex é chamada túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo denso, tendo na sua superfície uma camada única de epitélio cuboidal. Os oócitos, que são as células germinativas, encontram-se encapsulados em complexos chamados folículos, que constituem a parte interna do córtex, incorporados ao tecido estromal (9).

O tecido estromal é composto de tecido conectivo e de células intersticiais, as quais tem capacidade de responder ao hormônio luteinizante (LH) ou à gonadotrofina coriônica humana (hCG) com a produção de androgênio. A área central medular do ovário contém tecido conjuntivo frouxo com rico leito vascular (11).

#### 4. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário dos mamíferos e é composto por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais), que interagem e promovem a funcionalidade do folículo (12). Os folículos adquirem características morfológicas distintas durante o seu desenvolvimento, alguns começam a crescer assim que são formados, embora a maioria passe meses ou anos no estado de repouso. O primeiro sinal de crescimento é a retomada da proliferação celular pelas células da granulosa. O início do recrutamento folicular, ainda pouco conhecido, possivelmente se deve à liberação de estímulos inibitórios que mantem o pool de folículos em quiescência (10). O desenvolvimento inicial folicular é independente de gonadotrofinas. Os camundongos *knockout* para receptor de hormônio folículo estimulante (FSH) apresentam folículos apenas em estágio pré-antral, o que sugere que o FSH é essencial para a continuidade do crescimento folicular para estágios mais avançados (13).

O crescimento folicular pode ser reconhecido por um aumento no tamanho do oócito e uma mudança na forma das células da granulosa. O volume citoplasmático e nuclear do oócito aumentam dramaticamente e as células da granulosa, que geralmente são fusiformes em folículos primordiais inativos, assumem uma forma cuboidal à medida que proliferam (14). Este processo, chamado foliculogênese, é caracterizado por diferentes fases de crescimento e diferenciação, refletidos em aparência morfológica e responsividade endócrina (15) (figura 3).



A primeira fase de crescimento ocorre continuamente e independentemente da influência de gonadotrofinas e se caracteriza pelo crescimento dos oócitos, lenta proliferação de células da granulosa, formação de zona pelúcida e recrutamento de células da teca a partir do compartimento intersticial. O crescimento de oócitos é o evento mais marcante durante esse estágio de desenvolvimento. Esta fase compreende os folículos pré-antrais, incluindo os folículos primários e secundários que variam de 200 a 400  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os folículos primários têm um oócito em crescimento, uma camada de células da granulosa cuboidal, sem camada celular da teca e zona pelúcida parcial, enquanto que os folículos secundários são caracterizados por um oócito que é totalmente cercado por uma zona pelúcida e a presença de pelo menos duas camadas de células da granulosa (15).

A morfologia folicular pré-antral é comparável em todas as espécies, contudo, o tempo necessário para atingir a fase antral (responsiva às gonadotrofinas) é variável. Folículos de ratos precisam de apenas alguns dias para atingir 200  $\mu\text{m}$ , enquanto que, em animais maiores (como em ovelha, vaca e humanos), a fase de crescimento pré-antral leva semanas ou até meses (15).

À medida que continuam crescendo e atingem um diâmetro de 200  $\mu\text{m}$ , nota-se o surgimento de uma cavidade preenchida por fluido rico em estrogênio, chamada de cavidade antral, caracterizando os folículos antrais, conhecidos também como folículos de Graaf. Tais folículos passam a ser dependentes do FSH para seu desenvolvimento e podem atingir mais de 15 mm de diâmetro. Neste estágio, três tipos de células diferenciadas cercam o oócito. No lado externo da membrana basal, as células tecais, com receptores do LH e, no lado interno da membrana basal, as células da granulosa, células somáticas primárias

que sustentam o crescimento e desenvolvimento dos oócitos do estágio primordial até antral. Com a formação do antro folicular, as células da granulosa diferenciam-se em duas células anatomicamente e funcionalmente distintas: células murais que compõem a parede do folículo antral e células do cumulus (CC) ao redor do oócito. Embora as células da granulosa e as CC compartilhem algumas semelhanças, elas são diferentes em resposta às gonadotrofinas e à secreção de fatores de crescimento, dando-lhes papel especializado em relação ao desenvolvimento dos oócitos (16).

No grupo folículos antrais recrutados pelo FSH, no início do ciclo menstrual, apenas um folículo cresce mais rápido que o resto da coorte e produz níveis mais altos de estrógenos e inibinas (o folículo selecionado). As razões exatas pelas quais um folículo emerge como dominante não são claras, é provável que apresente maior sensibilidade ao FSH, tanto por expressão aumentada de receptores quanto por aumento dos fatores de crescimento local. Os estrógenos e as inibinas, produzidos pelo folículo dominante, suprimem o FSH hipofisário, resultando na privação da estimulação adequada do FSH para os demais folículos antrais, essencial para o desenvolvimento (10).

O oócito, no folículo primordial, encontra-se com a meiose parada no estágio diplóteno da prófase I e, durante o seu desenvolvimento dentro do folículo, ele deve adquirir a capacidade de retomar a meiose e de apoiar a fertilização e o desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento folicular culmina na ovulação, em resposta ao aumento de LH, resultando na retomada da meiose e ruptura do folículo de Graaf (dominante) com consequente liberação do complexo cumulus-oócito. A meiose II só irá se completar se ocorrer a fertilização do oócito (11).

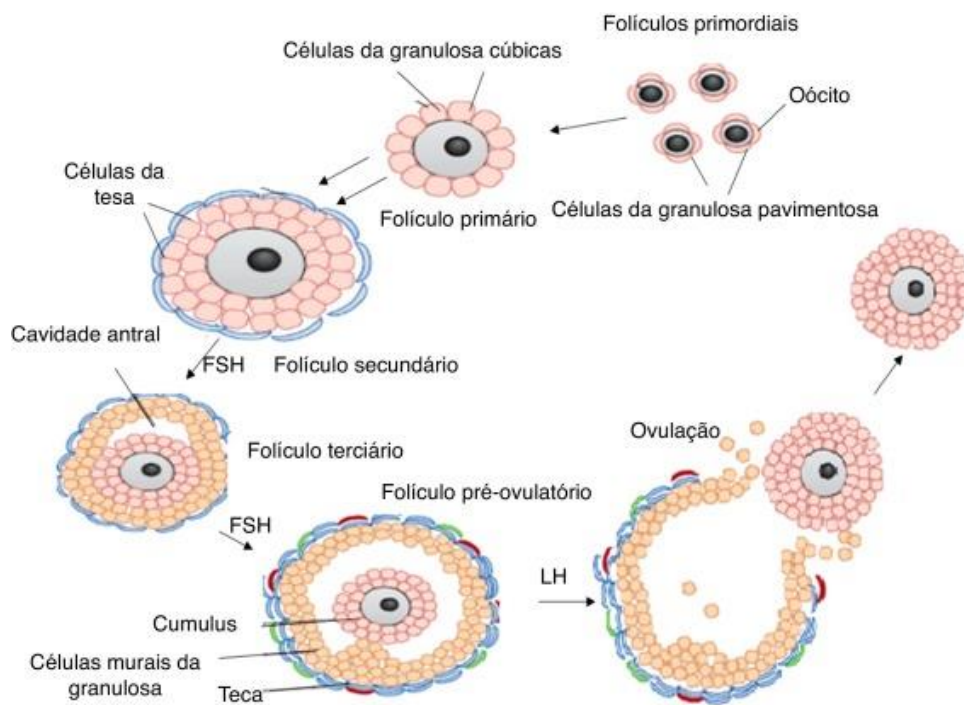


FIGURA 3. Organização, estrutura e desenvolvimento dos folículos ovarianos (12).

## 5. HORMÔNIOS REGULADORES DA FOLICULOGÊNESE

O crescimento folicular inicial é independente de gonadotrofinas e requer um complexo controle e comunicação entre o oócito e as células somáticas. Esta comunicação ocorre através de moléculas de sinalização, sendo muitas destas pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (17). O crescimento folicular durante a fase antral é dependente de três níveis de regulação: extraovariana, intraovariana e intrafolicular. Nesta fase, para

manutenção de seu desenvolvimento, os folículos passam a depender do estímulo das gonadotrofinas hipofisárias, ou seja, do LH e do FSH (15).

Grande parte dos folículos antrais sofrerá atresia, enquanto apenas um subconjunto continuará evoluir para a fase pré-ovulatória. O FSH é necessário para resgatar esse *pool* de células da atresia, sendo essencial para a sobrevivência das células da granulosa, a proliferação, a produção de estradiol e a produção de receptores para LH. As células murais da granulosa do folículo dominante expressam altas concentrações de receptores de LH. Assim, elas respondem ao pico pré-ovulatório de LH, o qual ativa uma sequência de eventos que irão culminar com a ovulação, como a retomada da meiose, a expansão do cumulus, a ruptura folicular e a liberação do complexo cumulus-oócito com o oócito maduro. (17)

O FSH, ao se ligar ao seu receptor, FSHR, o qual se encontra acoplado à proteína G, inicia a via clássica da adenilciclase / adenosina monofosfato cíclico (cAMP) / proteína cinase A (PKA). A ativação desta via resulta na fosforilação e ativação do *transcription factor cAMP-response element-binding protein* (CREB), regulando positivamente um número de genes-alvo, como a aromatase e o receptor de LH. Juntamente com estradiol, o FSH atua modulando o ciclo celular das células da granulosa afetando sua proliferação. Esta gonadotrofina também ativa inúmeras vias independentes da PKA, como a proteína cinase B (Akt), pela via fosfatidilinositol-3-cinase (Pi3K) e SRC *tyrosine kinase-dependent pathway*. (17)

O LH é responsável pelo controle das principais enzimas envolvidas na síntese de andrógenos através do colesterol, dentre elas: *Steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), que atua como transportador de colesterol para a

membrana mitocondrial interna; *Cholesterol side-chain cleavage enzyme* (CYP11A1), que converte o colesterol em pregnenolona; 17 $\alpha$ -hidroxilase (CYP17A1), responsável por converter a pregnenolona em desidroepiandrosterona (DHEA); e 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), que converte DHEA em androstenediona. (17) As enzimas que convertem a androstenediona em estradiol, aromatase (CYP19A1) e 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD), são expressas pelas células da granulosa e são reguladas pelo FSH (17).

Além das vias de sinalização ativadas e reguladas por FSH e LH, fatores produzidos localmente também modulam a foliculogênese e a produção hormonal. Inúmeros fatores locais da superfamília TGF- $\beta$  atuam de forma autócrina nos folículos ovarianos, como a ativina e as inibinas. O ambiente folicular transita pela predominância de ativina para inibinas durante a evolução do desenvolvimento dos folículos. A ativina apresenta um importante papel no desenvolvimento folicular inicial. Estudo avaliou o efeito da ativina em folículos pré-antrais isolados e expostos a cultura *in vitro* evidenciando o papel deste fator no estímulo ao crescimento dos folículos pré-antrais, além de atuar estimulando a expressão do receptor de FSH nas células da granulosa. As inibinas, liberadas pelas células da granulosa e células da teca, atuam suprimindo a liberação de FSH pela hipófise, contrariando o efeito da ativina. Há um número limitado de estudos descrevendo um possível efeito local das inibinas, a qual poderia atuar estimulando um aumento na produção de androgênios pelas células da teca e suprimindo o RNA mensageiro (RNAm) de FSHR (13).

Além das gonadotrofinas, outros fatores extraovarianos também modulam a foliculogênese, como os neurohormônios, sendo o hormônio liberador de

gonadotrofinas (GnRH) o mais relevante, o qual atua estimulando a secreção e a liberação das gonadotrofinas (18). A secreção de GnRH é controlada por uma complexa rede de comunicação neuroendócrina de controle autócrino e parácrino, através dos aminoácidos aspartato, ácidos gama aminobutírico A e B (GABA), kisspeptina, noradrenalina, serotonina, dopamina, endorfinas, melatonina, acetilcolina, opióides e dos próprios esteroides sexuais. Na hipófise, mais precisamente nos gonadotrofos, o GnRH liga-se a receptores específicos que induzem a expressão de RNAm para síntese de gonadotrofinas. Esteroides sexuais, inibina, ativina, peptídeos da família dos fatores transformadores do crescimento, além do próprio GnRH atuam regulando os receptores específicos (11, 19, 20).

#### 5.1 VIA DA FOSFATIDILINOSITOL-30-CINASE (Pi3K)

Os fatores que iniciam o processo de ativação folicular não são conhecidos. Entretanto, o conjunto de evidências atuais mostra um papel da via de sinalização da fosfatidilinositol-30-cinase (Pi3K-Akt) na regulação inicial do desenvolvimento folicular. Modelos de camundongos geneticamente modificados com deleção de genes na via PTEN-Pi3K-Akt-FoxO3 exibiram ativação prematura de todos os folículos dormentes. Não está claro como essas vias regulam o desenvolvimento folicular humano, mas os modelos de cultura facilitam o estudo desses processos (21, 22).

O gene *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome* (*PTEN*) codifica uma enzima fosfatase que converte a fosfatidilinositol fosfato/*phosphatidylinositol phosphate* (PIP) 3 em PIP2, a qual regula negativamente a via de sinalização Pi3K-Akt, suprimindo o início do desenvolvimento folicular. A

transcrição do fator *Forkhead Box O3* (FoxO3) atua a jusante nesta via, resultando em inibição do recrutamento folicular. Se este gene sofre deleção, resulta em ativação folicular dos folículos primordiais dormentes de camundongos (23, 24). A deleção de *PTEN* no oócito aumenta a fosforilação da Akt e culmina com a exportação de proteínas FoxO3 (22) (figura 4).

A sinalização mediada por Pi3K converge na *phosphatidylinositol phosphate dependent kinase-1* (PDK1), que fosforila Akt e a ativa. A Akt pode tanto fosforilar quanto inativar *tuberous sclerosis complex 2* (*TSC2, or tuberin*), que leva à ativação do *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) (figura 4). O mTORC1 pode fosforilar e assim ativar a S6 quinase 1 (S6K1), que por sua vez pode fosforilar e ativar a proteína ribossômica S6 (rpS6), otimizando desta forma a tradução de proteínas necessárias para o crescimento celular. A manipulação dessa via pode ter importantes aplicações clínicas no campo da preservação da fertilidade (22).

O mTORC1, uma serina/ treonina cinase, participa na regulação da ativação do folículo primordial. Um estudo de Zhou *et al.* (2017) testou a rapamicina, um inibidor específico de mTORC1, para avaliar se esta droga poderia inibir a ativação excessiva de folículos primordiais de ovários de camundongos, ajudando a manter a reserva funcional do ovário. Os camundongos foram aleatoriamente separados em grupos e receberam diferentes doses de ciclofosfamida (CY) associado à rapamicina. Após diferentes esquemas de tempo de tratamento, os ovários foram avaliados. Neste experimento, a rapamicina foi capaz de reduzir a perda de folículos primordiais (21).

Ovários de camundongos tratados *in vitro* com inibidor farmacológico de PTEN e um peptídeo de ativação de Pi3K apresentaram ativação dos folículos primordiais adormecidos. No experimento, esses ovários foram transplantados para a cápsula renal de receptoras ooforectomizadas adultas tratadas com FSH para promover o crescimento folicular. Como resultado, foram encontrados ovos maduros capazes de gerar prole viável e fértil. Quando utilizados fragmentos corticais humanos contendo folículos primordiais, também foi possível notar ativação dos folículos dormentes, culminando em folículos grandes antrais contendo oócitos maduro após xenotransplante em camundongos imunodeficientes (25). O mecanismo exato que estas vias participam da regulação folicular ainda não está clara, mas os modelos de cultura facilitam o estudo destes processos (4, 22, 26, 27).

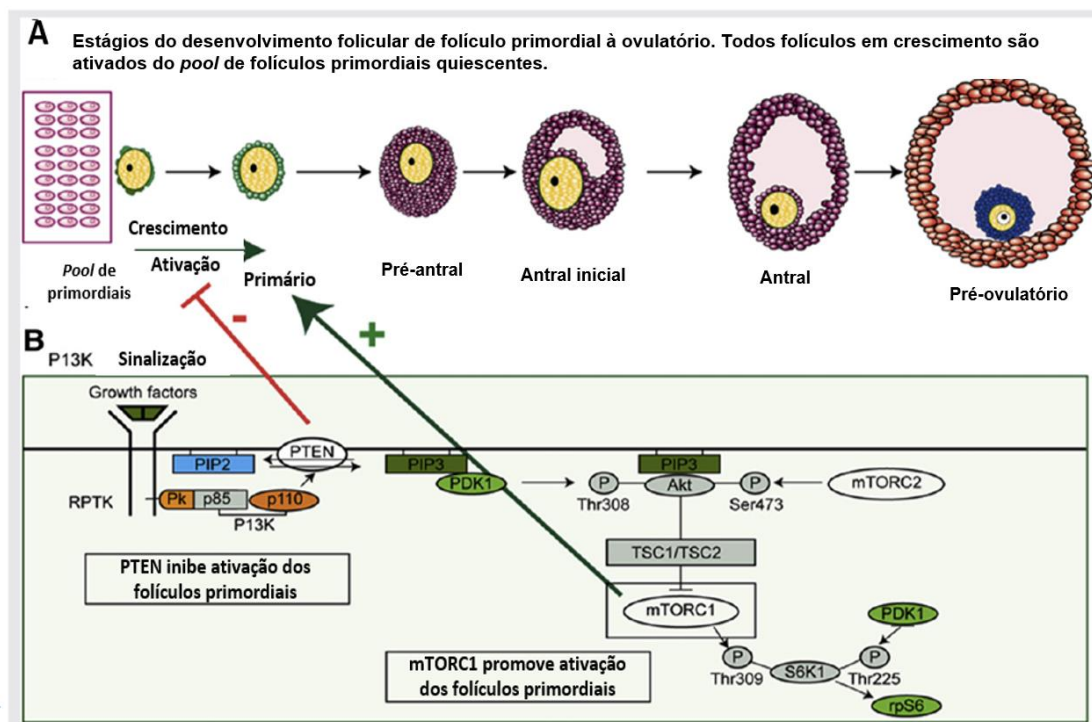




FIGURA 4. Adaptada de Telfer *et al.*, 2013. Representação esquemática do crescimento folicular do *pool* de folículos primordiais e a influência da via simplificada da Pi3K na ativação folicular (22).

## 5.2. HORMÔNIO ANTIMULLERIANO

O hormônio antimulleriano (AMH) é uma glicoproteína que pertence à superfamília do TGF- $\beta$  e produzido pelas células da granulosa de folículos pré-antrais e pequenos antrais (28). O ovário começa a produzir AMH ainda intraútero, em torno das 36 semanas de gestação, com o aumento dos níveis a partir da adolescência e pico em torno dos 25 anos de idade. A redução dos níveis hormonais é gradual até atingir níveis indetectáveis alguns anos antes da menopausa (29).

A avaliação de ratos *knockout* que não produziam AMH evidenciou que estes animais apresentavam maior quantidade de folículos primordiais recrutados, o que levava a depleção folicular precoce da reserva ovariana (30). Adicionalmente, experimentos *in vitro* de ovários humanos (31), bovinos, ratos e camundongos mostraram que a transição de folículo primordial para folículo em crescimento foi aumentada na ausência de AMH e bloqueada quando o AMH foi adicionado no meio de cultura (4).

Um estudo avaliou a expressão de RNAm de AMH em camundongos submetidos à tratamento *in vivo* com CY e o efeito do AMH associado ao metabólito ativo de ciclofosfamida em cultura de ovários de camundongos *ex vivo*. A expressão do RNAm de AMH em camundongos foi reduzida pela metade

nas primeiras horas após o tratamento com CY. Quando adicionado AMH humano recombinante em uma cultura *ex vivo* junto com CY, o ovário manteve um número maior de folículos primordiais, com uma perda folicular de 17% no grupo combinado (AMH+CY) e com uma perda de 53% no grupo com uso de CY isolado, após uma semana de cultura (3, 5).

Sonigo *et al.* (2019) avaliaram o papel do AMH recombinante nos ovários de ratos, o efeito da coadministração de CY e de AMH no *pool* de folículos primordiais. Camundongos receberam injeção intraperitoneal de CY isolada, CY associada à AMH ou apenas veículo no grupo controle, uma semana após os ovários foram removidos, cortados e analisados. A proporção relativa de folículos primordiais foi significativamente maior nos ovários de camundongos tratados com CY + AMH quando comparado com os que receberam apenas a CY. A FOXO3A, que é um fator de transcrição e é fosforilado e exportado do núcleo para o citoplasma durante a ativação folicular, diminuiu significativamente nos ovários dos ratos tratados com AMH. Também foi constatado que a administração conjunta do AMH não restaurou a ciclicidade estrogênica, mas resgatou a fertilidade nos ratos tratados com CY. Os animais tratados apenas com CY apresentaram uma redução significativa do número de oócitos resgatados após indução da ovulação, sugerindo uma exaustão dos folículos recrutáveis (4).

O AMH inibe o recrutamento de folículos primordiais, evita a seleção de folículos por FSH e inibe a ação da enzima aromatase, além de ser relativamente independente de gonadotrofinas (29). O seu papel como inibidor intraovariano da atresia folicular é de suma importância na preservação do *pool* de folículos

primordiais quiescentes, apresentando um fator chave na regulação do recrutamento folicular (28). Desta forma, atua como regulador parácrino negativo do início da foliculogênese (29).

O uso de HAM poderia ser uma opção de preservação da reserva ovariana durante tratamentos quimioterápicos. Este hormônio teria o potencial de atuar na manutenção do ovário em estado de quiescência, impedindo a ativação do *pool* folicular sem interferir na atividade quimioterápica nos tecidos-alvo, além de preservar a esteroidogênese e os benefícios clínicos a longo prazo retardando ou evitando a insuficiência ovariana precoce.

## **6. RESERVA OVARIANA**

Os ovários apresentam um número fixo de folículos primordiais ao nascimento, os quais constituem a reserva ovariana. A ativação desses folículos é responsável pelo declínio irreversível da função reprodutiva ao longo dos anos (1). Ainda durante a vida intrauterina, com aproximadamente 16 a 20 semanas de gestação, o feto apresenta o número máximo de folículos primordiais, em torno de 7 milhões. Ao nascimento, este número reduz para 1 a 2 milhões e, ao início da puberdade, restam apenas 300 mil folículos primordiais. Já durante a vida reprodutiva, apenas 400 a 500 oócitos serão ovulados. O declínio da reserva ovariana com o passar do tempo é irreversível e a taxa desta redução é variável entre as mulheres (2).

A reserva ovariana é influenciada pela idade, pela genética e por variáveis ambientais. O termo “reserva ovariana” costuma ser usado para descrever o potencial reprodutivo da mulher, refletindo o número de oócitos pré-antrais. Os marcadores de reserva ovariana comumente utilizados avaliam apenas a quantidade de oócitos, sendo fracos preditores de qualidade. A idade da mulher ainda é o melhor preditor de qualidade oocitária (29). Atualmente, a avaliação da reserva ovariana é útil para informar as pacientes sobre seu potencial reprodutivo em situações de tratamentos de reprodução humana, de proximidade com menopausa, de aconselhamento para jovens recebendo quimioterapia gonadotóxica (29).

A manutenção da reserva ovariana envolve uma repressão contínua da ativação dos folículos primordiais através do equilíbrio entre os fatores que ativam o início do crescimento e fatores inibidores. Desequilíbrios entre os fatores ativadores e inibitórios podem induzir a depleção folicular acelerada, IOP e infertilidade (4). Uma das grandes causas de redução da reserva ovariana potencialmente evitável é o uso de drogas quimioterápicas gonadotóxicas utilizadas no tratamento de alguns tipos de neoplasias. Essas drogas podem desencadear ativação folicular exacerbada e levar a depleção acelerada e prematura da reserva folicular.

## **7. CÂNCER E INFERTILIDADE**

O câncer é umas das principais causas de adoecimento e óbito da população mundial e avanços nos tratamentos resultam em taxas crescentes de sobrevida (32). Desta forma, os efeitos adversos a longo prazo do tratamento,

como a IOP devem ser evitados ou atenuados (3). A comunidade científica busca tratamentos mais efetivos e específicos, visando aumentar as taxas de cura com a menor toxicidade sistêmica e gonadal. Mesmo com os avanços nos tratamentos, o uso de quimioterápicos citotóxicos ainda é uma realidade (33).

A IOP é um efeito adverso indesejável a longo prazo do tratamento de neoplasias que utilizam esquemas quimioterápicos gonadotóxicos. Estas drogas podem levar mulheres à infertilidade, sendo a extensão do dano ovariano dependente do tipo e da dose do medicamento (4). Além dos quimioterápicos, a radioterapia também tem potencial de causar danos às gônadas. O risco varia de acordo com a dose, o campo da radiação e os esquemas de fracionamento. A idade da paciente no momento do tratamento é um fator prognóstico do declínio da reserva ovariana. Além da lesão ovariana, a irradiação da pelve pode levar a redução da vascularização uterina, com redução do volume uterino, fibrose miometrial e dano endometrial, assim como associação com desfechos obstétricos negativos (6). Além de infertilidade, a IOP resulta em aumento da morbidade devido a alterações decorrentes do hipoestrogenismo crônico, como redução na massa óssea, risco aumentado de doença cardiovascular e disfunção sexual e cognitiva (34).

Os mecanismos pelos quais alguns quimioterápicos podem danificar a reserva ovariana são largamente estudados, no entanto muitos deles não são totalmente conhecidos. Estudos sugerem que, por um lado, estes agentes poderiam exercer toxicidade direta nos folículos em crescimento, causando danos no DNA e conseqüente apoptose. Por outro lado, poderiam desencadear o esgotamento da reserva ovariana através do recrutamento dos folículos primordiais via ativação da via Pi3K, culminando com apoptose folicular (3, 35).

Recentemente, uma revisão sistemática avaliou o efeito da quimioterapia a longo prazo na função ovariana em mulheres. Foram incluídos 45 estudos, com um total de mais de 5000 pacientes. A média de idade da menopausa foi menor em pacientes submetidas à quimioterapia do que na população em geral. Os fatores de risco mais importantes para o surgimento de disfunção ovariana foram o uso de agentes alquilantes e idade mais avançada no início do tratamento. (1)

O *Childhood Cancer Survival Study*, estudo de coorte desenhado para avaliar infertilidade em pacientes após tratamento para diversos tipos de câncer, cujos desfechos primários foram infertilidade e tempo para engravidar em comparação com controles de irmãos, demonstrou que os pacientes tinham risco aumentado de infertilidade e maior intervalo de tempo para gravidez. Além disso, as pacientes tiveram uma probabilidade menor de engravidar em comparação aos seus irmãos. (36)

Sendo assim, a preocupação com a preservação da fertilidade deve fazer parte do atendimento dos pacientes com câncer. Prevenir a disfunção ovariana induzida pela quimioterapia seria importante para preservar as possibilidades de concepções naturais ou mesmo medicamente assistidas após os tratamentos (4).

## **8. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO OVARIANA**

Os métodos atualmente utilizados para preservar a fertilidade das pacientes submetidas a tratamentos citotóxicos são a criopreservação de embriões, de oócitos e de tecido ovariano. Entretanto, as técnicas disponíveis apresentam indicação limitada à idade da paciente e ao *status* clínico. Além

disso, são procedimentos invasivos e que podem demandar tempo, não sendo adequadas nos casos de meninas pré-puberes e nos casos em que o atraso no início do tratamento não é aceitável (5). É importante ressaltar que os métodos de criopreservação dependem de equipe e de laboratório específicos, sendo de alto custo financeiro (5, 34). O potencial de fertilidade pode ser afetado simplesmente pelo avanço da idade como pelo tratamento do câncer ou vários outros fatores, incluindo condições metabólicas, doenças autoimunes, intervenções cirúrgicas específicas e procedimentos de redesignação sexual (6).

A criopreservação de embriões ou oócitos são, atualmente, as únicas opções recomendadas em mulheres em idade reprodutiva. Com o progresso das técnicas de criopreservação, embriões congelados apresentam taxas de nascidos vivos semelhantes ou até maiores que as de embriões frescos. A vitrificação dos oócitos é considerada a primeira opção para pacientes sem relacionamentos estáveis e resulta em taxas de gravidez comparáveis aos oócitos frescos sem aumento nas morbidades obstétricas ou neonatais. Também é possível flexibilizar o início da indução da ovulação (fase folicular ou lútea), oportunizando o início da quimioterapia mais precocemente, sem prejuízo no número total de oócitos recuperados (6). Para minimizar o efeito do tratamento de neoplasias na fertilidade, a transposição ovariana e uso de agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) foram estudados.

Os análogos do GnRH (GnRHa), durante muitos anos, foram considerados como opção terapêutica para uso concomitante durante a quimioterapia com objetivo de proteção da reserva ovariana (21). A eficiência desta medicação na prevenção da insuficiência ovariana prematura, apesar do esperado, ainda é controversa (37). Uma meta-análise de ensaios clínicos

randomizados avaliou o papel da supressão temporária do ovário com agonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRHa) na prevenção da insuficiência ovariana prematura induzida por quimioterapia. O uso desta medicação foi associado com redução de risco, sem aparentes consequências negativas no prognóstico (38).

Um estudo de Demeestere *et al.* (2016) analisou o efeito a longo prazo do uso de um GnRHa durante o tratamento quimioterápico de pacientes com linfoma. Os pacientes foram divididos de forma aleatória entre grupo controle e grupo tratado com GnRHa e a função ovariana e fertilidade foram avaliadas no seguimento de 2, 3, 4, 5 e 7 anos. O estudo concluiu que o uso desta medicação não é eficiente na prevenção de IOP induzida por quimioterapia em pacientes jovens com linfoma, assim como não tem influência na taxa de gravidez (39). O uso de análogos apresenta dados conflitantes sobre a função ovariana e taxa de gravidez a longo prazo, necessitando de estudos confirmatórios adicionais (6).

A criopreservação de tecido ovariano com posterior reimplante é uma técnica experimental, uma possível promessa para o futuro como alternativa para preservar a fertilidade em meninas pré-puberes porém com possível risco de reimplante de células neoplásicas (6). O desenvolvimento de métodos destinados a manter o ovário em estado de quiescência durante a quimioterapia, protegendo dessa forma a reserva ovariana é muito estudado. A supressão do desenvolvimento folicular poderia ser uma opção as técnicas já existentes, além de ter o potencial de preservar a esteroidogênese e os benefícios clínicos a longo prazo em retardar ou evitar a insuficiência ovariana precoce.



## 8.1 CULTURA DE FOLÍCULOS – MATURAÇÃO *IN VITRO*

O desenvolvimento de condições de cultura para células germinativas imaturas é um dos maiores desafios da medicina reprodutiva tendo como objetivo obter oócitos competentes. O crescimento completo *in vitro* de folículos primordiais com subsequente fertilização *in vitro* seguida de transferência de embrião com filhotes vivos foi alcançada, até agora, somente em camundongos (7).

O primeiro experimento com sucesso foi realizado por Eppig e O'Brien em 1996. A cultura foi realizada em duas etapas, iniciando por cultura de oito dias de ovários inteiros de camundongos recém nascidos, com folículos primordiais começando a se formar, seguidos por dissociação enzimática do ovário, isolamento e cultura adicional dos complexos de células oócito-granulosa dos folículos secundários (22). Estudos subsequentes otimizaram a técnica com resultado de inúmeros filhotes. No entanto, os camundongos possuem a peculiaridade de os folículos formarem-se após o nascimento, nos primeiros dias, resultando em um ovário com *pool* de folículos primordiais uniforme, além do fato dos ovários serem pequenos o suficiente para possibilitar o cultivo intacto e com a textura que facilita a dissociação enzimática (40, 41). Em contraste aos camundongos, nos primatas e na maioria das espécies domésticas, os folículos formam-se durante a vida fetal e os ovários são mais volumosos para serem cultivados inteiros, além de apresentar estroma firme, o que dificulta a dissociação enzimática (22, 42).

Estudos mostram que após iniciado o crescimento folicular dentro do tecido cortical ovariano, os folículos humanos podem evoluir para estágios mais avançados de desenvolvimento, contudo, não é possível completar seu

desenvolvimento e acabam não sobrevivendo. Desse modo, para apoiar a continuidade do crescimento folicular, é necessário liberar os folículos do córtex e do ambiente estromal, cultivando-os individualmente para limitar o efeito das interações que possivelmente ocorrem dentro do tecido cortical (43).

A maioria dos folículos no tecido cortical ovariano encontra-se no estágio primordial, inativo. Desse modo, a primeira etapa de um sistema para crescimento folicular deve suportar o desenvolvimento precoce dos folículos. Entretanto, os fatores que regulam o crescimento precoce ainda não estão bem definidos. Sabe-se que o processo requer uma combinação de inibidores, estimuladores e fatores de manutenção (22, 44).

O ambiente físico dos folículos dentro do córtex afeta sua resposta a fatores ativadores e inibidores e, assim, influencia seu desenvolvimento. A forma do corte do tecido e a espessura do estroma são fatores importantes na regulação do início do crescimento folicular *in vitro*. Cubos ou tiras sólidas de tecido cortical humano apresentam menor iniciação ao crescimento e alta proporção de folículos atréticos em comparação com córtex cultivado como "folhas" achatadas, onde grande parte do estroma subjacente é removido. Uma vez o crescimento folicular iniciado dentro da tira, os folículos podem evoluir para estágios multilaminares, porém, a partir desse momento, o ambiente cortical torna-se inibitório para um maior crescimento (7).

Experimento utilizando peças de tecido do córtex ovariano extraídas através de biopsia, demonstrou que os folículos primordiais humanos podem ser ativados para crescer e desenvolver após seis dias de cultura *in vitro*, com detecção de folículos pré-antrais multilaminares (secundários). Após a primeira fase de cultura, os autores utilizaram meio de cultura isento de soro, sem matriz

de suporte e removeram a maioria do tecido estromal subjacente e todos os folículos em crescimento. Os folículos foram novamente levados a cultura *in vitro* por mais quatro dias, chegando no estágio pré-antral/antral precoce. O experimento concluiu que, sob certas condições, é possível obter o desenvolvimento de folículos e oócitos a partir de folículos primordiais / primários humanos. (43)

Um fator que representa um desafio técnico da maturação folicular *in vitro* é o diâmetro típico de um folículo pré-ovulatório, que em humanos chega entre 15–20 mm. Alguns autores sugerem que talvez não seja necessário alcançar o tamanho pré-ovulatório e que os folículos possam ser cultivados em tamanhos antrais muito menores com adequado crescimento e maturação do oócito. Oócitos recuperados de folículos com diâmetro menores que 6 mm cresceram durante uma cultura de maturação *in vitro* por 40 horas adquirindo competência, com desenvolvimento de filhos saudáveis (45).

Tendo em vista o complexo sistema regulatório do desenvolvimento folicular, permanece o desafio de criar sistemas de cultura cada vez mais elaborados e complexos a fim de promover um ambiente similar ao ovário *in vivo* e assim, através de fragmentos de tecido ovariano criopreservados, suportar o crescimento folicular. O desenvolvimento e maturação completa dos oócitos *in vitro* com competência para fertilizar, produzir embriões e obter prole viva é um desafio.

O sucesso em camundongos fornece estímulo visando um dia ser possível o nascimento de humanos após maturação folicular *in vitro*. No entanto, uma preocupação é se os sistemas de cultura *in vitro* trazem interferências na epigenética e alterações nos padrões de *imprinting* do genoma com consequente

perturbação no desenvolvimento embrionário normal. Estudos dos oócitos derivados de maturação *in vitro* de camundongos e de ovinos evidenciou correta metilação do DNA. (22)

Avanços na bioengenharia com desenvolvimento de matrizes e hidrogéis sintéticos são de suma importância para alcançar este objetivo. A capacidade de sustentar a sobrevivência folicular, o crescimento, a diferenciação de células somáticas e a maturação das células germinativas é possível em camundongos, mas ainda é um objetivo a ser alcançado para preservação da fertilidade em humanos (22).

## **9. CULTURA DE TECIDO OVARIANO**

Os roedores costumam ser muito utilizados como modelos experimentais na ciência e são excelentes para o pioneirismo de algumas tecnologias. Entretanto, para avaliar a viabilidade de testes com aplicabilidade humana, é necessário avaliar espécies intermediárias (grandes mamíferos) e, idealmente, tecido humano. Folículos de grandes mamíferos (vacas, ovelhas e cabras) são similares aos folículos humanos em relação às taxas e tamanho de crescimento, no entanto, o prolongado tempo de foliculogênese *in vivo*, estimado em mulheres em aproximadamente 90 dias, considerando o início do crescimento de um folículo primordial até o estágio pré-ovulatório, difere de outros mamíferos (7).

A impossibilidade de acesso ao tecido ovariano humano, livre de doenças, de mulheres jovens - por aspectos éticos - resulta na dificuldade de estabelecer uma cultura ovariana *in vitro* eficiente. O desenvolvimento desta técnica seria de extremo valor para apoiar tanto o crescimento de folículos quanto para contribuir

com o melhor conhecimento das vias regulatórias. Além da possibilidade de realização de testes com diferentes moléculas para avaliar alternativas de tratamentos. Na literatura médica, há poucos artigos originais publicados sobre esse tópico devido as barreiras à aquisição deste tecido e as lacunas no conhecimento sobre o início do crescimento folicular. Tais dificuldades contribuem para o lento ritmo de conhecimentos nesta área. Poucas instituições ao redor do mundo dedicam-se ao estudo da cultura de tecido ovariano humano, entretanto, achar caminhos para ultrapassar as barreiras aumentará o ritmo e a qualidade necessária nos estudos e conseqüente desenvolvimento de opções viáveis e seguras para preservar a fertilidade de pacientes jovens com câncer (22, 46, 7). O desenvolvimento de técnicas para cultura de tecido ovariano e conseqüente crescimento folicular *in vitro* surgiria como alternativa aos métodos de transplante homólogo de tecido ovariano, atenuando o risco de reintrodução de células malignas (46).

Outro aspecto importante a ser avaliado e que dificulta o estabelecimento de padrões comparativos é que a distribuição dos folículos no córtex ovariano humano é heterogênea, podendo apresentar variação na densidade de mais de duas ordens de magnitude em pedaços aleatórios de tecido cortical do mesmo ovário. Além da densidade ser variável na sua distribuição, o estágio dos folículos também se apresenta de modo heterogêneo entre diferentes fragmentos do córtex de um único ovário, sendo assim difícil estabelecer uma comparação entre o número de folículos em um fragmento utilizado como controle inicial com aqueles após cultura. Os folículos primordiais, embora distribuídos de maneira muito desigual no córtex ovariano, apresentam uma correlação linear entre a idade e a densidade folicular (47).

Sendo assim, devido à quantidade limitada de tecido humano disponível para uso clínico e pesquisa, bem como números reduzidos de folículos em amostras obtidas de pacientes mais velhas ou em pacientes com doença ovariana, viu-se nos ovários dos pacientes transgêneros masculinos submetidos a cirurgia de redesignação de sexo uma oportunidade de estudo deste órgão nobre em pesquisa.

## **10. CIRURGIA DE REDESIGNAÇÃO DE SEXO**

Disforia de gênero é uma condição em que o indivíduo experiencia uma discrepância entre o sexo genético/anatômico e o gênero o qual se identifica, resultando em sofrimento psicológico e o desejo de viver e ser identificado e aceito como o gênero escolhido (18, 48).

O tratamento consiste em adaptação social ao gênero identificado, como mudança de nome, vestuário, dentre outros, assim como terapia medicamentosa. No caso de adolescentes, esta terapia inicia com supressão puberal, prevenindo o desenvolvimento de características sexuais secundárias e após, a partir dos 16 anos, segue com terapia hormonal (49). Para indivíduos que desejam uma aparência mais feminina ou masculina, ainda a cirurgia de redesignação sexual é uma possibilidade a ser avaliada.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre apresenta um serviço especializado no acompanhamento destes indivíduos, de forma multidisciplinar. Em transgêneros masculinos, é possível a realização de mastectomia, histerectomia e anexectomia. Enquanto que, nos transgêneros femininos, é

possível a realização de genitoplastia de feminilização e inserção de prótese de mamas.

A cirurgia dos transgêneros masculinos possibilita que os anexos possam ser utilizados para fins de estudo, por se tratar de pacientes jovens e sem patologias ovarianas. O tecido ovariano de mulheres jovens e híginas é, por questões éticas, inacessível para uso com finalidade de pesquisa científica. Assim, se tem uma oportunidade única de estudo deste tecido, com a remoção dos ovários dos pacientes transgêneros masculinos.

Segundo publicação de Broecke *et al.* (2001), os ovários removidos de um transsexual masculino durante cirurgia de redesignação de sexo podem ser utilizados como material de estudo para cultura de tecido ovariano. O estudo avaliou o ovário de um indivíduo de 21 anos, que fez uso de androgênio por 12 meses e apresentava normal proporção de folículos primordiais (98,6%) e primário (14%). Conclui-se, então, que a terapia com testosterona leva a amenorréia reversível, com folículos ovarianos preservados, sem esgotar ou afetar o desenvolvimento dos folículos primordiais (8).

## JUSTIFICATIVA

A realização desse trabalho justifica-se em razão do exposto:

- Devido a ampla utilização de agentes quimioterápicos citotóxicos utilizados no tratamento de diversas doenças, com potencial de desenvolvimento de IOP e consequente infertilidade, técnicas de preservação ovariana devem ser estudadas e aprimoradas constantemente;

- Por questões de ética e de segurança é necessário desenvolver modelos experimentais *in vitro* de cultura ovariana para oportunizar estudos de drogas visando a proteção ovariana;

- A padronização da cultura de tecido ovariano deve estar bem estabelecida para permitir o uso de modelos experimentais;

- Diferente do cultivo celular, a cultura de tecido permite avaliar a interação entre diferentes tipos celulares, produção de hormônios, de fatores autócrinos, parácrinos e a interação com medicações.

Neste contexto, a padronização da cultura de tecido ovariano humano para posterior avaliação do efeito de medicações e de hormônios visando inclusive a maturação folicular e oocitária para preservar a síntese hormonal e a fertilidade.



## **OBJETIVOS**

### **Principal**

Descrever as características histológicas do tecido ovariano humano submetido a cultura.

### **Secundários**

- 1- Padronizar a técnica de cultura de tecido ovariano humano;
- 2- Definir o diâmetro de corte do tecido e o número de dias em cultura;
- 3- Observar se existe desenvolvimento folicular em cultura.

## **HIPÓTESE**

O tecido ovariano humano em cultura mantém suas características histológicas.

## ARTIGO

Será submetido para avaliação na revista Archives of Gynecology and Obstetrics.

### **Ovarian tissue culture - standardization and histological analysis**

Alessandra Leal Bottini<sup>1</sup>, Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis<sup>1</sup>, Edison Capp<sup>2,3</sup>, Ilma Simone Brum da Silva<sup>2</sup>, Lúcia Maria Kliemann<sup>2</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>1,2,3</sup>

1 Postgraduation Program in Health Sciences: Gynecology and Obstetrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

2 Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil.

3 Gynecology and Obstetrics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre/RS, Brasil.

Correspondence to:

Helena von Eye Corleta

Gynecology and Obstetrics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350/700 Santa Cecília, Porto Alegre, RS – Brasil

CEP 90035-903

E-mail: [hcorleta@hcpa.edu.br](mailto:hcorleta@hcpa.edu.br)

## ABSTRACT

We aim to describe the histological characteristics of human ovarian tissue subjected to *in vitro* culture from the ovaries of male transgender patients. **Methods:** *In vitro* experimental study. Samples were collected during sex reassignment surgery for male transgender patients. Ovarian cortex was cut into fragments of 2, 3 and 4 mm and placed in a 96-well plate suitable for cultivation at days zero, 2, 4, 6 and 8, when the histology was analyzed. **Results:** Stromal hyperplasia was observed in all samples. Presence of stromal hyperplasia wasn't associated with obtaining primordial or primary follicles. Peripheral hypocellularity was another recurrent finding. Primordial and primary follicles were identified with a heterogeneous pattern between fragments from the same patient and between different patients, and follicles in more advanced stages of development (secondary and antral) were not found. There was an association between the diameter of the ovarian fragments and the identification of primary follicles ( $p=0.036$ ). The number of days in culture was associated with histological signs of tissue suffering in the fragments ( $p=0.002$ ). The total number of follicles identified in the 2 mm diameter samples was significantly lower than in the 4 mm diameter samples ( $p=0.031$ ). **Conclusion:** Even after prolonged exposure to testosterone, ovaries presented primordial and primary follicles, maintaining viability over the days exposed to the culture. Follicles at more advanced stages of development were not identified.

**Keywords:** Ovary, Ovarian reserve, Fertility preservation, Tissue culture techniques, Sex reassignment surgery.

## DISCLOSURES

**Funding:** This research was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Project number 2018-0462.

**Conflict of Interest Statement:** None of the authors has any conflicts of interest related to this study, whether financial or of any other nature. None of the authors has any relevant financial or nonfinancial relationships to disclose.

**Ethics approval:** This project was evaluated and approved by the ethics research committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre under the number 2018-0462.

**Consent to participate:** An informed consent form (ICF) was applied to authorize the use of ovarian fragments in the present study. Patients were informed about the research and invited to participate by signing the ICF, knowing that they could withdraw at any time.

**Consent for publication:** All authors read and approved the final manuscript as submitted.

**Availability of data:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, HEC, upon reasonable request.

**Code availability:** Not applicable

**Authors' contributions:** Helena von Eye Corleta and Alessandra Leal Bottini conceptualized/designed the study. Alessandra Leal Bottini and Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis worked on the experiments. Lúcia Maria Kliemann, Helena von Eye Corleta and Alessandra Leal Bottini performed the analysis of the slides. Helena von Eye Corleta, Alessandra Leal Bottini, Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis, Lúcia Maria Kliemann, Edison Capp, Ilma Simone Brum da Silva carried out the initial analyses, drafted the initial manuscript, critically reviewed and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

## CONCLUSÕES

**Objetivo Principal: Descrever as características histológicas do tecido ovariano humano submetido a cultura.**

Foi possível descrever as características histológicas do tecido submetido a cultura, sendo identificados folículos primordiais e primários viáveis no decorrer dos dias de cultura.

**Objetivo Secundário 1: Padronizar a técnica de cultura de tecido ovariano humano**

A técnica utilizada foi estabelecida e descrita de forma reprodutível em futuros estudos.

**Objetivo Secundário 2: Definir o diâmetro de corte do tecido e o número de dias em cultura**

O diâmetro de 4 mm é adequado para cultura de tecido ovariano com benefício de facilidade de manuseio em relação aos diâmetros de 2 e 3 mm, sem diferença em relação ao sofrimento tecidual.

**Objetivo Secundário 3: Observar se existe desenvolvimento folicular em cultura**

Não foi possível identificar folículos em estágios mais avançados de desenvolvimento.

## PERSPECTIVAS FUTURAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste estudo traz algumas reflexões sobre as perspectivas na área de pesquisa de ovário humano. A cultura de tecido ovariano *in vitro*, além de ser uma opção mais simples que a cultura folicular, ainda apresenta o potencial de esclarecimento das complexas vias de ativação e supressão folicular. O aprofundamento de estudos nesta área se faz necessário para possibilitar maior compreensão dos eventos que culminam com o início do desenvolvimento folicular.

Neste estudo, na avaliação dos fragmentos expostos à cultura *in vitro*, notou-se a presença de um percentual alto de folículos primários quando comparados à proporção de folículos primordiais, independente do dia de exposição à cultura *in vitro*. Sendo assim, mais estudos serão importantes para confirmação e completo esclarecimento deste achado.

Finalmente, o congelamento do córtex ovariano dos pacientes transgêneros submetidos à cirurgia para redesignação sexual seria uma opção interessante, no futuro, para os estudos de preservação de fertilidade. Assim sendo, a possibilidade de obtenção de folículos viáveis, mesmo após uso de hormonioterapia, viabiliza o primeiro passo neste caminho. Para que isso ocorra, é importante oferecer ao grupo de pacientes em estudo, previamente à cirurgia, a opção de congelamento tecidual ovariano.

## REFERÊNCIAS

1. Overbeek A, Berg MH Van Den, Leeuwen FE Van, Kaspers GJL, Lambalk CB, Broeder EVD. Chemotherapy-related late adverse effects on ovarian function in female survivors of childhood and young adult cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2016;53:10–24.
2. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc B.* 1996;158(972).
3. Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy-induced damage to ovary: Mechanisms and clinical impact. *Futur Oncol.* 2016;12(19):2333–44.
4. Sonigo C, Beau I, Grynberg M, Binart N. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. *FASEB J.* 2019;33(1):1278–87.
5. Roness H, Kalich-Philosoph L, Meirow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: Possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum Reprod Update.* 2014;20(5):759–74.
6. Hussein RS, Khan Z, Zhao Y. Fertility Preservation in Women: Indications and Options for Therapy. *Mayo Clin Proc.* 2020;95(4):770–83.
7. Smitz I, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: Implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2010;16(4):395–414.



8. Van Den Broecke R, Van Der Elst J, Liu J, Hovatta O, Dhont M. The female-to-male transsexual patient: A source of human ovarian cortical tissue for experimental use. *Hum Reprod.* 2001;16(1):145–7.
9. K.L.Moore. *Anatomia orientada para a clínica.* 5°. Guanabara Koogan, editor. Rio de Janeiro; 2007.
10. McGee EA, Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000;21(2):200–14.
11. Leon Speroff. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 9°. Wolters kluwer, editor. 2020.
12. Guerreiro DD, Carvalho ADA, Lima LF, Rodrigues GQ, De Figueiredo JR, Rodrigues APR. Impact of antineoplastic agents on the ovarian follicles and importance of reproductive biotechnologies in the preservation of human fertility. *Reprod e Clim.* 2015;30(2):90–9.
13. Tanaka Y, Matsuzaki T, Tanaka N, Iwasa T, Kuwahara A, Irahara M. Activin effects on follicular growth in in vitro preantral follicle culture. *J Med Investig.* 2019;66.
14. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991;124:43–101.
15. Cortvrindt R, Smitz J. Review In vitro Follicle Growth : Achievements in Mammalian Species In vivo folliculogenesis : morphology. *J Reprod Fertil.* 2001;9:3–9.
16. Atrabi MJ, Akbarinejad V, Khanbabaee R, Dalman A, Amorim CA, Najjar-Asl M, et al. Formation and activation induction of primordial follicles using

- granulosa and cumulus cells conditioned media. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):10148–56.
17. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. In: Piprek RP, editor. *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development.* 2016. p. 309–36.
  18. Halász B, Kiss J, Molnár J. Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: Morphological aspects. *J Steroid Biochem.* 1989;33(4 PART 2):663–8.
  19. Baracat EC. *Manual de Ginecologia Endócrina. Vol. II, Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO).* 2015. 603–622 p.
  20. Hall JE. *Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle. Eighth Edi. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition. Elsevier Inc.; 2019. 149–166 p.*
  21. Zhou L, Xie Y, Li S, Liang Y, Qiu Q, Lin H, et al. Rapamycin Prevents cyclophosphamide- induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K / Akt / mTOR Signaling Pathway in vivo. 2017;1–11.
  22. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: Advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril.* 2013;99(6):1523–33.
  23. Chahvar ST, Al-Shawaf T, Tranquilli AL. Pharmacologic Ovarian Preservation in Young Women Undergoing Chemotherapy. *Curr Med Chem.* 2013;21(2):223–9.

24. John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. Foxo3 is a PI3K-Dependent Molecular Switch Controlling the Initiation of Oocyte Growth. *Dev Biol.* 2008;321(1):1–7.
25. Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(22):10280–4.
26. Adhikari D, Liu K, Activation T. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. 2009;30:438–64.
27. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015;36(1):1–24.
28. Hayes E, Kushnir V, Biswas A, Prizant H, Sen A, Endocrinology C. Intracellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;433:56–65.
29. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(2):129–40.
30. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B a S, Jong FHDE, Uilenbroek J a NTHJ, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999;140(12):5789–96.
31. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod.* 2006;21(9):2223–7.
32. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do

- chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update*. 2012;18(5):525–35.
33. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer : golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(11):638–47.
  34. Park M, Davidson R, Fox K. Preservation of Fertility and the Impact of Subsequent Pregnancy in Patients With Premenopausal Breast Cancer. 2006;664–71.
  35. Hao X, Anastácio A, Liu K, Rodriguez-Wallberg KA. Ovarian follicle depletion induced by chemotherapy and the investigational stages of potential fertility-protective treatments-A review. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
  36. Barton SE, Najita JS, Ginsburg ES, Leisenring WM, Stovall M, Weathers RE, et al. Infertility, infertility treatment, and achievement of pregnancy in female survivors of childhood cancer: A report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol*. 2013;14(9):873–81.
  37. Gerber B, Ortmann O. Prevention of Early Menopause Study (POEMS): is it possible to preserve ovarian function by gonadotropin releasing hormone analogs (GnRHa)? *Arch Gynecol Obstet*. 2014;290(6):1051–3.
  38. Lambertini M, Ceppi M, Poggio F, Peccatori FA, Azim HA, Ugolini D, et al. Ovarian suppression using luteinizing hormonereleasing hormone agonists during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility of breast cancer patients: A meta-analysis of randomized studies. *Ann Oncol*. 2015;26(12):2408–19.
  39. Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, Kentos A, Dupuis J, Zachee P, et al.

- No evidence for the benefit of gonadotropin-releasing hormone agonist in preserving ovarian function and fertility in lymphoma survivors treated with chemotherapy: Final long-term report of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(22):2568–74.
40. Eppig JJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod.* 1996;54(1):197–207.
  41. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence<sup>1</sup>. *Biol Reprod.* 2003;68(5):1682–6.
  42. Wandji SA, Sřseř V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum Reprod.* 1997;12(9):1993–2001.
  43. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod.* 2008;23(5):1151–8.
  44. Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: New biological insights. *Hum Reprod Update.* 2013;19(1):67–83.
  45. Guzman L, Ortega-Hrepich C, Albuz FK, Verheyen G, Devroey P, Smitz J, et al. Developmental capacity of in vitro-matured human oocytes retrieved from polycystic ovary syndrome ovaries containing no follicles larger than 6 mm. *Fertil Steril.* 2012;98(2):503–7.
  46. Del-Pozo-L3rida S, Salvador C, Mart3nez-Soler F, Tortosa A, Perucho M,

- Giménez-Bonafé P. Preservation of fertility in patients with cancer (Review). *Oncol Rep.* 2019;41(5):2607–14.
47. Schmidt KLT, Byskov AG, Andersen AN, Müller J, Andersen CY. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod.* 2003;18(6):1158–64.
  48. Schmidt L, Levine R. Psychological Outcomes and Reproductive Issues Among Gender Dysphoric Individuals. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2015;44:773–85.
  49. WPATH. WPATH Standards of Care. *Int J Transgenderism.* 2012;13(4):4.
  50. Pache TD, Chadha S, Gooren LJG, Hop WCJ, Jaarsma KW, Dommerholt HBR, et al. Ovarian morphology in long-term androgen-treated female to male transsexuals. A human model for the study of polycystic ovarian syndrome? *Histopathology.* 1991;19(5):445–52.
  51. Futterweit W, Deligdisch L. Histopathological effects of exogenously administered testosterone in 19 female to male transsexuals. *Obstet Gynecol Surv.* 1986;41(9):585–8.