



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS**

**LÍGIA HELENA FERREIRA MELO E SILVA**

**TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO E RESTAURAÇÃO  
DO METABOLISMO ÓSSEO EM RATAS CASTRADAS**

**FORTALEZA**  
**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S581c Silva, Lígia Helena Ferreira Melo.

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO E OS EFEITOS SOBRE O  
METABOLISMO ÓSSEO:

UM NOVO PARADIGMA / Lígia Helena Ferreira Melo Silva. – 2017.

86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de  
Medicina, Programa de Pós- Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

1. Criopreservação ovariana. 2. Câncer. 3. Osso. 4. Infertilidade. I. Título.

CDD 617

---

LÍGIA HELENA FERREIRA MELO E SILVA

TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO E RESTAURAÇÃO  
DO METABOLISMO ÓSSEO EM **RATAS CASTRADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo de Proteção nas Lesões de Isquemia e Repercussão dos Transplantes de Órgãos e Tecidos.

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

FORTALEZA

2017

LÍGIA HELENA FERREIRA MELO E SILVA

TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO E RESTAURAÇÃO  
DO METABOLISMO ÓSSEO EM **RATAS CASTRADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo de Proteção nas Lesões de Isquemia e Repercussão dos Transplantes de Órgãos e Tecidos.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Franciele Osmarini Lunardi

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. José Ananias Vasconcelos Neto

Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC)

---

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Jesus Cristo.

Ao meu esposo e companheiro incansável  
João Marcos de Meneses e Silva e às minhas  
amadas filhas e presentes de Deus Sara e  
Sofia.

Aos meus pais, Carlos Roberto e Maria de  
Lourdes.

Ao meu irmão e exemplo Fernando.

A minha avó e saudosa melhor amiga  
Oscarina.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Lusmar Rodrigues, coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará pelas lições constantes de esforço e disciplina.

Ao Prof. Dr. José Alberto Dias Leite, orientador do projeto pela paciência, orientação e conselhos sábios.

Ao Prof. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro, mais do que um professor, um amigo, um tutor atento e presente.

Ao meu esposo João Marcos de Meneses e Silva pela ajuda incansável, pelo apoio sempre presente, pelo passo certo e confiante rumo ao caminho confiado pelo Nosso Senhor, pelas asas que me permitem voar altos sonhos e pelo brilhantismo nas explicações e nas orientações em cada detalhe do nosso caminhar. Essa é mais uma vitória sua.

Aos meus pais Carlos Roberto e Maria de Lourdes, ao meu irmão Fernando de Assis e à minha avó Ocarina (*in memoriam*) pelos exemplos palpáveis de que o esforço sempre vale a pena e a certeza de que o amor de vocês me move diariamente ao meu melhor.

Às minhas filhas Sara e Sofia pelo apoio contínuo e pelo entendimento nas minhas intermináveis horas de ausência. Isso tudo também é por vocês.

À minha nova família Sr. Batista, D. Rosa, Daniel, Fernanda, Lucas e Priscila e Carol pelas orações, pelos abraços acalentadores e pelo incentivo sempre encorajador.

Aos meus sobrinhos Lara e Samuel pelas novas alegrias que enchem meu coração de esperança e ânimo.

Aos amigos sempre presentes em todos os momentos Pr. Hilquíias, Danielly, Marlos, Gracy, Naélío, Tatiana, Alexandre e Tânia. Vocês são um presente de Deus, uma resposta de oração, são abraços acalentadores, sorrisos salvadores que refletem a essência do Pai na minha vida e somente Ele para recompensar tamanho amor.

Aos meus padrinhos Tio Enéas e Tia Teresa por acreditarem sempre em mim, desde a época da faculdade, quando não mediram esforços no apoio constante e imensurável. A caminhada foi longa e conseguimos mais um degrau nessa nossa escalada.

Ao colega patologista Carlos Gustavo Hirth sem o qual esse estudo não teria sido possível.

Aos colegas e amigos Paulo Goberlânio Barros da Silva, Franciele Osmarini Lunardi, Igor Freitas de Lucena, Glauco Jorge da Costa Gomes, Mahmoud Salama pela coragem do ingresso na empreitada de cirurgias, análises de dados, orientações sobre literaturas e apoio durante toda a realização de nosso trabalho.

À Luciene e Magda do Setor de Pós-Graduação pelas orientações, pela paciência e pelas palavras de incentivo. Vocês me ajudaram a não desistir.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.



## RESUMO

Apesar do uso de criopreservação de tecido ovariano para restaurar a fertilidade, não há estudos publicados abordando os efeitos desta técnica no metabolismo ósseo. Este estudo tem como objetivos avaliar os resultados da pega do enxerto de tecido ovariano após vitrificação e reimplante no omento de ratas, comparar os níveis de estradiol nessas ratas em diferentes etapas de acordo com a presença ou não de tecido ovariano e avaliar os efeitos sobre o metabolismo ósseo de tal reimplante. O presente estudo foi realizado em 27 ratas com idade entre 11 e 12 semanas e pesando 200-300g, período no qual há estabelecimento de maturidade hormonal. Todos os animais foram submetidos à ooforectomia bilateral e os ovários foram vitrificados. O autotransplante ocorreu em dois períodos distintos de acordo com cada grupo: após 1 semana (grupo A, n = 8) ou após 1 mês (grupo B, n = 19) contados a partir da primeira intervenção (antes da ooforectomia).

Foram realizados ensaios de estradiol no soro e análise histológica do tecido ovariano e da tibia: antes da ooforectomia (basal), no final do período de castração cirúrgica (após ooforectomia) e um mês após o transplante (reimplante).

Nos dois grupos houve piora dos parâmetros ósseos após a castração e melhoria dos mesmos após o reimplante ovariano, a saber: as espessuras corticais médias da tibia foram  $0,463 \pm 0,14\text{mm}$  (média  $\pm$  DP) na linha de base,  $0,360 \pm 0,14\text{mm}$  após ooforectomia e  $0,445 \pm 0,17\text{mm}$  em 1 mês após o reimplante ( $p < 0,005$ ). Além disso, as espessuras médias trabecular foram  $0,050 \pm 0,08\text{mm}$  (média  $\pm$  DP) na linha de base,  $0,022 \pm 0,08\text{mm}$  após ooforectomia e  $0,049 \pm 0,032\text{mm}$  em 1 mês após o reimplante ( $p < 0,005$ ).

Quanto à mensuração de estradiol sérico, nos dois grupos houve queda após a castração e aumento após o reimplante. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre a variação dos níveis de estradiol nos dois grupos de estudo ( $p=0.819$ ). Nos animais com castração cirúrgica precoce apesar da variação dos níveis basais ( $25.6 \pm 0.8\text{ng/dl}$ ) para o status castrado ( $19.0 \pm 1.1\text{ng/dl}$ ) e pós-reimplante de um mês ( $25.6 \pm 3.9\text{ng/dl}$ ) não houve diferença significativa entre os três momentos de análise de estradiol ( $p=0.140$ ). Porém, o grupo com castração cirúrgica tardia apresentou uma redução significativa dos níveis de estradiol do pré-operatório ( $28.0 \pm 1.1\text{ng/dl}$ ) para o status castrado ( $19.7 \pm 1.6\text{ng/dl}$ ) e recuperação dos níveis normais um mês após o reimplante ( $25.8 \pm 0.5\text{ng/dl}$ ) ( $p=0.001$ ).

Houve sucesso de pega de enxerto, ou seja, observou-se presença de folículos atresicos, folículos primordiais e de corpo lúteo em cerca de 81,5 % dos animais (grupo A: n = 7/8, 87%, grupo B: n = 15/19, 78,9%,  $p = 0,080$ ) demonstrando que o

local de reimplante é cirurgicamente adequado. Valores semelhantes são observados em outros trabalhos experimentais de referência.

De acordo com estes resultados, o transplante de tecido ovariano criopreservado não só restaurou a função hormonal ovariana, mas restabeleceu os parâmetros iniciais do osso. Estes resultados podem sugerir que reimplantação ovariana em outros mamíferos, como em mulheres, tenha efeitos benéficos no metabolismo ósseo.

Palavras-chave: Tecido ovariano. Autotransplante. Menopausa. Metabolismo ósseo.

## ABSTRACT

Despite the use of cryopreservation of ovarian tissue to restore fertility, there are no published studies addressing the effects of this technique on bone metabolism. This study aims to evaluate the ovarian results of the ovarian tissue graft heel after vitrification and reimplanted in the omentum of rats, to compare estradiol levels in these rats at different stages according to the presence or absence of this tissue and to evaluate the effects on the bone metabolism of such reimplantation the present study was performed in 27 rats aged 11 to 12 weeks and weighing 200-300g, a period in which there is establishment of hormonal maturity. All animals underwent bilateral oophorectomy to induce hypoestrogenism and the ovaries were vitrified. Autotransplantation occurred in two different periods according to each group: after 1 week (group A, n = 8) or after 1 month (group B, n = 19) counted from the first intervention (before oophorectomy).

Serum estradiol assays and histological analysis of ovarian tissue and tibia were performed: before oophorectomy (basal), at the end of the surgical castration period (after oophorectomy) and one month after transplantation (replantation).

In groups A and B, the mean cortical thickness of the tibia was  $0.463 \pm 0.14$  mm (mean  $\pm$  SD) at the baseline,  $0.360 \pm 0.14$  mm after oophorectomy and  $0.445 \pm 0.17$  mm at 1 month post reimplantation ( $p < 0.005$ ). In addition, mean trabecular thickness was  $0.050 \pm 0.08$  mm (mean  $\pm$  SD) at baseline,  $0.022 \pm 0.08$  mm after oophorectomy and  $0.049 \pm 0.032$  mm at 1 month after replantation ( $p < 0.005$ ).

Regarding estradiol levels, it was observed that estradiol levels were significantly lower after castration (group A:  $8.10 \pm 0.4$  ng / dL, group B:  $11.80 \pm 1.2$  ng / dL). baseline (group A:  $23.43 \pm 2.44$  ng / dL, group B:  $25.90 \pm 8.10$  ng / dL), and returned to normal levels after replantation in both groups (between 20 and (Group A:  $20.47 \pm 1.45$  ng / dL, group B:  $20.97 \pm 1.41$  ng / dL,  $p = 0.013$ ). There was a difference between estradiol between groups A and B, this recovery being greater in group A (not statistically significant).

The presence of atretic follicles, primordial follicles and corpus luteum follicles was observed in approximately 81.5% of the animals (group a: n = 7/8, 87%, group b: n = 15/19, 78.9%,  $p = 0.080$ ) showing that the reimplantation site is valid.

According to these results, cryopreserved ovarian tissue transplantation not only restored ovarian hormonal function, but reestablished the initial bone parameters.

These results may suggest that ovarian reimplantation in women has beneficial effects on bone metabolism.

Key words: Ovarian tissue. Autotransplant. Menopause. Bone metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático da anatomia do útero e ovários da rata ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	20
Figura 2 – Fluxograma com divisão dos animais em grupos por intervalo após a castração.....	26
Figura 3 – Tecido ovariano de ratas após excisão cirúrgica e pré-congelação .....	28
Figura 4: Passos cirúrgicos para procedimentos da biópsia óssea tibial :(A) tricotomia em porção anterior de coxa esquerda; (B) medição do local para o defeito ósseo com uma pinça;; (C) perfuração com broca de 2 mm de diâmetro (D) defeito ósseo após a perfuração. ....	30
Figura 5 – Amostra de tecido ósseo da tíbia proximal biopsiado com uso de fresa trefina. ....	31
Figura 6 – Cavidade abdominal de uma rata após laparotomia evidenciando-se (seta) o reimplante de tecido ovariano no omento maior.....	33
Figura 7: Avaliação dos níveis de estradiol nos animais com castração cirúrgica nos três tempos. * $p < 0,05$ versus baseline e um mês pós-cirúrgico do mesmo grupo (ANOVA/Bonferroni) .....	37
Figura 8 – Folículos primordiais e corpo lúteo de ovários de ratas após o reimplante .....	38
Figura 9 – Folículos atrésicos de ratas após o reimplante. ....	39
Figura 10 – Histologia óssea cortical do Grupo A.....	42
Figura 11 – Histologia óssea cortical do Grupo B.....	42
Figura 12 – Histologia óssea trabecular do Grupo A. ....	43
Figura 13 – Histologia óssea trabecular do Grupo B.....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Espessura cortical da tíbia (mm).....	40
Coluna azul (níveis basais): foram coletadas biópsia da tíbia e estradiol sérico; Coluna verde: primeiro período após ooforectomia (uma semana para o Grupo A e um mês para o Grupo B); Coluna laranja: período após autotransplante (30 dias para ambos grupos). ( $P < 0,005$ ).....	40
Gráfico 2 – Espessura trabecular da tíbia (mm).....	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Morbidade relacionada ao hipoestrogenismo – Perda de Fertilidade ...</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Técnicas para preservação de fertilidade .....</i></b>	<b>14</b>
1.1.2.1	Criopreservação de embriões e oócitos .....	14
1.1.2.2	Supressão ovariana.....	15
1.1.2.3	Criopreservação de Tecido Ovariano .....	15
<b>1.2</b>	<b>Morbidade relacionada ao hipoestrogenismo - A Osteoporose .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>O rato como modelo experimental.....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Desenho Experimental .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>Coleta de tecido ovariano e de tecido ósseo .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Vitrificação de tecido ovariano.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Aquecimento de tecido ovariano .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Autotransplante de tecido ovariano.....</b>	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>Parâmetros antes e depois do autotransplante de ovário .....</b>	<b>34</b>
<b>4.7.1</b>	<b><i>Análise Hormonal .....</i></b>	<b>34</b>
4.7.1.1	Determinação do Estradiol .....	34
<b>4.7.2</b>	<b><i>Análise histológica.....</i></b>	<b>34</b>
4.7.2.1	Tíbias.....	34
4.7.2.2	Ovários .....	35
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Nível de estradiol plasmático .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Enxerto ovariano .....</b>	<b>38</b>
<b>5.3</b>	<b>Parâmetros ósseos.....</b>	<b>39</b>

6	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA ..</b>	<b>59</b>
	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ .....</b>	<b>59</b>
	<b>59</b>	
	<b>ANEXO B- INJEÇÃO INTRAPERITONEAL EM RATA .....</b>	<b>60</b>
	<b>ARTIGO .....</b>	<b>63</b>
	<b>Artigo submetido para a revista do colégio brasileiro de cirurgiões. ....</b>	<b>63</b>
	<b>7.1.1 Número do manuscrito 1577.....</b>	<b>63</b>
	<b>7.1.2 ARTIGO ORIGINAL .....</b>	<b>63</b>
	<b>7.2 TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO E</b>	
	<b>RESTAURAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO EM RATAS CASTRADAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>7.2.1.1 CRIOPRESERVED OVARIAN TISSUE TRANSPLANTATION AND</b>	
	<b>RESTORATION OF BONE METABOLISM IN CASTRATED RATS .....</b>	<b>63</b>
	<b>Conteúdo .....</b>	<b>65</b>
	<b>Imagens 78</b>	
	<b>7.2.1.2 Histologia óssea cortical (H &amp; E 100x)- Grupo A .....</b>	<b>79</b>
	<b>7.2.1.3 Histologia óssea cortical (H &amp; E 100x)- Grupo B .....</b>	<b>79</b>
	<b>7.2.1.4 Histologia óssea trabecular (H &amp; E 100x)-Grupo A.....</b>	<b>80</b>
	<b>7.2.1.5 Histologia óssea trabecular (H &amp; E 100x)-Grupo B .....</b>	<b>80</b>
	<b>7.2.1.6 Espessura cortical da tíbia (mm) (p&lt;0,005).....</b>	<b>81</b>
	<b>7.2.1.7 Espessura trabecular da tíbia (mm)(p&lt;0,005) .....</b>	<b>82</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida ao nascer, no Brasil, vem aumentando progressivamente neste século devido à redução das taxas de natalidade e das de mortalidade em idades prematuras. No início do século XX, o brasileiro tinha uma expectativa de vida de menos de 35 anos e, ao final e, em 2000, era de 68 anos, tornando assim, a população mais velha, do ponto de vista demográfico (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017a).

Com o envelhecimento, a população da chamada terceira idade (65 e mais anos) praticamente duplicou sua proporção enquanto que a participação dos menores de 15 anos caiu entre 1960 e 2000, segundo os dados do INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) explicitados na tabela 1. Nesse intervalo de tempo, progressivamente observou-se um maior número de pessoas que passaram a apresentar maior risco de desenvolver câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2017a).

Tabela 1 – Composição etária relativa (%) nos censos demográficos brasileiros de 1960 a 2000.

Faixa etária	Ano / População %					
	1960	1970	1980	1990	1996	2000
0-14	42,60	42,01	38,20	34,72	31,54	29,60
15-64	54,50	54,65	57,68	60,45	62,85	64,55
65 e mais	2,90	3,34	4,01	4,83	5,35	5,85

Fonte: IBGE *apud* INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (2017a)

Relacionado ao envelhecimento da população, ao diagnóstico tardio e ao não acesso em tempo hábil ao tratamento adequado, tem-se que, anualmente, quase nove milhões de pessoas morrem devido ao câncer, vivendo a maioria em países de baixa e média renda (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2017). O câncer também é responsável atualmente por uma em cada seis mortes no mundo, mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos e esse número deverá alcançar para mais de 21 milhões de pessoas em 2030. (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2017).

Em se tratando de diagnóstico precoce, sabe-se que no Reino Unido da Grã-Bretanha e na Irlanda do Norte houve redução de mais de 50% da mortalidade por câncer de mama em mulheres menores de 65 anos devido à melhoria no diagnóstico e na provisão de tratamentos eficazes (STOCKTON *et al.*, 1997, (SHULMAN *et al.*, 2010)

Com o advento de novas terapias contra as neoplasias, a expectativa de vida de muitas pacientes jovens foi aumentada. (ANDERSON *et al.*, 2006; BLUMENFELD; HAIM, 1997; CARTER *et al.*, 2005; GREENBERG; URBACH, 2006; HEATH; STERN, 2006; MALTARIS *et al.*, 2007). O risco relativo para morte por câncer pediátrico nos Estados Unidos chega a 1,10, para a incidência de câncer chega a 1,13 e a mortalidade geral em crianças alcança risco relativo de 1,21, todos com intervalo de confiança não contendo a unidade (BALSARA *et al.*, 2013).

Devido a elevada taxa de sobrevivência, maior atenção tem sido dada à qualidade de vida desses pacientes. Nesse cuidado as diretrizes do ano de 2017 da OMS incluem: a diminuição das comorbidades associadas ao câncer e ao seu tratamento, como a infertilidade e a menopausa precoce em mulheres, além dos efeitos paraneoplásicos comuns tanto em homens como em mulheres. (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2017).

Em geral, após cinco anos do diagnóstico, essa taxa excede 70% em relação a crianças e adolescentes (DECHERNEY *et al.*, 2005), aproxima-se de 86% naqueles tratados para leucemia linfoblástica aguda e ultrapassa 97% no grupo tratado por linfoma de Hodgkin (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017b).

Quando se fala em opções terapêuticas para o câncer tem-se a quimio e a radioterapia. A quimioterapia tem como alvo as células cancerígenas com múltiplos mecanismos de ação, porém o principal foco é atingir as células de rápido metabolismo. No entanto, os efeitos colaterais associados às células saudáveis também de alto metabolismo são inevitáveis sendo as mais suscetíveis: as células da medula óssea, os folículos pilosos, as células do trato digestivo e as do sistema reprodutor. Algumas drogas também podem ser cardíacas e nefrotóxicas, ou ainda, causar lesões em bexiga, pulmão e sistema nervoso.

O envelhecimento do ovário e os tratamentos citotóxicos são as causas mais comuns de perda de fertilidade nas mulheres. De acordo com relatos recentes, 700.000 mulheres nos Estados Unidos e 300.000 mulheres no Brasil são

diagnosticadas com câncer todos os anos. Aproximadamente 8% dessas mulheres têm menos de 40 anos, ou seja, quase 10% do total das mulheres com câncer. (SALAMA *et al.*, 2012).

O grau do dano no ovário será dependente do tipo de agente quimioterápico utilizado, da dose administrada e da idade da paciente, que está diretamente relacionada à sua reserva ovariana. (ABUSIEF *et al.*, 2012). A redução da reserva ovariana ocorre devido a apoptose dos folículos em crescimentos e a ativação dos folículos quiescentes, que ao se ativarem entram também em apoptose, esgotando a reserva ovariana de forma precoce (ABUSIEF *et al.*, 2012; DONNEZ; DOLMANS, 2014).

Tem-se também que os danos nos vasos sanguíneos e a fibrose do estroma ovariano causados pela quimioterapia e/ou radioterapia prejudicam a funcionalidade dos folículos remanescentes.

Esse dano pode ser mensurado indiretamente através da dosagem dos níveis de estradiol, de inibina b, de hormônio folículo estimulante e de hormônio anti-mülleriano (AMH), sendo o último o mais preciso, uma vez que seus valores são diretamente proporcionais à contagem folicular (ANDERSON; CAMERON, 2011).

A manifestação clínica da perda folicular é bastante variável, e vai desde a amenorreia a sintomas climatéricos precoces e conseqüentemente a vários graus de infertilidade. Vale salientar que pacientes que ainda mantêm sua reserva ovariana mesmo após o tratamento contra o câncer, possivelmente experimentam uma diminuição da função ovariana e do tempo de duração de sua fertilidade (mais 4 a 5 anos) (DONNEZ, 2013), podendo comprometer ainda a qualidade dos oócitos (TURAN; OKTAY, 2014).

Apesar de algumas pacientes passarem pelo tratamento sem nenhum efeito aparente, diversos são os efeitos relatados após os tratamentos contra o câncer, dentre eles a falha ovariana secundária.

Considerando-se a qualidade de vida física, psicológica, social e espiritual desses sobreviventes, sabe-se que uma qualidade de vida satisfatória deve incluir a capacidade de constituir e criar uma família (KIM; BATTAGLIA; SOULES, 2001; MALTARIS *et al.*, 2006; MAUNSELL *et al.*, 2006; PENTHEROUDAKIS; PAVLIDIS, 2007; SPEECHLEY *et al.*, 2006).

Nos países desenvolvidos, uma parcela de 30 a 50% das pacientes jovens acometidas pelo câncer, não recebem orientação adequada para a sua preservação

da fertilidade antes de iniciar o tratamento contra o câncer ((SALAMA et al., 2012). Essa falta de informação se dá por diversas razões, dentre elas, ao forte caráter emocional relacionado à própria doença neoplásica e a seus estigmas de mortalidade e gravidade psicossocial. Assim, muitos profissionais da saúde focam no tratamento antineoplásico e evitam outras associações de perda, como o possível comprometimento de fertilidade((ANDERSON; WALLACE; BAIRD, 2008; CORNEY; SWINGLEHURST, 2014)). Dessa forma, essa situação acaba sendo discutida em momentos posteriores, quando as chances de preservação de fertilidade já se encontram diminuídas (ANDERSON; WALLACE; BAIRD, 2008; CORNEY; SWINGLEHURST, 2014).

Muitas estratégias foram desenvolvidas para prevenir a perda de fertilidade em mulheres jovens e meninas submetidas a tratamentos anticancerígenos gonadotóxicos, uma vez que as taxas de sobrevivência para a maioria dos cânceres está por volta 80% (ROMAO; LORENZO, 2017). Várias opções estão disponíveis, incluindo a criopreservação de embriões, oócitos (KOCH; LEDGER, 2013; LOREN *et al.*, 2013) e tecido ovariano, respectivamente e autotransplante (BORTOLETTO *et al.*, 2017).

## **1.1 Morbidade relacionada ao hipoenstrogenismo – Perda de Fertilidade**

### ***1.1.2 Técnicas para preservação de fertilidade***

#### *1.1.2.1 Criopreservação de embriões e oócitos*

A criopreservação de embriões é a técnica que apresenta maiores chances de gestação. E até 2013 era a única técnica considerada estabelecida (padrão) para a preservação da fertilidade feminina. Considerando-se apenas a questão da qualidade reprodutiva, a medida do possível deve ser a técnica mais indicada.

A criopreservação de oócitos não é considerada mais experimental desde 2013, quando a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e a Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) aprovaram este procedimento. Mais de 1.000

nascimentos têm sido relatados em todo o mundo a partir de oócitos criopreservados (LOREN *et al.*, 2013; NOYES; PORCU; BORIN, 2009).

A taxa de gestação e nascimentos após a vitrificação de oócitos é de aproximadamente 5,7% e recomenda-se pelo menos 20 oócitos puncionados para se obter sucesso com essa técnica. Porém, o número de oócitos recuperado de pacientes saudáveis, muitas vezes é inferior a essa quantidade, e no caso de pacientes que sofrem de câncer, essa recuperação oocitária pode ser ainda menor (DONNEZ; DOLMANS, 2015).

#### 1.1.2.2 Supressão ovariana

De uma forma geral, literatura tem demonstrado que pacientes pré-púberes são mais resistentes à perda folicular durante a quimioterapia, reforçando que os quimioterápicos atuam principalmente em células germinativas em crescimento, presentes em maior quantidade em mulheres em idade reprodutiva (KAWAMURA *et al.*, 2015). Assim a manutenção folicular em estado de repouso, estágio primordial dos folículos, com o uso de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) promove a proteção ovariana diminuindo a sensibilidade ao tratamento gonadotóxico e mesmo por inibir a irrigação sanguínea ovariana para esses folículos (KAWAMURA *et al.*, 2015).

Pela estimulação ovariana inicial, os agonistas da GnRH devem ser iniciados pelo menos uma semana antes do início da quimioterapia, e o seu efeito deverá durar até pelo menos 1 a 2 semanas após o final do tratamento. Porém, como efeitos secundários as pacientes podem experimentar sintomas de menopausa, embora esses efeitos sejam transitórios (DEL MASTRO *et al.*, 2014).

Em estudos recentes observou-se que a Goserelina exibiu efeito protetor ao ovário, reduzindo significativamente o risco de menopausa precoce e aumentando as taxas de gestação (MOORE *et al.*, 2015; URRUTICOECHEA *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.3 Criopreservação de Tecido Ovariano

De acordo com publicações mais recentes, a criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano podem ser usados para restaurar a fertilidade em

pacientes com câncer, submetidas aos tratamentos anti-neoplásicos convencionais .(DONNEZ; DOLMANS, 2015; KAWAMURA *et al.*, 2015).

Embora ainda experimental na maioria dos países do mundo, a criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano resultaram em mais de 86 bebês saudáveis em todo o mundo (JENSEN *et al.*, 2017). com uma taxa de natalidade viva de aproximadamente 25% por transplante (SALAMA *et al.*, 2012). Em Israel foi aprovada como terapêutica em 2016, e outros países caminham na mesma direção.

## 1.2 Morbidade relacionada ao hipoestrogenismo - A Osteoporose

Dentre os sintomas não ginecológicos mais importantes decorrentes do hipoestrogenismo destaca-se a osteoporose, que cursa com expressivos gastos públicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a osteoporose está presente quando a densidade mineral óssea está inferior a 2,5 desvios padrão da média do adulto ( -2,5 T score). Nos casos em que há fraturas ou o desvio é superior a 2,5 SD, a condição é chamada de osteoporose “severa” (WHO STUDY GROUP, 1994.)

A osteoporose, caracterizada por diminuição significativa da densidade mineral óssea e por considerável aumento do risco de fraturas, é uma das doenças mais comuns e incapacitantes associadas com o envelhecimento em mulheres (RAY *et al.*, 1997).

A perda do equilíbrio cooperativo entre osteoblastos e osteoclastos, com maior ação osteoclástica devido ao hipoestrogenismo, causa vários distúrbios ósseos, alguns dos quais devido ao recrutamento anormal de osteoclastos. Os osteoclastos são células primárias responsáveis pela reabsorção óssea, essas células são de origem de células-tronco hematopoiéticas (MASUHARA *et al.*, 2016, (PRIOR *et al.*, 2017, (RIGGS *et al.*, 1969 )). A perda óssea relacionada à idade pode afetar também os homens, principalmente a partir de seus 70 anos (HSU *et al.*, 2014). Embora os fatores de risco para osteoporose apresentem diferenças em relação ao sexo e à idade, as fraturas decorrentes da osteoporose resultam em substanciais morbidades e mortalidades em homens e mulheres (HALLING *et al.*, 2005). Aproximadamente

34% das mulheres, a maioria na pós-menopausa, e 17% dos homens são afetados por essa doença no mundo (JOHNELL AND KANIS, 2006).

Quando associada ao processo normal de envelhecimento é classificada como primária. Porém, quando associada a outras patologias, os pesquisadores chamam-na de osteoporose secundária (HSU *et al.*, 2014). A secundária é cada vez mais diagnosticada em pacientes jovens com câncer, doença celíaca, artrite reumatoide e doença inflamatória do intestino, bem como naqueles que fazem uso de medicamentos para úlceras e doença do refluxo gastroesofágico e alguns antidepressivos. Estão em risco de osteoporose secundária, ainda, os pacientes pós-cirurgia bariátrica bem como aqueles que recebem tratamentos hormonais para evitar a recidiva de câncer de mama ou de próstata (HSU *et al.*, 2014)

Como a osteoporose não se apresenta com sintomas evidentes, não é incomum que ela seja diagnosticada até que o paciente sofra uma fratura. As fraturas em adultos acima de 50 anos podem ser o primeiro sinal de fraqueza óssea devido a osteoporose. Na Europa ocorrem, anualmente, 3,5 milhões de novas fraturas sendo as mais comuns: na coluna (620 mil), quadril (610 mil) e antebraço (560 mil) (HERNLUND *et al.*, 2013). A carga econômica dessas injúrias chega a 37 bilhões de dólares/ano. As fraturas recorrentes, os cuidados de longo prazo com fraturas e uso de medicamentos para prevenção representam respectivamente 66, 29, e 5% desse custo. Esses custos deverão aumentar em 25% em 2025 (HERNLUND *et al.*, 2013).

Já na América do Norte, de acordo com a *National Osteoporosis Foundation*, nove milhões de adultos nos Estados Unidos da América (EUA) têm osteoporose e um adicional de 43 milhões têm baixa densidade mineral óssea, ou osteopenia, o que aumenta o risco de osteoporose e fraturas (HSU *et al.*, 2014). A mesma fundação estima que até 2030, o número de adultos acima de 50 anos com osteoporose e baixa massa óssea vai crescer mais de 30%, podendo chegar ao número de 68 milhões (HSU *et al.*, 2014).

Em 2013, um estudo realizado por pesquisadores da *Loyola University Medical Center*, em Maywood, Illinois, descobriu que causas secundárias de perda óssea estão relatadas em até 60% dos homens, mais de 50% das mulheres na pré-menopausa e cerca de 30% das mulheres na pós-menopausa que são diagnosticados com osteoporose (HSU *et al.*, 2014).

No mundo, fraturas anteriores e reincidentes também representam 1,180,000 anos de qualidade de vida perdidos por todos os pacientes acometidos por osteoporose durante o ano de 2010. (HERNLUND *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, a osteoporose causa cerca de 2 milhões de fraturas por ano, incluindo 547 mil fraturas vertebrais, 300 mil fraturas de quadril e 135 mil fraturas pélvicas (JEE; YAO, 2001; KALU, 1991).

Sabemos que o eixo reprodutivo da mulher é o único que alcança a senescência enquanto outros órgãos do corpo geralmente continuam em pleno funcionamento por mais alguns anos. Esse processo de depleção dos óvulos, que se inicia antes do nascimento e termina no climatério, não pode ser predito precisamente pela idade cronológica, já que sua idade de ocorrência é variável entre as mulheres, embora geralmente ocorra entre os 45 e 55 anos de idade (BUTLER; SANTORO, 2011), sendo assim, a maioria das mulheres, irá permanecer cerca de 30 anos em estado de pós-menopausa, sob os efeitos decorrentes do hipoestrogenismo (MESSIER *et al.*, 2011).

Nesse estágio reprodutivo final, os ciclos menstruais podem ficar mais curtos, devido ao aumento e da variabilidade dos níveis de FSH (hormônio folículo estimulante) (HARLOW *et al.*, 2012). Os períodos de elevação do FSH permitem que os valores de estrógeno se mantenham relativamente estáveis, porém estes começam a reduzir até atingirem valores mínimos na pós-menopausa (HARLOW *et al.*, 2012). Cerca de dois anos antes do período menstrual cessar, os níveis de estrógeno começam a declinar, decrescendo mais rapidamente por volta deste período e atinge um platô dois anos mais tarde, juntamente com a estabilização dos valores de FSH (BURGER *et al.*, 2008).

As alterações hormonais que ocorrem nessa fase levam a um conjunto de sinais e sintomas que prejudicam o bem-estar da mulher e é por muitos, conhecida como síndrome do climatério, moléstia menopausal ou síndrome menopausal (DE LORENZI; BARACAT, 2005).

Além da osteoporose, as consequências decorrentes do hipoestrogenismo se manifestam em variados graus como: instabilidade vasomotora, atrofia dos caracteres sexuais secundários e aumento do risco de doenças cardiovasculares. Além desses sintomas, podem ocorrer também mudanças no comportamento e alterações de humor. (DE LORENZI *et al.*, 2006; POLI; SCHWANKE; CRUZ, 2010).



Identifica-se atualmente uma lista crescente de fatores que contribuem para a deterioração dos ossos, incluindo doenças crônicas e alguns dos medicamentos usados para tratá-las. Em mono ou politerapia, tais medicamentos podem interferir no metabolismo ósseo, alterando o equilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos. Alguns medicamentos podem inclusive alterar a absorção de nutrientes importantes na dinâmica óssea, como o cálcio e vitamina D (HSU *et al.*, 2014).

Os inibidores de aromatase, drogas hormonais utilizadas para o câncer de mama, também podem causar perda óssea. Nestes casos, a associação com bifosfonados pode ajudar a combater a perda óssea (HSU *et al.*, 2014).

Uso de corticosteroides, como prednisona, por exemplo, aumenta o risco, de acordo com o *American College of Rheumatology*. Drogas anti-inflamatórias e aquelas utilizadas para prevenir a rejeição de órgãos após transplante têm um efeito negativo direto sobre as células do osso e podem interferir com o metabolismo de cálcio no organismo (HSU *et al.*, 2014).

Tem-se aumentado esforços para identificar os pacientes que estão em risco para a osteoporose secundária de forma cada vez mais precoce, diante da possibilidade iminente da fragilidade óssea e o risco acentuado de lesão e incapacidade (HSU *et al.*, 2014).

As principais medidas recomendadas incluem: a realização da densitometria óssea para os pacientes que não estariam normalmente nos critérios de inclusão para a realização dos exames de forma rotineira; o tratamento de doenças que contribuam para a perda de massa óssea; mudanças de estilo de vida e ainda suplementos de cálcio e de vitamina D, ou medicamentos específicos para osteoporose como bifosfonados, por exemplo (HSU *et al.*, 2014).

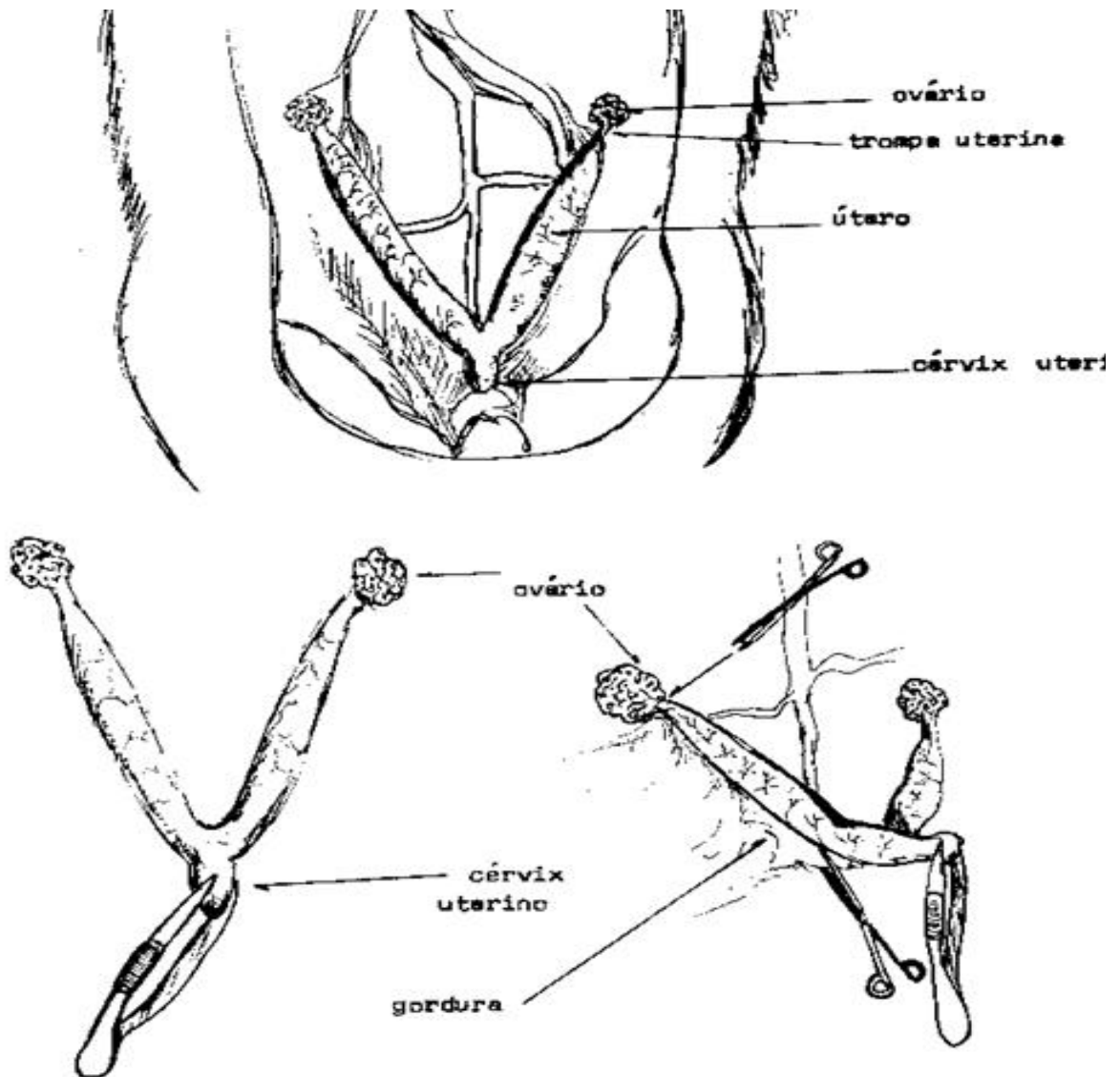
Sabe-se que pacientes com falência ovariana primária apresentam maior risco de fraturas do que mulheres que desenvolvem osteoporose devido a outras causas, como: hipertireoidismo, tratamento com esteroides, hiperparatireoidismo (JANKOWSKA, 2017).

Devido ao rápido aumento da carga de doenças que contribuem com o aparecimento da osteoporose e do custo desta em todo o mundo, um objetivo razoável dos estudos científicos é concentrar-se na redução de comorbidades associadas à osteoporose.

## 2 O RATO COMO MODELO EXPERIMENTAL

A rata, como a maioria dos mamíferos, é animal de fisiologia reprodutiva estral, apresenta ovulação espontânea e seu ciclo apresenta variações de gonadotrofinas e esteroides gonadais semelhantes ao da mulher, constituindo um importante modelo experimental para estudos referentes ao controle do ciclo ovariano de mamíferos. Além disso, apresenta ainda um ciclo de curta duração e anatomia que facilita os procedimentos experimentais, conforme Figura 1 (FREEMAN, 1994).

Figura 1 – Desenho esquemático da anatomia do útero e ovários da rata (*Rattus norvegicus*).



Fonte: Norberto (2002).

O conhecimento da relação entre a citologia vaginal e a função ovariana propiciou a fisiologistas e bioquímicos um poderoso instrumento experimental.

Os períodos reprodutivos das ratas são chamados de ciclos estrais e podem ser classificados como ciclos estrais contínuos ou estacionais. O ciclo estral é o período decorrente entre sucessivas fases de receptividade sexual, geralmente, chamadas de cio ou estro com duração de cerca de 4 a 5 dias nas ratas. Os ciclos podem ser monoestrais (uma vez por ano) ou poliestrais (duas ou mais vezes por ano) e é caracterizado por quatro fases, diestro, proestro, estro e metaestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; WANG *et al.*, 2009)

Cada fase tem duração média de 24 horas e está relacionada diretamente com a flutuação dos níveis de estradiol (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Na rata o esfregaço da parede vaginal revela um padrão mutável de células e muco de acordo com os níveis de estradiol. Na fase diestro I, em que as concentrações séricas de estradiol estão baixas, o esfregaço vaginal exhibe leucócitos em número mais alto, poucas células fusiformes cornificadas e algumas células epiteliais (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

No diestro II, observa-se esfregaço praticamente constituído apenas por leucócitos. Segue-se então o aumento dos níveis séricos de estradiol e ocorre o pico de LH, dando início à fase chamada proestro com atividade proliferativa do epitélio vaginal e predomínio de células arredondadas, polinucleadas que podem estar dispersas ou agrupadas (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Com a queda dos níveis de estradiol coincidentemente com a ovulação e formação do corpo lúteo, há diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células cornificadas, dando o aspecto de “folhas secas” sendo esta fase chamada de estro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

O curto período de tempo entre o estro e o diestro (doze horas), quando se observam células cornificadas e leucócitos é denominado de metaestro por alguns autores (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

No começo do estro, o esfregaço é composto quase exclusivamente de células epiteliais cornificadas diferente das células cor. No fim do estro, aparece muito muco na rata, o ciclo se sucede rapidamente: os corpos amarelos não são secretores e o metaestro é curto, a não ser que se instale um processo de gravidez ou

pseudogravidez. Em animais cujos corpos amarelos são secretores, o metaestro é prolongado. Diestro, proestro e estro ocorrem na fase folicular da função ovariana, enquanto que o metaestro ocorre na fase lútea (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Já em primatas o ciclo reprodutivo é o ciclo menstrual, com duração média de 28 dias, iniciando-se no primeiro dia de sangramento e finaliza na véspera do início do próximo período de sangramento. Em macacas Rhesus e mulheres a ovulação é espontânea, ocorrendo por volta da metade do ciclo (entre o 11<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias). Os primatas são sexualmente receptivos ao longo de todo o ciclo; portanto, não apresentam o estágio de estro durante o ciclo menstrual. O ciclo menstrual pode ser também dividido em fase folicular, durante a qual o endométrio uterino se torna mais espesso pelo endométrio, e lútea em que, caracteristicamente, as artérias espiraladas se apresentam mais tortuosas e as glândulas do endométrio exibem maior atividade secretora. A menstruação ocorre quando o corpo amarelo cessa a secreção de progesterona. O sangramento das artérias espirais e a queda do endométrio persistem durante 3 a 5 dias, seguindo-se novo crescimento do endométrio (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Em relação à formação dos folículos primordiais, outra importante diferença entre as fêmeas de roedores e, especificamente, as mulheres também é observada, visto que no ovário humano estes folículos estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal, enquanto que nas fêmeas de roedores, formam-se durante os três primeiros dias após o nascimento. O mesmo não ocorre em relação ao recrutamento e seleção do folículo antral, os mecanismos são semelhantes entre as fêmeas de roedores e primatas, entretanto, em roedores, múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo (HIRSHFIELD, 1991).

Para estudar agentes capazes de preservar o metabolismo ósseo e prevenir a osteoporose, diversos modelos animais têm sido utilizados. De acordo com as diretrizes da *Food and Drug Administration*, estudos de metabolismo ósseo com base em modelos de ratos devem incluir avaliações da tíbia proximal, fêmur distal ou vértebras lombares (THOMPSON *et al.*, 1995). A rata ooforectomizada fornece um excelente modelo animal pré-clínico que descreve com precisão as características clínicas importantes do esqueleto humano esgotado com estrogênio e pode ser usado para examinar respostas a agentes terapêuticos (LANE *et al.*, 1999).

O desenvolvimento específico do sítio de osteopenia/osteoporose esponjosa em ratas ooforectomizadas é uma das respostas biológicas mais reprodutíveis na pesquisa esquelética (JEE; YAO, 2001). Após a ooforectomia, ocorre a perda rápida de massa e força óssea esponjosas e, em seguida, prossegue a uma taxa mais lenta de uma forma específica do local para alcançar uma fase estável da massa óssea após 90 dias. As características desta perda óssea imitam as alterações ósseas após ooforectomia ou menopausa em humanos (KALU, 1991).

Apesar do uso de criopreservação de tecido ovariano para restaurar a fertilidade, não há estudos publicados abordando os efeitos desta técnica no metabolismo ósseo. Com o intuito de estudar os possíveis efeitos da criopreservação de tecido ovariano no metabolismo ósseo, de forma a interferir na morbidade de pacientes jovens tratadas com quimioterápicos contra as neoplasias, elaborou-se esse estudo experimental.

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar os efeitos do autotransplante de tecido ovariano com vitrificação no metabolismo ósseo em ratas previamente castradas.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Analisar o reimplante de tecido ovariano após criopreservação no omento maior de ratas por meio de avaliação histológica;
- Comparar os níveis de estradiol após reimplante de tecido ovariano criopreservado em ratas de grupos de intervalo precoce e tardio de pós-castração;
- Comparar o metabolismo ósseo após reimplante de tecido ovariano criopreservado em ratas de grupos de intervalo precoce e tardio de pós-castração.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Animais

Este estudo incluiu 27 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com idades entre 11 e 12 semanas e pesando 200 a 300 g, período no qual havia maturidade hormonal e encerramento da placa de crescimento distal da tíbia, que ocorre após 3 meses de idade, de acordo com JEE; YAO, 2001. Os animais foram alojados em gaiolas individuais em um ambiente controlado (ciclo circadiano,  $22 \pm 2$  °C, umidade constante e comida e água *ad libitum*). Todos os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, e arquivados sob a entrada número 79/2012 (ANEXO A).

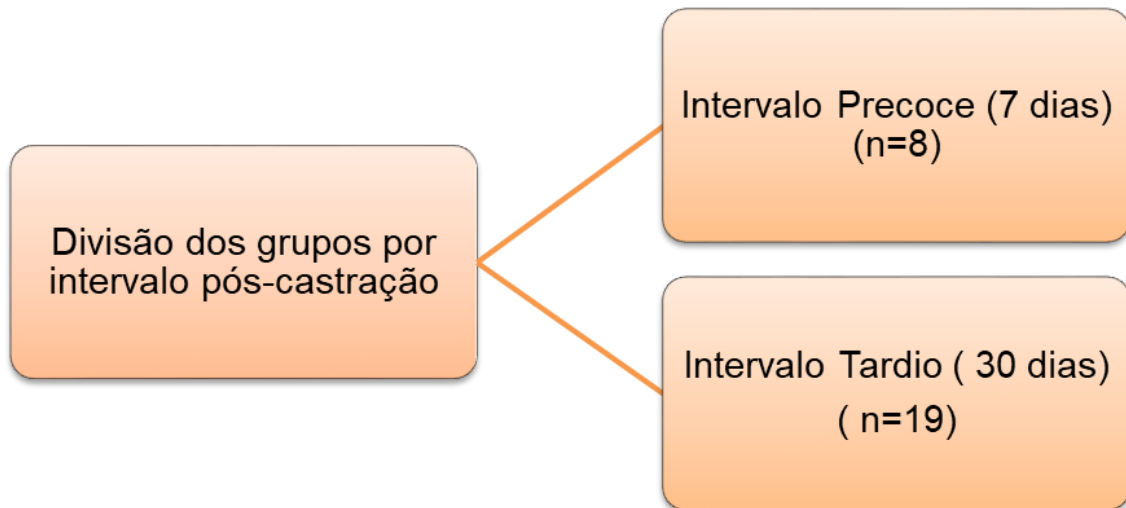
### 4.2 Desenho Experimental

Um estudo experimental duplo-cego foi realizado em ratas adultas.

Para um modelo experimental com potência para o teste de 90% e um nível de significância de 0,05, considerando um desvio máximo de 0,2 (20%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,5 (50%), temos que o cálculo de amostra, deve ser de 4,36 animais. Arredondando para o próximo número inteiro, tem-se o valor de 5 animais por grupo. Nesse estudo, utilizou-se o número mínimo de 8 ratos no grupo A, de forma a respeitar o cálculo acima descrito, com 3 animais a mais, garantindo certa margem de segurança.

Foi realizada ooforectomia bilateral e os ovários extraídos foram criopreservados via vitrificação. Os ovários vitrificados foram então reimplantados nas ratas ooforectomizadas, quer uma semana (grupo A, n = 8) ou um mês (grupo B, n = 19) após a ooforectomia, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma com divisão dos animais em grupos por intervalo após a castração.

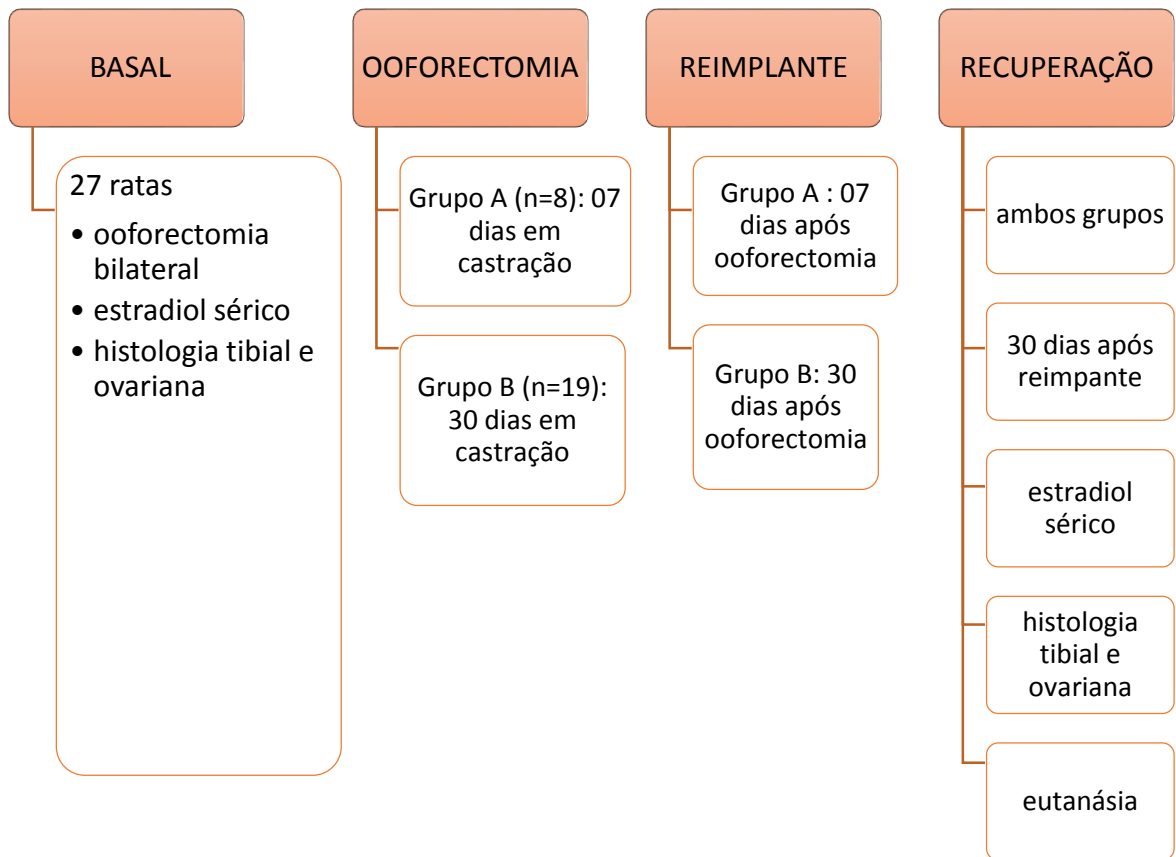


Fonte:.. Elaborado pelo autor (2017).

Foram realizados ensaios de estradiol sérico e análise histológica do tecido e da tíbia antes da ooforectomia (parâmetros basais), no final do período da castração cirúrgica (parâmetros do período de castra e um mês após o transplante (parâmetros de recuperação) (QUADRO 1).



Quadro 1- Desenho do estudo



Fonte: Elaborada pela autora (2017)

#### 4.3 Coleta de tecido ovariano e de tecido ósseo

Após 2h de jejum (para diminuir a quantidade de drogas necessárias administradas) realizou-se assepsia com uso de gase estéril e solução de Clorexidina (Riohex 0,2% Solução Clorexidina Aquosa Dermo Suave®) e tricotomia da região abdominal. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (40 mg/kg ou 5 mg/kg, respectivamente) no quadrante abdominal inferior direito, de acordo com as diretrizes da Federação de Associações de Ciência Animal de Laboratório (FELASA) (GUILLEN, 2012), conforme demonstrado no anexo B. Após efeito anestésico pleno, era injetada na região subcutânea do dorso do animal na quantidade de 10 ml de SF 0,9% para efeito de hidratação.

Então realizou-se a laparotomia exploradora, com exposição dos órgãos pélvicos (ANEXO C) e ooforectomia bilateral sendo os ovários dissecados, a fim de

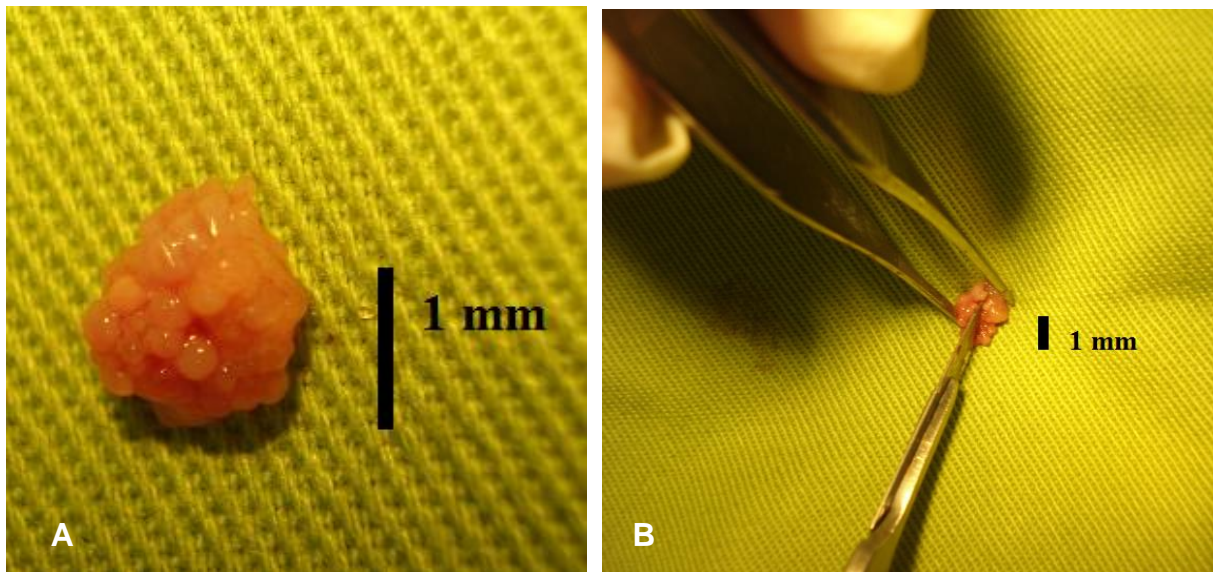
se retirar toda a gordura e todo o mesentério, conforme Figura 3, e então fatiados em tamanho aproximado de 2 mm<sup>3</sup> com auxílio de microscópio.

Um ovário foi imediatamente submetido à análise histológica, enquanto o outro foi criopreservado por vitrificação (n = 27).

Finalmente, a parede abdominal foi fechada e suturada usando fio de nylon 5-0 em dois planos (o plano peritônio-aponeurótico e a pele). No primeiro dia do pós-operatório, 120 mg/kg de acetaminofeno e 60 mg/kg de codeína foram administrados continuamente, por via oral, às ratas para reduzir a dor. (Sanada et al., 2015)

No procedimento foram usados: lupa cirúrgica (Lupa com Led®, Protécni Equipamentos, Araraquara, São Paulo, Brasil), microclampes vasculares de Acland, microclampes vasculares, material de sutura mononáilon 6-0, pinças de relojoeiro nº 3 e 5, tesouras curva e reta de microcirurgia e porta-agulhas Barraquier curvo.

Figura 3 – Tecido ovariano de ratas após excisão cirúrgica e pré-congelação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

A: Os diâmetros desta peça correspondem a 1,45mm (vertical) por 1,35 mm (horizontal);  
B: Secção de tecido ovariano de ratas em lâminas para congelação.

A biópsia de tecido ósseo da parte tibial proximal da pata esquerda traseira também foi realizada.

Para tanto, após a anestesia, realizou-se a tricotomia da parte interna da coxa esquerda da rata com assepsia local. Realizou-se incisão de 1,5cm de comprimento com fácil retirada da pele em torno da coxa. Devido ao fato de a fáscia que recobre a

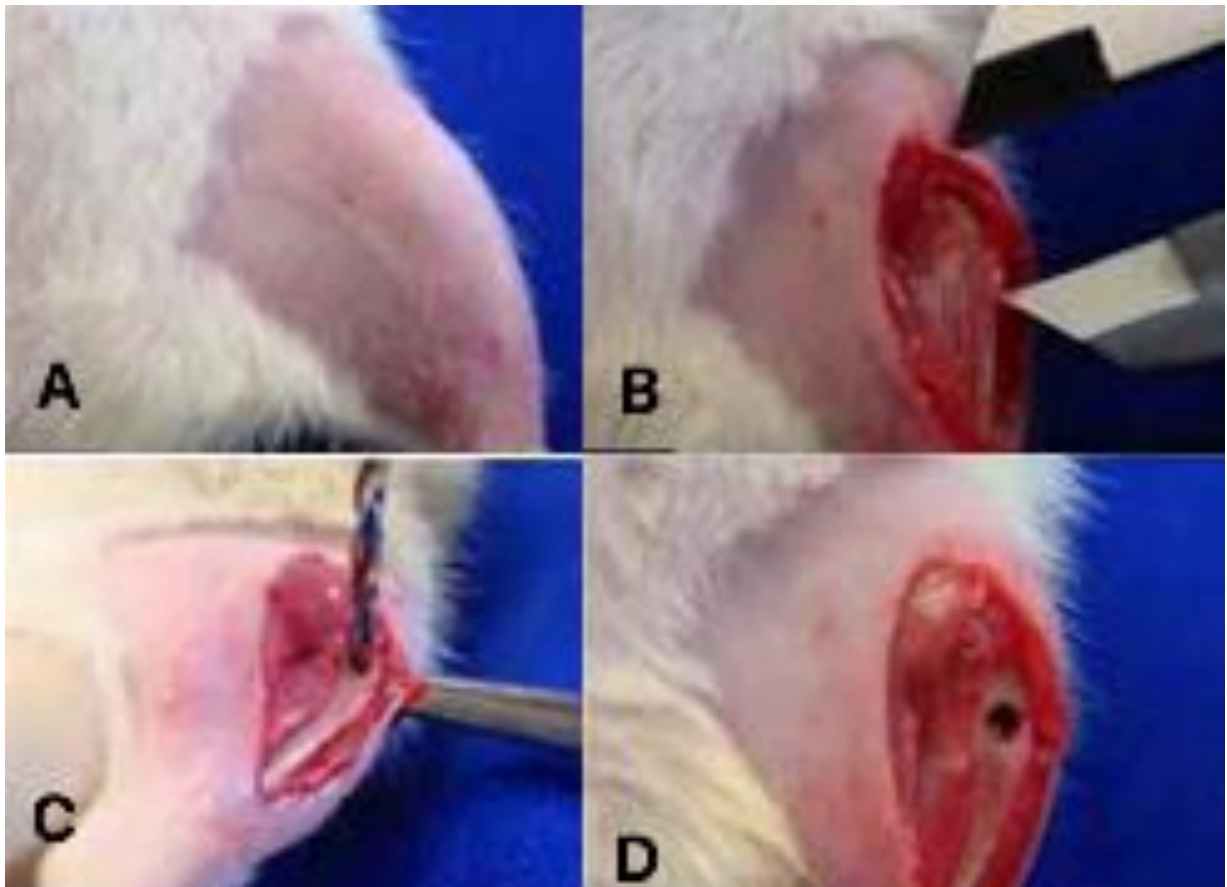
musculatura desta área ser muito difícil de separar, divulsionou-se a musculatura dos músculos glúteo máximo e o bíceps femoral para visualização correta da musculatura profunda, (que não são revestidos de fáscia), como visto na figura 4.

Uma vez exposta a musculatura profunda, divulsionou-se a musculatura com posterior exposição da parte proximal, anterior, cerca de 5,0 mm da inserção da tibia (FIGURA 4)

A lesão óssea foi realizada com uma broca helicoidal de 2 mm de diâmetro acoplada a uma mini-broca (3i Implant Innovations Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA). com uma rotação de 12.000rpm e uma irrigação constante com solução salina.

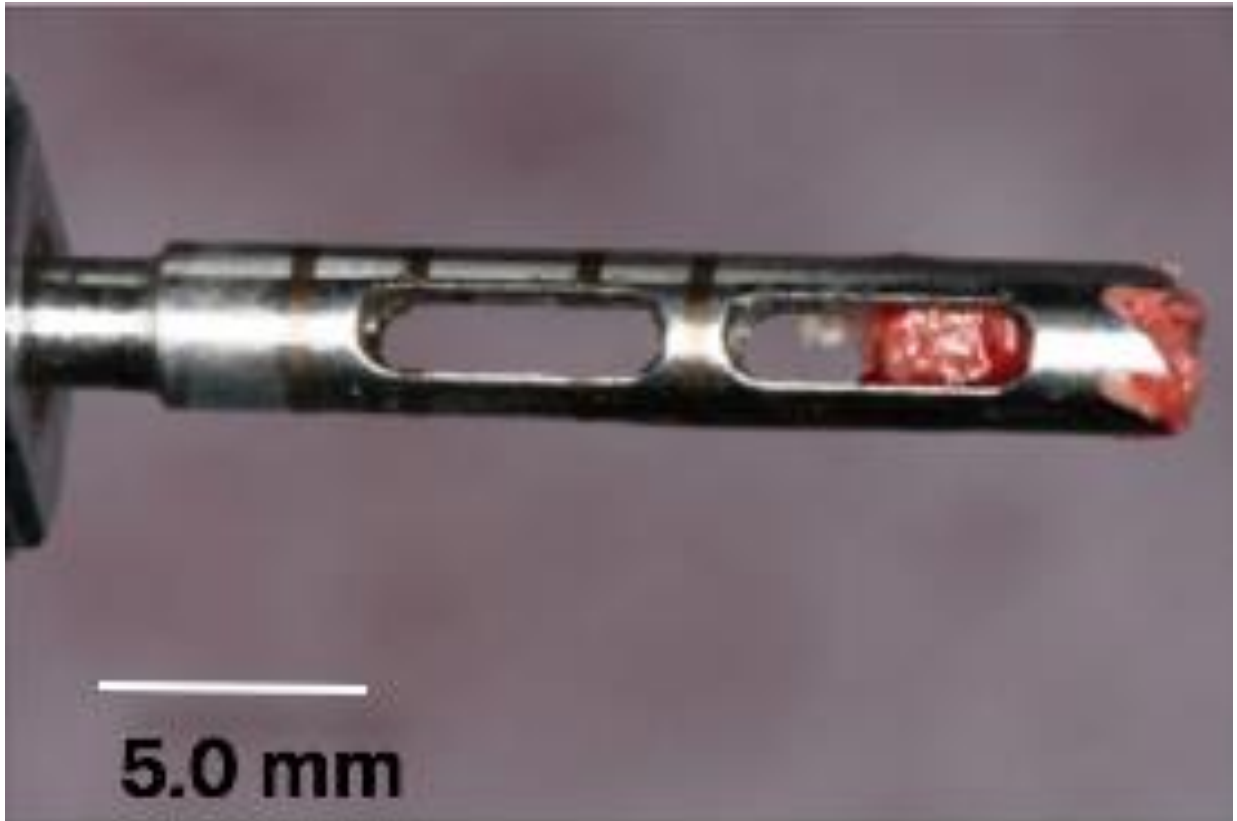
A broca foi posicionada verticalmente e em uma posição perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso para penetrar no córtex, atingindo o canal medular profundo, mas sem atingir o lado contralateral (FIGURAS 4 e 5). Em seguida, a pele foi suturada com monofilamento de nylon 3-0 (Shalon®) em pontos equidistantes. No primeiro dia do pós-operatório, 120 mg/kg de acetaminofeno e 60 mg/kg de codeína foram administrados continuamente, por via oral, às ratas para reduzir a dor. (Sanada et al., 2015)

Figura 4: Passos cirúrgicos para procedimentos da biópsia óssea tibial :(A) tricotomia em porção anterior de coxa esquerda; (B) medição do local para o defeito ósseo com uma pinça;; (C) perfuração com broca de 2 mm de diâmetro (D) defeito ósseo após a perfuração.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 5 – Amostra de tecido ósseo da tíbia proximal biopsiado com uso de fresa trefina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

#### 4.4 Vitrificação de tecido ovariano

Após a excisão, os ovários ( $\approx 2 \text{ mm}^3$ ) foram dissecados antes de serem seccionados em fragmentos de  $2 \text{ mm}^3$ . O tecido de cada ovário foi submetido a análise histológica, enquanto o tecido do ovário contralateral de cada animal foi criopreservado via vitrificação ( $n = 27$ ). A vitrificação e o subsequente aquecimento foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Silva *et al.* (2014).

Resumidamente, os ovários foram inicialmente equilibrados em HEPES (Sigma-Aldrich/Merck) contendo 10% (v/v) de etilenoglicol e 10% (v/v) de DMSO durante 20min à temperatura ambiente (23 a 26 °C) e depois imerso em solução de

vitrificação contendo 17% (v/v) de etilenoglicol, 17% (v/v) de DMSO e 0,75M de sacarose em HEPES durante 3 min.

Os ovários foram então transferidos individualmente com solução de vitrificação mínima para a superfície de um cubo metálico flutuando em nitrogênio líquido. Os ovários vitrificados foram armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 30 a 60 min. Usando fórceps refrigerados, as amostras foram colocadas em crioviais refrigerados contendo nitrogênio líquido.

#### **4.5 Aquecimento de tecido ovariano**

Para descongelar o córtex ovariano, os criotubos foram removidos do vaso Dewar e mantidos à temperatura ambiente durante 2 min, seguido por imersão num banho de água a 37°C durante 2 minutos. Foi realizada então uma leve e suave agitação. Os conteúdos dos criotubos foram rapidamente esvaziados em placas de cultura com meio Leibovitz L - 15, e lavou-se 3 vezes com meio fresco para remover o crioprotetor residual antes do reimplante, de acordo com um protocolo adaptado de Lunardi *et al.* (2015). Cada amostra foi então submetida a um banho de 3 a 5 min em soluções contendo meio essencial mínimo mais 10% de soro de vitelo fetal e concentrações decrescentes de sacarose (0,5M, 0,25M e 0,0M).

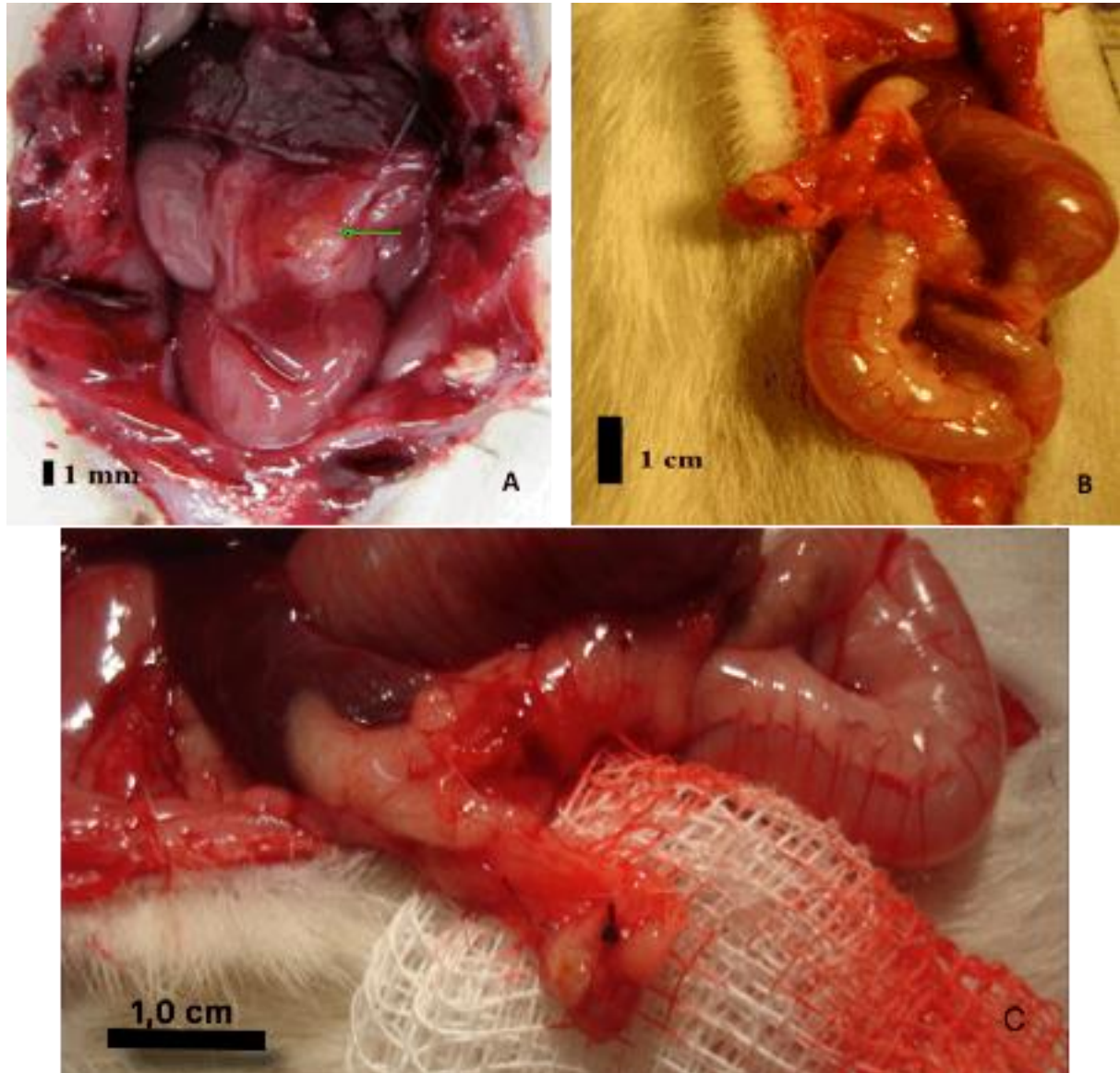
#### **4.6 Autotransplante de tecido ovariano**

Para comparar os efeitos precoce e tardio da castração cirúrgica, as ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos (A e B). O autotransplante de tecido ovariano vitrificado no omento maior foi realizado uma semana após a ooforectomia para o grupo A (n = 8) e um mês para o grupo B (n = 19) de acordo com o tempo em que o animal permaneceu sem os ovários.

Partes dos ovários foram implantadas no omento perto do estômago usando um ponto simples com uma sutura de nylon 4-0 sem anastomose vascular (FIGURA 6). Após o tratamento, o fechamento da parede abdominal foi realizado utilizando um fio de monofilamento de nylon 5-0 em dois planos: o músculo e a pele do peritônio-aponeurótico.



Figura 6 – Cavidade abdominal de uma rata após laparotomia evidenciando-se (seta) o reimplante de tecido ovariano no omento maior.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

A: A coloração do tecido e a ausência macroscópica de áreas de necrose sugerem boa pega do enxerto. Acima da seta, mais escuro, o fígado. Abaixo do reimplante as alças intestinais, recobertas por tecido fibrótico e aderências, surgidos após a terceira intervenção abdominal; B e C: Tecido ovariano reimplantado no omento maior de ratas (ponto negro- fio de sutura).

Um mês após a AO em ambos os grupos (A e B), realizou-se ooforectomia bilateral nas ratas. A cavidade abdominal foi aberta e os ovários transplantados foram

identificados e avaliados macroscopicamente. O leito muscular também foi avaliado para avaliação de vascularização e possíveis adesões circundantes. Os enxertos foram posteriormente removidos e os animais foram submetidos a eutanásia com uma dose letal do anestésico anteriormente utilizado.

## **4.7 Parâmetros antes e depois do autotransplante de ovário**

### **4.7.1 Análise Hormonal**

#### **4.7.1.1 Determinação do Estradiol**

O nível sérico de estradiol foi medido para ambos os grupos (*Diagnostics Biochem Canada Inc.*, Sensibilidade do ensaio, 10 pg/mL) em vários pontos de tempo (antes da ooforectomia bilateral (nível basal), imediatamente antes do autotransplante (castração cirúrgica) e um mês após o autotransplante (reimplante). De acordo com o protocolo de nosso laboratório, foram colhidas amostras de sangue de 2,0 ml do plexo retro-orbital com o auxílio de um tubo de hematócrito capilar heparinizado. Após centrifugação do sangue a 2500 rpm durante 15 min, o plasma foi coletado e armazenado em um congelador para uso posterior em um ensaio hormonal. Foram utilizados kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (*Diagnostics Biochem Canada Inc.*, sensibilidade do ensaio, 10 pg/ml) para medir quantitativamente os níveis séricos de estrogênio

### **4.7.2 Análise histológica**

#### **4.7.2.1 Tíbias**

Em ambos os grupos, as biópsias da tíbia foram coletadas antes da ooforectomia bilateral (linha de base), imediatamente antes do autotransplante (castração cirúrgica) e um mês após o autotransplante (reimplante). As amostras de biópsia da tíbia foram ressecadas, fixadas em 10% de formaldeído neutro tamponado e descalcificadas em solução de EDTA durante 2 semanas. Após a descalcificação, os espécimes foram submetidos ao processamento histológico de rotina e a incorporação de parafina. Posteriormente, secções de parafina de 5 µm da metáfise



da tíbia foram desparafinadas e coradas com hematoxilina e eosina para exame de microscopia óptica (MALLUCHE; FAUGERE, 1986) A espessura trabecular e cortical, diâmetro do canal de Havers, contagem de osteoblastos e osteoclastos e presença de osteóide foram avaliadas.

A metodologia utilizada para tal foi:

- Medidas diretas da espessura trabecular, da espessura cortical e do diâmetro dos canais de Havers com uso de microscópio e régua milimetrada;
- Contagem de osteoblastos e osteoclastos na câmara de Neubauer 30 por 70 mm e 4 mm de espessura utilizando-se a técnica de zig-zag;
- Detecção simples de presença ou ausência de osteóides.

#### 4.7.2.2 Ovários

Em ambos os grupos, as amostras de ovários foram submetidas à análise histológica imediatamente após a ooforectomia e, imediatamente, após a eutanásia para avaliar as alterações histológicas. As amostras de tecido ovariano foram fixadas em paraformaldeído a 10% e incorporadas em parafina. As secções de 8 µm foram então preparadas para coloração com hematoxilina e eosina. As secções foram analisadas sob um microscópio de luz acoplado a um sistema de aquisição de imagem (LAZ 3.5, LEICA - modelos DM1000). O folículo qualitativo e as avaliações histológicas foram realizadas utilizando classificações convencionais (BANCROFT; GAMBLE, 2008).

Para a realização deste protocolo foram utilizados os seguintes parâmetros de morfometria e histometria (HARRISON; CHAMBERS; GREEN, 1980):

- a) Contagem de número de folículos por amostra:
  - Quantificação de folículos primordiais normais: definidos como aqueles que apresentam cavidade bem definida contendo um oócito com um núcleo;
  - Quantificação de folículos primordiais atresicos: aqueles que apresentam células da granulosa em processo degenerativo e muitas vezes com aparente degeneração oocitária, de forma a apresentar ooplasma eosinofílico, contração e formação de grumos de cromatina ou membrana nuclear enrugada;
- b) Presença ou não de corpo lúteo (CL).

#### 4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram cegas e realizadas por especialista. Os achados foram analisados usando ANOVA e os testes t de amostras pareadas. Os graus de liberdade e o nível de significância estatística foram definidos em  $n-1$  e 5% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. A tabela de Rosner (ROSNER, 2011) foi usada para referência.

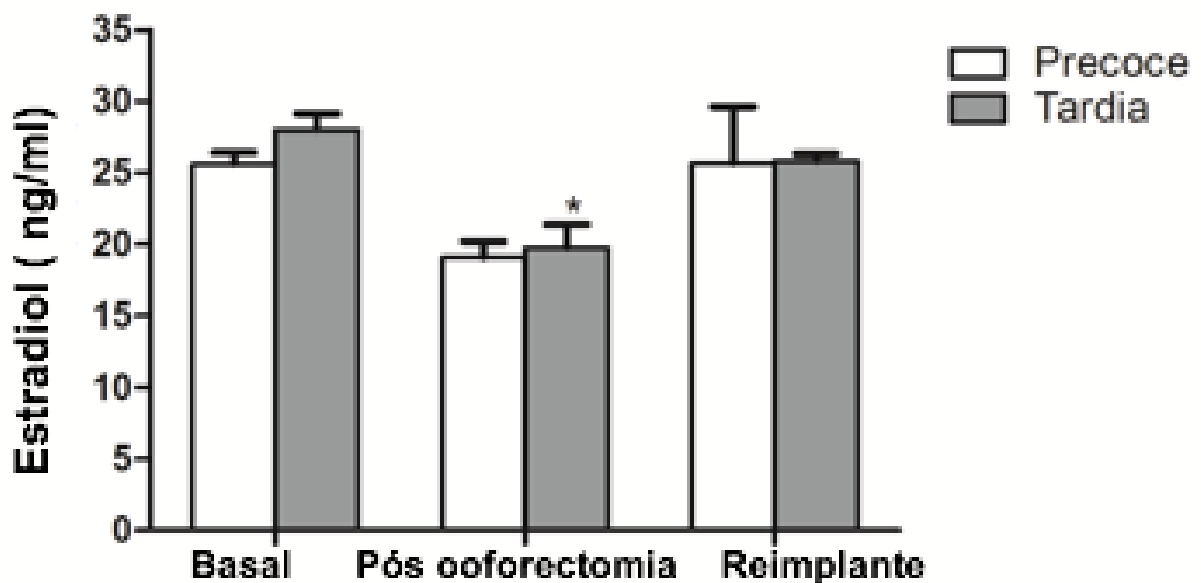
As variáveis do estudo foram dicotômicas (presença/ausência). Os dados foram analisados com o teste exato de Fisher usando GraphPad Prism 5.0 e expressos como frequências e porcentagens absolutas. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Nível de estradiol plasmático

Em ambos os grupos houve queda do estrógeno após castração e retorno para níveis próximos aos fisiológicos após reimplante ovariano. Não houve diferença estatisticamente significativa na a variação dos níveis de estradiol entre os dois grupos de estudo ( $p=0.819$ ). Nos animais com castração cirúrgica precoce apesar da variação dos níveis basais ( $25.6\pm 0.8\text{ng/dL}$ ) para o status pós-castração ( $19.0\pm 1.1\text{ng/dL}$ ) e após um mês do reimplante ( $25.6\pm 3.9\text{ng/dL}$ ) não houve diferença significativa entre os três momentos de análise de estradiol ( $p=0.140$ ). Porém, o grupo com castração cirúrgica tardia apresentou uma redução significativa dos níveis de estradiol do pré-operatório ( $28.0\pm 1.1\text{ng/dL}$ ) para o status pós-castração ( $19.7\pm 1.6\text{ng/dL}$ ) e recuperação dos níveis normais um mês após a cirurgia de reimplante ( $25.8\pm 0.5\text{ng/dL}$ ) ( $p=0.001$ ).

Figura 7: Avaliação dos níveis de estradiol nos animais com castração cirúrgica nos três tempos. \*  $p < 0,05$  versus baseline e um mês pós-cirúrgico do mesmo grupo (ANOVA/Bonferroni)



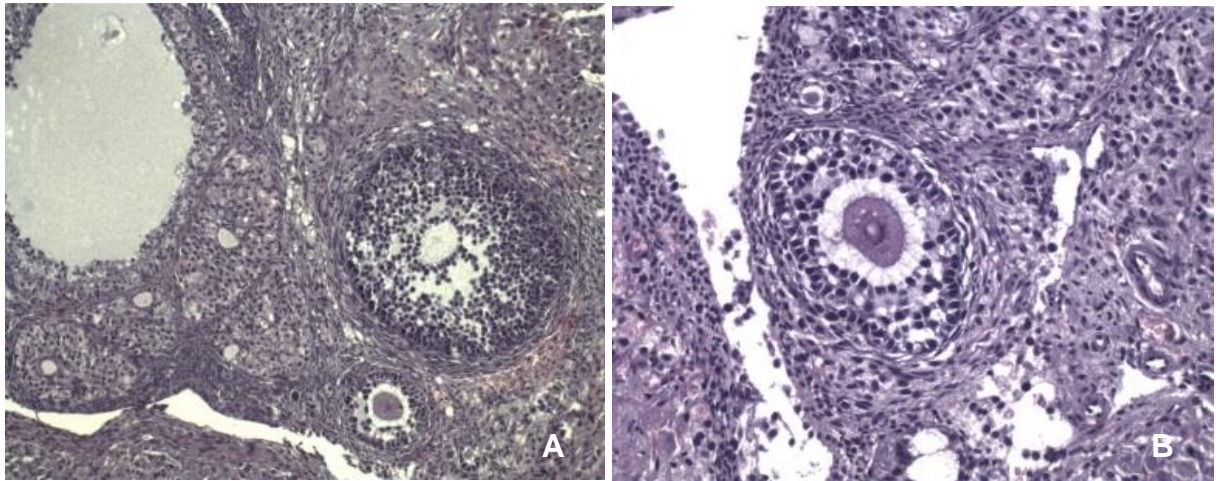
Fonte: Elaborada por Hirth (2013)

## 5.2 Enxerto ovariano

O enxerto foi bem-sucedido (presença de folículos) em 81,5% dos animais (grupo a:  $n = 7/8$ , 87%, grupo b:  $n = 15/19$ , 78,9%,  $p = 0,080$ ), sendo os índices semelhantes aos descritos na literatura, mesmo tais enxertos sendo feitos em ovários frescos, ou seja, não submetidos a nenhuma técnica de criopreservação. (ALBERTI, 2002).

No geral, aproximadamente 40,7% dos enxertos apresentaram folículos atrécicos, 27,3% exibiram folículos atrécicos e primordiais e 13,5% apresentaram folículos primordiais e o corpo lúteo (FIGURAS 8 e 9). Nenhum enxerto de ovário foi encontrado nos restantes 18,3%; apenas esses animais foram encontrados em tecido inflamatório e cicatricial e/ou fibrose.

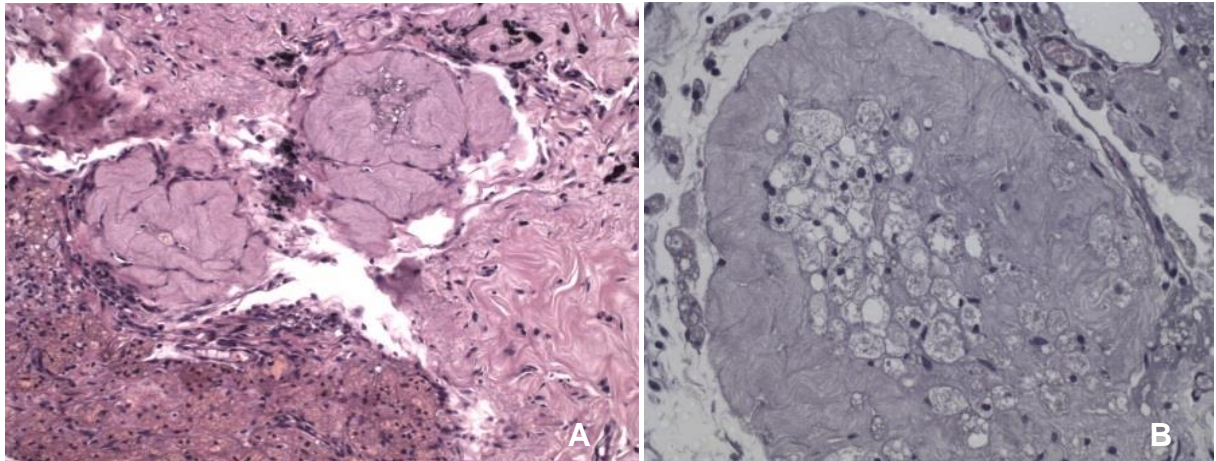
Figura 8 – Folículos primordiais e corpo lúteo de ovários de ratas após o reimplante.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

A) Magnificação de 200x; B) Magnificação de 400x; Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.

Figura 9 – Folículos atrésicos de ratas após o reimplante.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

A) Magnificação de 200x; B) Magnificação de 400x; Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.

### 5.3 Parâmetros ósseos

#### Osso cortical

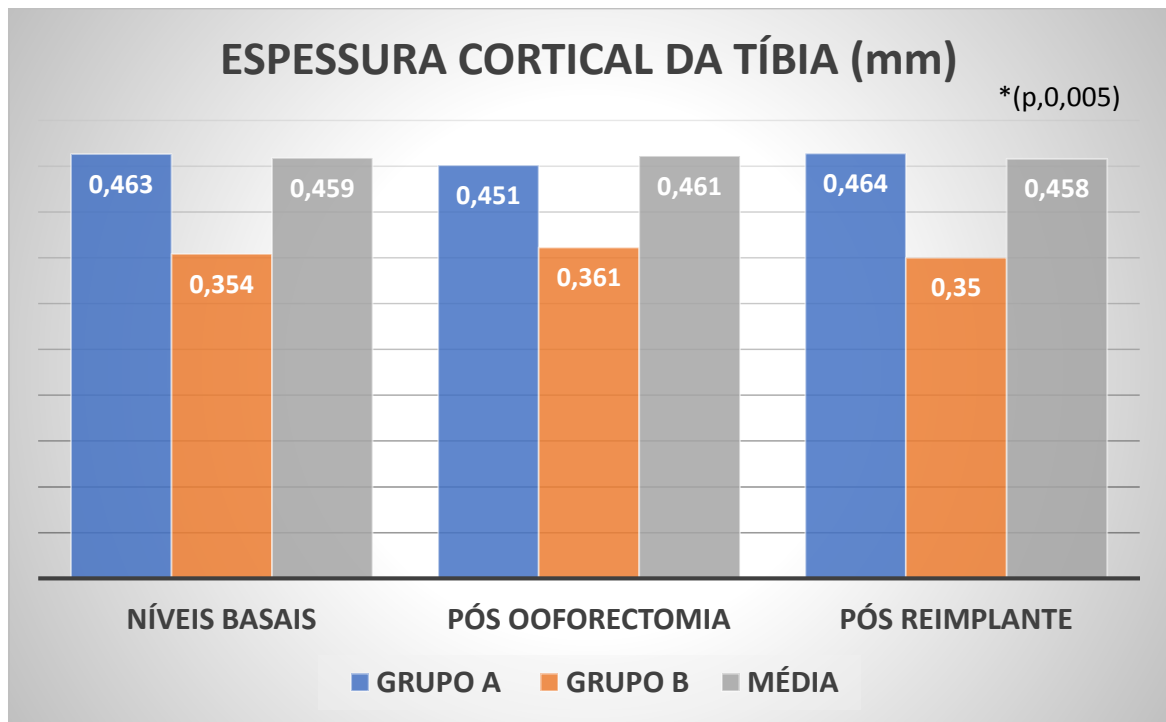
Em geral, a espessura cortical média da tíbia foi de  $0,464 \pm 0,14$  mm na linha de base,  $0,350 \pm 0,14$  mm após ooforectomia e  $0,458 \pm 0,17$  mm no mês seguinte ao AO ( $p < 0,005$ ) (GRÁFICO 1).

Para o Grupo A (Intervenção Precoce), espessura cortical média da tíbia foi de  $0,461 \pm 0,14$  mm na linha de base,  $0,361 \pm 0,14$  mm após ooforectomia e  $0,461 \pm 0,17$  mm no mês seguinte ao AO ( $p < 0,005$ ) (GRÁFICO 1).

No grupo de Intervenção Tardia (Grupo B), a espessura cortical média da tíbia foi de  $0,464 \pm 0,14$  mm na linha de base,  $0,350 \pm 0,14$  mm após ooforectomia e  $0,458 \pm 0,17$  mm no mês seguinte ao AO ( $p < 0,005$ ) (GRÁFICO 1).

O teste T pareado, adotando-se como grau de liberdade o valor  $(n-1)$  e tendo como "p" (probabilidade) o valor de 0,005, recebe valor de 2,977. Como em nossos cálculos encontramos o valor de 5,28, concluímos que:  $p < 0,005$

Gráfico 1 – Espessura cortical da tíbia (mm).



Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Coluna azul (níveis basais): foram coletadas biópsia da tíbia e estradiol sérico; Coluna verde: primeiro período após ooforectomia (uma semana para o Grupo A e um mês para o Grupo B); Coluna laranja: período após autotransplante (30 dias para ambos grupos). (P < 0,005)

### Osso trabecular

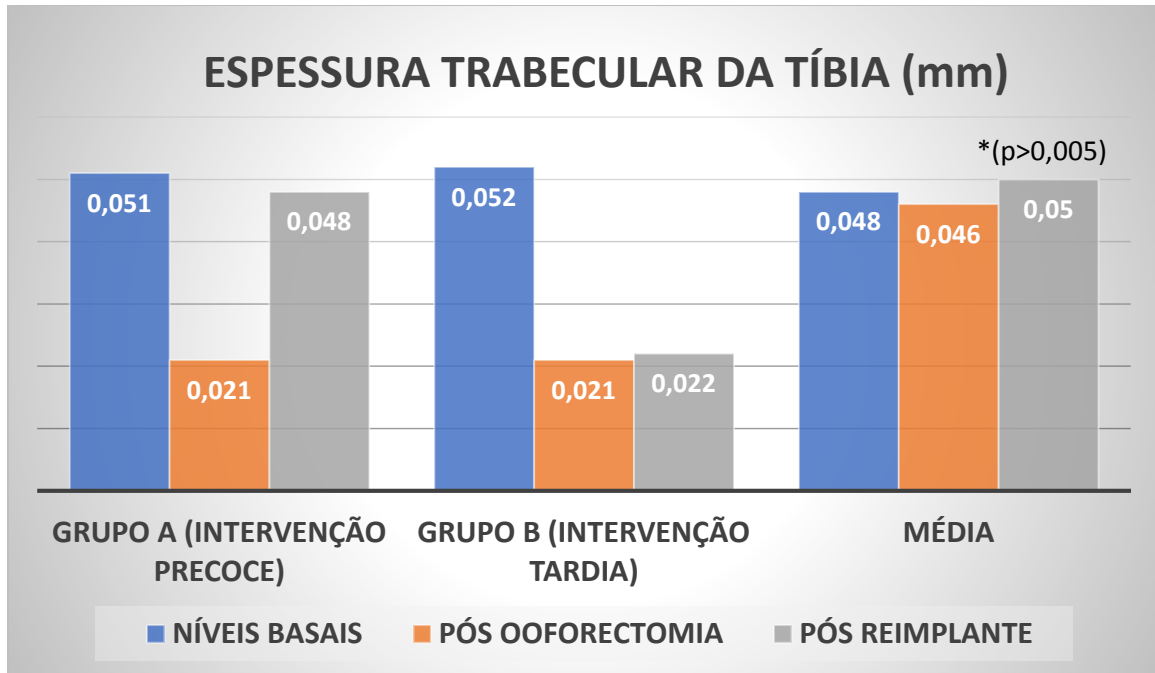
Os resultados da espessura trabecular média foram  $0,051 \pm 0,08$  mm na linha de base,  $0,021 \pm 0,08$  mm após ooforectomia e  $0,0480 \pm 0,032$  mm no mês seguinte ao AO (p < 0,005) (GRÁFICO 2).

Para os animais do grupo A obtivemos:  $0,052 \pm 0,08$  mm na linha de base,  $0,021 \pm 0,08$  mm após ooforectomia e  $0,0460 \pm 0,032$  mm no mês seguinte ao AO (p < 0,005) (GRÁFICO 2).

Enquanto que para os animais do grupo B:  $0,051 \pm 0,08$  mm na linha de base,  $0,022 \pm 0,08$  mm após ooforectomia e  $0,050 \pm 0,032$  mm no mês seguinte ao AO (p < 0,005) (GRÁFICO 2).

O teste T pareado, adotando-se como grau de liberdade o valor (n-1) e tendo como "p" (probabilidade) o valor de 0,05, recebe valor de 1,812. Como em nossos cálculos encontramos o valor de 0,472, concluímos que o p não foi significativo.

Gráfico 2 – Espessura trabecular da tíbia (mm).



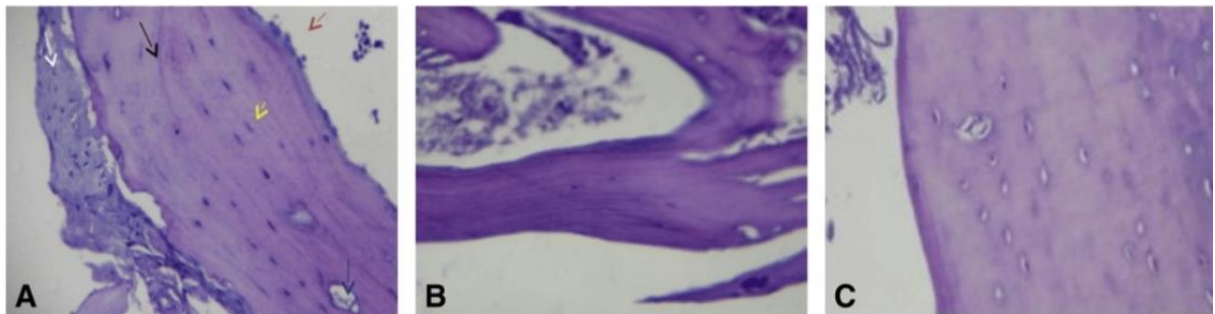
Fonte: Elaborado pelo autor (2017).

Coluna azul (níveis basais): foram coletadas biópsia da tíbia e estradiol sérico; Coluna verde: primeiro período após ooforectomia (uma semana para o Grupo A e um mês para o Grupo B); Coluna laranja: período após autotransplante (30 dias para ambos grupos). (P>0,005)

No osso cortical, antes da ooforectomia, observamos tecido mole e ósseo durante a transição metafisária-diáfise, bordas de osteoblastos e osteócitos em espaços compactos. A borda dos osteoblastos estava ausente no grupo A, uma semana após a ooforectomia. Um mês após o autotransplante, houve ausência de trabéculas (FIGURA 10).



Figura 10 – Histologia óssea cortical do Grupo A.

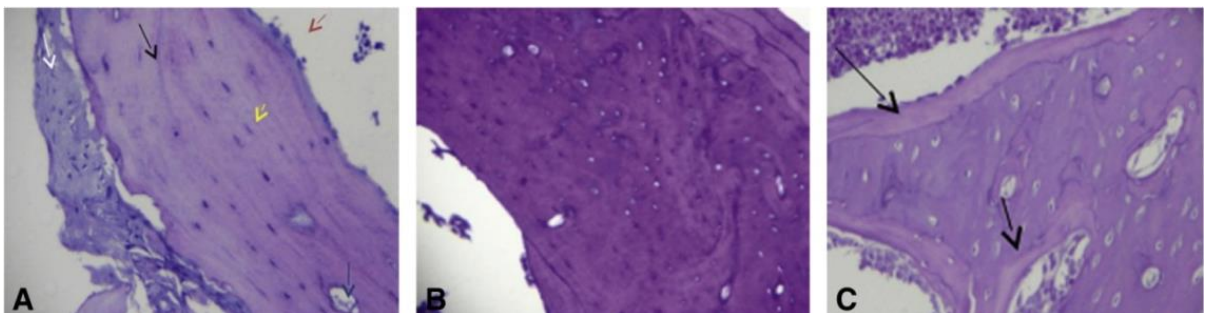


Fonte: Elaborado pelo autor (2013).

Grupo A (Grupo inicial): A) Antes da Ooforectomia: tecidos moles (seta branca), tecido ósseo na transição metafisária-diafisária (seta preta), rima de osteoblastos (seta vermelha), osteócitos em compacto espaços (seta amarela); B). Após ooforectomia (7 dias): osteoblastos de rima não observados; C). Após o reimplante (37 dias): ausência de trabéculas; Magnificação de 100x; Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.

No grupo B, 30 dias após a ooforectomia, observamos canais extensos ocasionalmente vazios (sem osteócitos) e focos de osteoblastos. No entanto, um mês após o AO, observamos a formação de osso cortical contendo uma borda de osteoblastos, canais e grandes lacunas contendo osteócitos (FIGURA 11).

Figura 11 – Histologia óssea cortical do Grupo B.



Fonte: Elaborado pelo autor (2013).

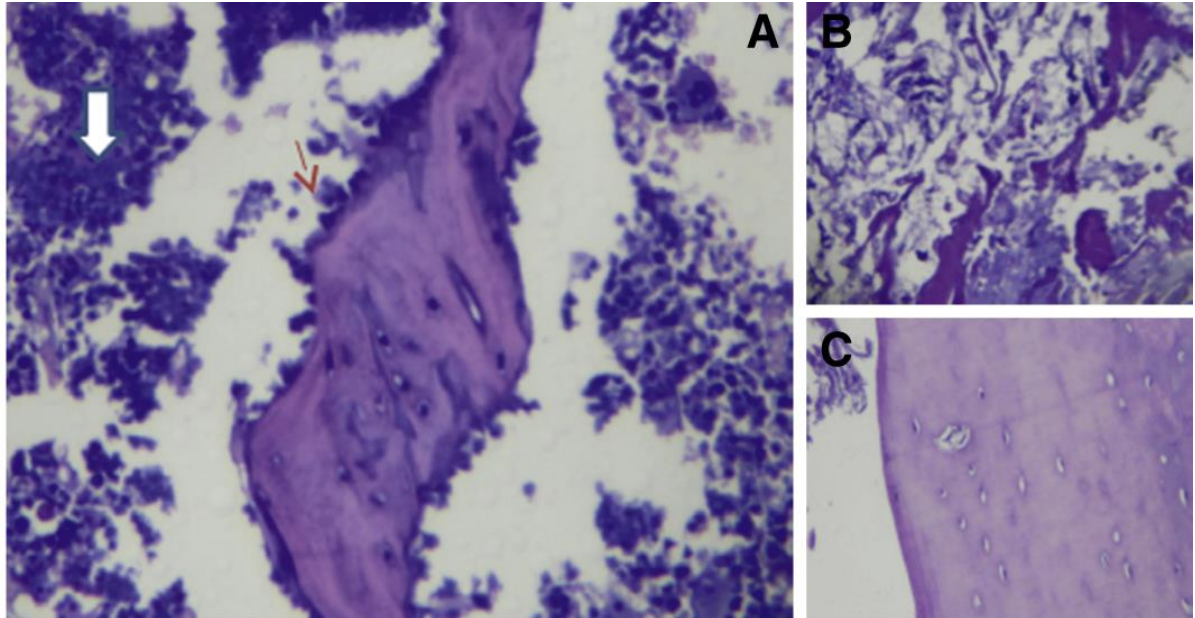
Grupo B (Grupo Tardio): A) Antes da Ooforectomia: tecidos moles (seta branca), tecido ósseo na transição metafisária-diafisária (seta preta), rima de osteoblastos (seta vermelha), osteócitos em compacto espaços (seta amarela). B). Após ooforectomia (30 dias): canais estendidos e lacunas em tempos vazios (sem osteócitos), osteoblastos vistos em surtos. C). Após o reimplante (60 dias): formação óssea cortical e trabecular contendo (seta), rima e canais de osteoblastos e grandes lacunas contendo osteócitos; Magnificação de 100x; Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.

Encontramos uma borda de osteoblastos e uma matriz hematopoiética no osso trabecular antes da ooforectomia. Posteriormente, o grupo a demonstrou uma irregularidade da trabécula, uma semana após a ooforectomia. Observamos uma



matriz hematopoiética um mês após o AO (FIGURA 12).

Figura 12 – Histologia óssea trabecular do Grupo A.

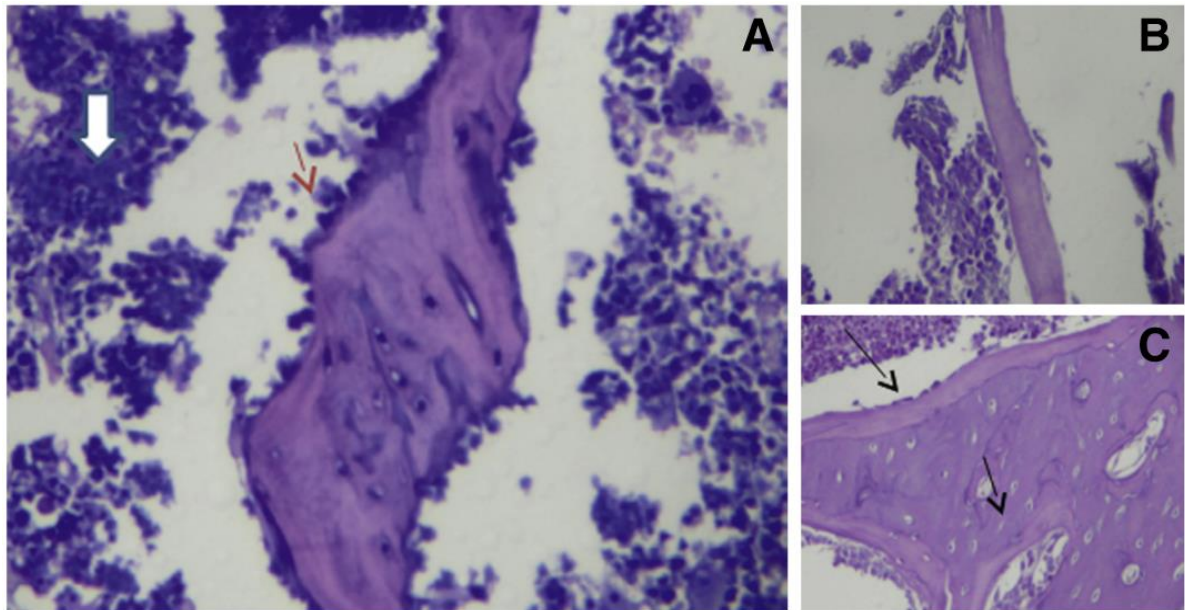


Fonte: Elaborado pelo autor (2013).

Grupo A (Grupo inicial): A) Antes da ooforectomia: rima dos osteoblastos (seta vermelha) e matriz hematopoiética (seta branca completa); B). Após ooforectomia (7 dias): irregularidade das trabéculas; C). Após o reimplante (37 dias): matriz hematopoiética; Magnificação de 100x; Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.

No grupo B, um mês após a ooforectomia, observamos canais e lacunas extensas ocasionalmente vazias (isto é, sem osteócitos) e focos de osteoblastos. No entanto, um mês após o ao, observamos a formação óssea trabecular contendo uma borda de osteoblastos, canais e grandes lacunas contendo osteócitos (FIGURA 13).

Figura 13 – Histologia óssea trabecular do Grupo B.



Fonte: Elaborado pelo autor (2013).

Grupo B (Grupo Tardio): A) Antes da ooforectomia: rima dos osteoblastos (seta vermelha) e matriz hematopoiética (seta branca completa); B). Após ooforectomia (30 dias): canais estendidos e lacunas, ocasionalmente vazias (sem osteócitos), osteoblastos vistos em surtos; C). Após o reimplante (60 dias): formação óssea trabecular contendo (seta), rima e canais de osteoblastos e grandes lacunas contendo osteócitos; Magnificação de 100x; Método de coloração: Hematoxilina e Eosina

Ao comparar o tempo de transplante, o grupo A apresentou espessura cortical ligeiramente melhorada, espessura trabecular e contagem de osteoblastos, mas essas alterações não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A criopreservação e autotransplante de tecido ovariano em mulheres jovens com câncer podem prevenir ou reduzir a osteoporose precoce e a insuficiência ovariana prematura induzida por drogas gonadotóxicas.

Usando os termos "criopreservação", "saúde óssea", "menopausa" e "metabolismo ósseo" em pesquisas no banco de dados da PubMed, Lilacs e Cochrane, não encontramos estudos publicados sobre os efeitos do autotransplante de tecido de ovário criopreservado no metabolismo ósseo.

Os estudos, com modelos animais, para osteopenia e osteoporose, evidenciam que, nos modelos de ratas ooforectomizadas, a perda óssea é gradual e irreversível, tornando-se claramente mensurável a partir dos primeiros dias. (JEE; YAO, 2001)

Neste estudo, as ratas foram ooforectomizadas bilateralmente e seus ovários foram criopreservados via vitrificação. As amostras de biópsia de tecido ósseo foram analisadas uma semana (grupo A) ou um mês (grupo B) após o AO. O enxerto foi bem-sucedido (apresentando folículos) na maioria das ratas.

A análise histológica dos parâmetros do osso cortical mostrou que, em geral, as medidas da qualidade óssea pioraram com uma queda de 70% do valor inicial após 7 dias de privação hormonal. e posterior restauração de cerca de 45% desse valor após a reimplantação do tecido ovariano. Ou seja, a espessura cortical óssea média um mês após o AO foi semelhante à da linha de base.

No entanto, este efeito não foi evidente para espessura trabecular, contagem de osteoblastos e para a deposição de osteóides.

Esses resultados demonstram que a ooforectomia e a consequente diminuição da produção de estradiol nos ovários têm potencial papel na redução dos valores dos parâmetros ósseos. Após o reimplante dos ovários com aquecimento vitrificado, a restauração da produção de hormônio sexual (estrogênio) nesses animais resultou em uma melhoria significativa dos valores dos parâmetros ósseos nesses animais. No entanto, não conseguimos medir com precisão os níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) porque os kits utilizados não eram sensíveis o suficiente para detectar variações nos níveis de FSH; assim, todos os resultados foram os mesmos. Nossos achados sugerem que o autotransplante do tecido do

ovário criopreservado pode normalizar o metabolismo ósseo em ratas.

Alguns estudos já forneceram evidências sobre as mudanças no metabolismo ósseo após a perda de hormônios ovarianos devido à ooforectomia (GALLAGHER, A. C.; CHAMBERS, T. J., 1995). Embora estes estudos tenham demonstrado claramente uma relação direta entre a duração da ausência hormonal e a diminuição dos parâmetros ósseos, resultando em osteopenia e osteoporose; eles não investigaram os efeitos hormonais sobre o metabolismo ósseo após o reimplante de ovários criopreservados.

A menopausa pode representar até 30-40% da vida de uma mulher e produz sequelas como a desmineralização pós-menopausa (isto é, osteoporose nos casos mais intensos), aumento do risco de doenças cardiovasculares, deficiências cognitivas, perda de qualidade de vida e desejo sexual (LOBO *et al.*, 2014). Esses achados evidenciam que o autotransplante do tecido do ovário criopreservado restaura a função hormonal e normaliza o metabolismo ósseo em ratas castradas. A qualidade do osso é monitorada clinicamente medindo a densidade mineral óssea; no entanto, informações adicionais, especialmente parâmetros histológicos, são necessárias para determinar com precisão a fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas (MCCREADIE; GOLDSTEIN, 2000).

A conexão entre hormônios sexuais e metabolismo ósseo está bem documentada. Portanto, a osteoporose pós-menopausa é principalmente atribuível ao aumento da reabsorção óssea de osteoclastos associados à deficiência de estrogênio. Modelos de animais deficientes em estrogênio e estudos em seres humanos mostraram viabilidade reduzida de osteócitos na osteoporose pós-menopausa. Como o estrogênio aumenta a apoptose dos osteoclastos maduros, o período de vida dos osteoclastos se prolonga à medida que os níveis de estrogênio diminuem (MCCREADIE; GOLDSTEIN, 2000). O estrogênio mostrou dobrar ou triplicar a taxa de apoptose de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*, um efeito aparentemente mediado por Gab (PARFITT *et al.*, 1996). Em contraste direto com seu efeito pró-apoptótico sobre os osteoclastos, o estrogênio exerce um efeito antiapoptótico sobre osteócitos. Em outras palavras, a perda de estrogênio compromete a viabilidade dos osteócitos. Em um estudo imunohistoquímico que avaliou a caspase-3 ativada como marcador de apoptose em camundongos adultos ooforectomizados, a perda de estrogênio aumentou a apoptose dos osteócitos, o que é necessário para ativar a reabsorção osteoclástica (HUGHES *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, os sintomas relacionados à menopausa foram tratados com terapia hormonal (TH). No entanto, a publicação de um relatório da *Women's Health Initiative* (WHI) na Califórnia em 2002 indicou uma associação entre TH e um risco aumentado de câncer de mama, o que convenceu muitas mulheres a interromper ou diminuir a posologia de TH. Embora vários autores tenham demonstrado posteriormente que a TH não aumenta significativamente o risco de câncer de mama e doenças cardiovasculares, a confiança na TH não foi totalmente restaurada. Quando a TH é limitada ao período de transição da menopausa (4-5 anos), muitas vezes simplesmente adia o início dos sintomas (EMERTON *et al.*, 2010). Portanto, as mulheres com menopausa prolongada (por exemplo, 30 anos) são susceptíveis de sentir sintomas independentemente da terapia (LOBO *et al.*, 2014).

Recentemente, Satpathy, Patra e Ahirwar (2015) descreveram o que eles acreditavam ser uma epidemia de osteoporose e pediram novas estratégias para a prevenção da osteoporose a longo prazo. Dez anos antes, uma meta-análise encontrou uma redução global de 27% nas fraturas vertebrais entre os usuários de estrogênio. Além disso, o estudo WHI (2002) de estrogênio-progestina relatou reduções de 33%, 29%, 35% e 24% na incidência de fraturas do quadril, do braço/pulso, vertebral e total, respectivamente, entre as mulheres atribuídas ao estrogênio mais a progestina em comparação com aqueles atribuídos ao placebo durante um período de avaliação de 5,6 anos. No entanto, apesar da eficácia temporária da terapia hormonal exógena, a criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano estão ganhando terreno como método alternativo para atrasar a menopausa (ANDERSEN; KRISTENSEN, 2015).

A criopreservação do tecido ovariano foi desenvolvida há mais de duas décadas. Esta técnica preserva a grande reserva endógena de folículos ováricos que, de outra forma, passaria por atresia e agora é utilizada para a preservação da fertilidade para mulheres que enfrentam tratamentos gonadotóxicos, potencialmente, esterilizantes e também pode ser usada para adiar a menopausa (HOVATTA *et al.*, 1997; SATPATHY; PATRA; AHIRWAR, 2015). Uma revisão dos desenvolvimentos tecnológicos nas técnicas de criopreservação e armazenamento para tecido ovariano foi recentemente publicada (RODRIGUEZ-WALLBERG; OKTAY, 2012). O tecido ovariano pode ser criopreservado quando uma mulher é jovem e depois transplantada após a menopausa para restaurar as funções ovarianas (ANDERSEN; KRISTENSEN, 2015).

Os ovários de uma menina recém-nascida contêm aproximadamente 2 milhões de folículos presentes em situação de repouso. Este pool de folículos protege fertilidade e ciclos menstruais desde a puberdade até a menopausa. Independentemente da idade, uma série de folículos de repouso são, continuamente, estimulados para crescer, mas apenas um folículo é selecionado para ovulação durante cada ciclo (HOVATTA *et al.*, 1997). Em média, as mulheres ovulam aproximadamente 400 a 500 vezes desde a puberdade até a menopausa; conseqüentemente, 99,9% dos folículos degeneram. Muitos desses "folículos desperdiçados" possuem a capacidade de desenvolvimento (para secreção de esteroides sexuais), mas não podem conter oócitos adequados para reprodução (GOSDEN, 2000). Conforme demonstrado pela reprodução assistida, esses folículos podem ser poupados da degeneração e continuar a crescer e secretar hormônios sexuais (BEHRE *et al.*, 2015).

Além disso, a fertilidade não diminui significativamente com a perda de um ovário. Uma mulher com um ovário produzirá aproximadamente 20% menos oócitos maduros em comparação com uma mulher com ambos os ovários após a estimulação ovariana, indicando que a atresia do folículo no ovário restante é reduzida e mais folículos sobrevivem ao estágio pré-ovulatório (PELOSI *et al.*, 2015). Em mulheres saudáveis, a perda de um ovário antecipa a idade de início da menopausa por apenas um ano devido ao enorme excedente de folículos. Em outras palavras, as mulheres normais experimentariam pouco ou nenhum efeito sobre a fertilidade ou a idade de início da menopausa após a remoção de fragmentos de tecido ovariano quando jovem.

Nossos resultados demonstram uma associação entre a atividade óssea e o reimplante de tecido de ovário criopreservado e contribuem com evidências potenciais dos benefícios do tecido de ovário criopreservado.

Uma possibilidade futura decorrente desses achados é a aplicação deste conceito à prática clínica.

## 7 CONCLUSÃO

A criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano auxiliam a melhora da qualidade óssea em ratas castradas.

O tecido ovariano criopreservado mantém suas características histológicas após o descongelamento e podem ser reimplantados no omento maior sem perder sua integridade morfológica.

Apesar da expressiva variação nos níveis hormonais em grupos submetidos a diferentes períodos de castração cirúrgica, não houve diferença estatisticamente significativa entre a variação dos níveis de estradiol. ( $p=0.819$ ).

Há a reversão dos efeitos histológicos ósseos decorrentes da privação do estradiol após autotransplante do tecido ovariano criopreservado.

## REFERÊNCIAS

- ABUSIEF, M. E. et al. Relationship between reproductive history, anthropometrics, lifestyle factors, and the likelihood of persistent chemotherapy-related amenorrhea in women with premenopausal breast cancer. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 1, p. 154-159, 2012. ISSN 0015-0282.
- ANDERSEN, C. Y.; KRISTENSEN, S. G. Novel use of the ovarian follicular pool to postpone menopause and delay osteoporosis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 31, n. 2, p. 128-131, 2015. ISSN 1472-6483.
- ANDERSON, R. et al. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. **Human Reproduction**, v. 21, n. 10, p. 2583-2592, 2006. ISSN 1460-2350.
- ANDERSON, R.; WALLACE, W.; BAIRD, D. Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 681-689, 2008. ISSN 1470-1626.
- ANDERSON, R. A.; CAMERON, D. A. Pretreatment serum anti-müllerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. **The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1336-1343, 2011. ISSN 0021-972X.
- AUBARD, Y. et al. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen–thawed ovarian cortex in sheep. **Human Reproduction**, v. 14, n. 8, p. 2149-2154, 1999. ISSN 1460-2350.
- AUBARD, Y. et al. Ovarian tissue cryopreservation and gynecologic oncology: a review. **European journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 97, n. 1, p. 5-14, 2001. ISSN 0301-2115.
- BALSARA, S. L. et al. Pediatric mortality in males versus females in the United States, 1999–2008. **Pediatrics**, v. 132, n. 4, p. 631-638, 2013. ISSN 0031-4005.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 6. ed. London: Churchill Livingstone, 2008. 725 p. ISBN 0443102791.
- BEHRE, H. M. et al. Randomized trial comparing luteinizing hormone supplementation timing strategies in older women undergoing ovarian stimulation. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 31, n. 3, p. 339-346, 2015. ISSN 1472-6483.
- BINES, J.; OLESKE, D. M.; COBLEIGH, M. A. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 5, p. 1718-1729, 1996. ISSN 0732-183X.
- BINKLEY, N.; KRUEGER, D. Combination therapy for osteoporosis: considerations and controversy. **Current rheumatology Reports**, v. 7, n. 1, p. 61-65, 2005. ISSN 1523-3774.



BLUMENFELD, Z. Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role of inhibin-A and-B as markers. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1, p. 93-105, 2002. ISSN 0303-7207.

BLUMENFELD, Z.; HAIM, N. Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. **Annals of Medicine**, v. 29, n. 3, p. 199-206, 1997. ISSN 0785-3890.

BORTOLETTO, P. et al. Practices and attitudes regarding women undergoing fertility preservation: a survey of the National Physicians Cooperative. **Journal of Adolescent and Young Adult Oncology**, v. 6, n. 3, p. 444-449, 2017. ISSN 2156-5333.

BURGER, H. G. et al. Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 603-612, 2008. ISSN 1072-3714.

BUTLER, L.; SANTORO, N. The reproductive endocrinology of the menopausal transition. **Steroids**, v. 76, n. 7, p. 627-635, 2011. ISSN 0039-128X.

CARTER, J. et al. Gynecologic cancer treatment and the impact of cancer-related infertility. **Gynecologic Oncology**, v. 97, n. 1, p. 90-95, 2005. ISSN 0090-8258.

CORNEY, R. H.; SWINGLEHURST, A. J. Young childless women with breast cancer in the UK: a qualitative study of their fertility-related experiences, options, and the information given by health professionals. **Psychooncology**, v. 23, n. 1, p. 20-26, 2014. ISSN 1099-1611.

DAVIS, S. R. et al. Understanding weight gain at menopause. **Climacteric**, v. 15, n. 5, p. 419-429, 2012. ISSN 1369-7137.

DE LORENZI, D. R. S.; BARACAT, E. C. Climatério e qualidade de vida. **Femina**, v. 33, n. 12, p. 899-903, 2005. ISSN 0100-7254.

DE LORENZI, D. R. S. et al. Fatores associados à qualidade de vida após menopausa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 312-7, 2006.

DE VOS, M.; SMITZ, J.; WOODRUFF, T. K. Fertility preservation in women with cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9950, p. 1302-1310, 2014. ISSN 0140-6736.

DECHERNEY, A. H. et al. Preserving fertility after cancer: what are our options? **Sexuality, Reproduction and Menopause**, v. 3, n. 2, p. 78-82, 2005. ISSN 1546-2501.

DEL MASTRO, L. et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 5, p. 675-683, 2014. ISSN 0305-7372.

DOLMANS, M. M. et al. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. **Blood**, v. 116, n. 16, p. 2908-

2914, 2010. ISSN 0006-4971.

DONNEZ, J. Introduction: fertility preservation, from cancer to benign disease to social reasons: the challenge of the present decade. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1467-1468, 2013. ISSN 0015-0282.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 8, p. 1188-1197, 2014. ISSN 1521-6934.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 8, p. 1167-1170, 2015. ISSN 1058-0468.

ELLISS-BROOKES, L. et al. Routes to diagnosis for cancer—determining the patient journey using multiple routine data sets. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 8, p. 1220, 2012.

EMERTON, K. et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 577-583, 2010. ISSN 8756-3282.

FREEMAN, M. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. **The Physiology of Reproduction**, p. 613-658, 1994.

GABITOVA, G.; BURKE, N. J. Improving healthcare empowerment through breast cancer patient navigation: a mixed methods evaluation in a safety-net setting. **BMC Health Services Research**, v. 14, n. 1, p. 407, 2014. ISSN 1472-6963.

GALLAGHER, A. C.; CHAMBERS, T. J.; TOBIAS, J. H. Distinct effects of ovarian transplantation and exogenous 17 beta-oestradiol on cancellous bone of osteopenic ovariectomized rats. **Eur J Endocrinol**, v. 133, n. 4, p. 483-8, Oct 1995. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7581974> >.

GHOSH, S. et al. Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on ovarian steroidogenic and folliculogenic activities in cyclophosphamide treated albino rats. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 221-225, 2001. ISSN 0890-6238.

GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1, p. 125-129, 2000. ISSN 0303-7207.

GREENBERG, M. L.; URBACH, S. L. Preserving the fertility of children with cancer. **Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 10, p. 532-532, 2006. ISSN 0025-729X.

GUILLEN, J. FELASA guidelines and recommendations. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 311-321, 2012. ISSN 1559-6109.

HALLING, A., PERSSON, G. R., BERGLUND, J., JOHANSSON, O., and RENVERT, S. (2005). Comparison between the Klemetti index and heel DXA BMD measurements in the diagnosis of reduced skeletal bone mineral density in the elderly. **Osteoporos. Int.** 16, 999–1003. doi: 10.1007/s00198-004-1796-x).

HARLOW, S. D. et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1159-1168, 2012. ISSN 0021-972X.

HARRISON, F. A.; CHAMBERS, S. G.; GREEN, E. A. Autotransplantation of the ovary to the neck in the sow: normal cyclic activity and plasma hormone levels. **Journal of Endocrinology**, v. 83, p. 46-50, 1980

HEATH, J. A.; STERN, C. J. Fertility preservation in children newly diagnosed with cancer: existing standards of practice in Australia and New Zealand. **Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 10, p. 538, 2006. ISSN 0025-729X.

HERNLUND, E., SVEDBOM, A., IVERGÅRD, M., COMPSTON, J., COOPER, C., STENMARK, J., et al. (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch. Osteoporos.* 8:136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.

HIRSHFIELD, A. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 6, p. 1157-1162, 1991. ISSN 0006-3363.

HOVATTA, O. et al. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 12, n. 5, p. 1032-1036, 1997. ISSN 1460-2350.

HSU, W. L. et al. Balance control in elderly people with osteoporosis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 113, n. 6, p. 334-339, 2014. ISSN 0929-6646.

HUGHES, D. E. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . **Nature Medicine**, v. 2, n. 10, p. 1132-1136, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Aumento da expectativa de vida**. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=464](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=464)>. Acesso em: 29 out. 2017a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER.. **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/pdf/mortalidade-criancas-adolescentes-adultos-jovens-0-29-anos.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2017b.

JANKOWSKA, K. Premature ovarian failure. **Menopause review [przegląd menopauzalny]**, v. 16, n. 2, p. 51, 2017.

JEE, W.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **J Musculoskelet neuronal interact**, v. 1, n. 3, p. 193-207, 2001.

JENSEN, A. K. et al. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 3, p. 325-336, 2017. ISSN 1058-0468.

JOHNELL, O., and KANIS, J. A. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporos. Int.** 17, 1726. doi: 10.1007/s00198-006-0172-4).

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-191, 1991. ISSN 0169-6009.

KAWAMURA, K. et al. Ovary transplantation: to activate or not to activate. **Human Reproduction**, v. 30, n. 11, p. 2457-2460, 2015. ISSN 1460-2350.

KIM, S. S.; BATTAGLIA, D. E.; SOULES, M. R. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 6, p. 1049-1056, 2001. ISSN 0015-0282.

KOCH, J.; LEDGER, W. Ovarian stimulation protocols for onco-fertile patients. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 2, p. 203-206, 2013. ISSN 1058-0468.

LAMBERTINI, M.; GINSBURG, E. S.; PARTRIDGE, A. H. Update on fertility preservation in young women undergoing breast cancer and ovarian cancer therapy. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 27, n. 1, p. 98-107, 2015. ISSN 1040-872X.

LANE, N. E. et al. Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 206-214, 1999. ISSN 1523-4681.

LOBO, R. et al. Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, v. 17, n. 5, p. 540-556, 2014. ISSN 1369-7137.

LOREN, A. W. et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 19, p. 2500-2510, 2013. ISSN 0732-183X.

LUNARDI, F. O. et al. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. **Cell and Tissue Research**, v. 362, n. 1, p. 241-251, 2015. ISSN 0302-766X.

MALLUCHE, H. H; FAUGERE, M.-C. **Atlas of mineralized bone histology**. 1. ed. Basel: Karger. 1986. 136 p.

MALTARIS, T. et al. Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 515-533, 2006. ISSN 1745-7262.

MALTARIS, T. et al. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 130, n. 2, p. 148-155, 2007. ISSN 0301-2115.

MARHHOM, E.; COHEN, I. Fertility preservation options for women with malignancies. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 62, n. 1, p. 58-72, 2007. ISSN 0029-7828.

MASUHARA, M. et al. A relation between osteoclastogenesis inhibition and membrane-type estrogen receptor GPR30. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 389-394, 2016. ISSN 2405-5808.

MAUNSELL, E. et al. Quality of life among long-term adolescent and adult survivors of childhood cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 16, p. 2527-2535, 2006. ISSN 0732-183X.

MCCREADIE, B. R.; GOLDSTEIN, S. A. Biomechanics of fracture: is bone mineral density sufficient to assess risk? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 12, p. 2305-2308, 2000. ISSN 1523-4681.

MESSIER, V. et al. Menopause and sarcopenia: a potential role for sex hormones. **Maturitas**, v. 68, n. 4, p. 331-336, 2011. ISSN 0378-5122.

MOORE, H. C. et al. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 10, p. 923-932, 2015. ISSN 0028-4793.

NORBERTO, G. C. **Atlas de Anatomia Animal**. São Paulo: Departamento de Fisiologia; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo. 2002.

NOYES, N.; PORCU, E.; BORINI, A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 769-776, 2009. ISSN 1472-6483.

OKTAY, K.; SÖNMEZER, M. Fertility preservation in gynecologic cancers. **Current Opinion in Oncology**, v. 19, n. 5, p. 506-511, 2007. ISSN 1040-8746.

OKTAY, K. et al. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. **The Oncologist**, v. 12, n. 9, p. 1055-1066, 2007. ISSN 1083-7159.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo**. 2017. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo>>. Acesso em: 1 nov 2017

PARFITT, A. et al. Theoretical perspective: A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 2, p. 150-159, 1996. ISSN 1523-4681.

PELOSI, E. et al. Dynamics of the ovarian reserve and impact of genetic and epidemiological factors on age of menopause. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 5, p. 130, 1-9, 2015. ISSN 0006-3363.

PENTHEROUDAKIS, G.; PAVLIDIS, N. Late toxicity in survivors from adolescent cancers. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 7, p. 656-663, 2007. ISSN 0305-7372.

PINTO, C. M. H. **Atlas Anatômico de rato**. Santa Catarina: CFS/CCB/Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

POLI, M. E.; SCHWANKE, C. H. A.; CRUZ, I. B. M. A menopausa na visão gerontológica. **Scientia Medica**, v. 20, n. 2, 2010. ISSN 1806-5562.

PRASATH, E. et al. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. **Human Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 276-278, 2013. ISSN 1460-2350.

PRIOR, J. et al. Estrogen-progestin therapy causes a greater increase in spinal bone mineral density than estrogen therapy-a systematic review and meta-analysis of controlled trials with direct randomization. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 17, n. 3, p. 146, 2017.

RAY, N., CHAN, J., THAMER, M., and MELTON, L. J. III. (1997). Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. **J. Bone Miner. Res.** 12, 24–35. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.1.24

RIGGS, B. L. et al. Effect of sex hormones on bone in primary osteoporosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 6, p. 1065, 1969.

ROCCA, W. A.; GROSSARDT, B. R.; SHUSTER, L. T. Oophorectomy, estrogen, and dementia: a 2014 update. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1, p. 7-12, 2014. ISSN 0303-7207.

RODRIGUEZ-WALLBERG, K. A.; OKTAY, K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 26, n. 3, p. 391-405, 2012. ISSN 1521-6934.

ROMAO, R. L.; LORENZO, A. J. Fertility preservation options for children and adolescents with cancer. **Canadian Urological Association Journal**, v. 11, n. 1-2Suppl1, p. S97, 2017.

ROSNER, Bernard. **Fundamentals of biostatistics**. 7. ed. Boston: Brooks/Cole 2011. 655 p.

SALAMA, M. et al. Female fertility loss and preservation: threats and opportunities. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 3, p. 598-608, 2012. ISSN 1569-8041.

SANADA LS. et al. Association of chronic diabetes and hypertension in sural nerve morphometry: an experimental study. *Diabetol Metab Syndr.* 2015;7:9.

SANTOS, L. M. et al. Síndrome do climatério e qualidade de vida: uma percepção das mulheres nessa fase da vida. **Revista APS**, v. 10, n. 1, p. 20-26, 2007.

SATPATHY, S.; PATRA, A.; AHIRWAR, B. Experimental techniques for screening of antiosteoporotic activity in postmenopausal osteoporosis. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 4, p. 251-266, 2015. ISSN 1553-3840.

SHULMAN, L. N. et al. Breast cancer in developing countries: opportunities for improved survival. **Journal of Oncology**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8450.

SILVA, J.M. et al. Histological study of rat ovaries cryopreserved by vitrification or slow freezing and reimplanted in the early or late postmenopausal stage. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 299-305, 2014. ISSN 0102-8650.

SKLAR, C. A. et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 13, p. 890-896, 2006. ISSN 1460-2105.

SÖNMEZER, M.; OKTAY, K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. **The Oncologist**, v. 11, n. 5, p. 422-434, 2006. ISSN 1083-7159.

SPEECHLEY, K. N. et al. Health-related quality of life among child and adolescent survivors of childhood cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 16, p. 2536-2543, 2006. ISSN 0732-183X.

SPEROFF, T. et al. A risk-benefit analysis of elective bilateral oophorectomy: effect of changes in compliance with estrogen therapy on outcome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, n. 1, p. 165-174, 1991. ISSN 0002-9378.

STOCKTON, D. et al. Retrospective study of reasons for improved survival in patients with breast cancer in East Anglia: earlier diagnosis or better treatment? **BMJ**, v. 314, n. 7079, p. 472, 1997. ISSN 0959-8138.

STOOP, D.; COBO, A.; SILBER, S. Fertility preservation for age-related fertility decline. **The Lancet**, v. 384, n. 9950, p. 1311-1319, 2014. ISSN 0140-6736.

THOMPSON, D. et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4, p. S125-S133, 1995. ISSN 8756-3282.

TUCKER, M.; MORTON, P.; LIEBERMANN, J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 113, p. S24-S27, 2004. ISSN 0301-2115.

TURAN, V.; OKTAY, K. Sexual and fertility adverse effects associated with chemotherapy treatment in women. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 6, p. 775-783, 2014. ISSN 1474-0338.

URRUTICOECHEA, A. et al. Ovarian protection with goserelin during adjuvant chemotherapy for pre-menopausal women with early breast cancer (EBC). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 110, n. 3, p. 411-416, 2008. ISSN 0167-6806.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 609-614, 2002. ISSN 1519-6984.

WALLACE, W. H.; ANDERSON, R.; BAIRD, D. Preservation of fertility in young women treated for cancer. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 5, p. 269-270, 2004. ISSN 1470-2045.

WANG, X. et al. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 527-535, 2009. ISSN 1470-1626.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes**. Geneva: World Health Organization, 2007. ISBN 9241547111.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2002. 180 p. ISBN 9241545577.

WORLD HEALTH ORGANIZATION study group. Assessment of fracture risk and its application to screen for postmenopausal osteoporosis. **WHO technical report series 1994; 843.**)

WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, n. 3, p. 321-333, 2002.

XIONG, Q. et al. Proteomic analysis of estrogen-mediated signal transduction in osteoclasts formation. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. ISSN 2314-6133.



## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 79/2012, sobre o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA EM RATAS MENOPAUSADAS INDUZIDAS POR OOFORECTOMIA APÓS AUTO IMPLANTE OVARIANO CRIOPRESERVADO**”, de responsabilidade de Luiz Gonzaga Porto Pinheiro e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

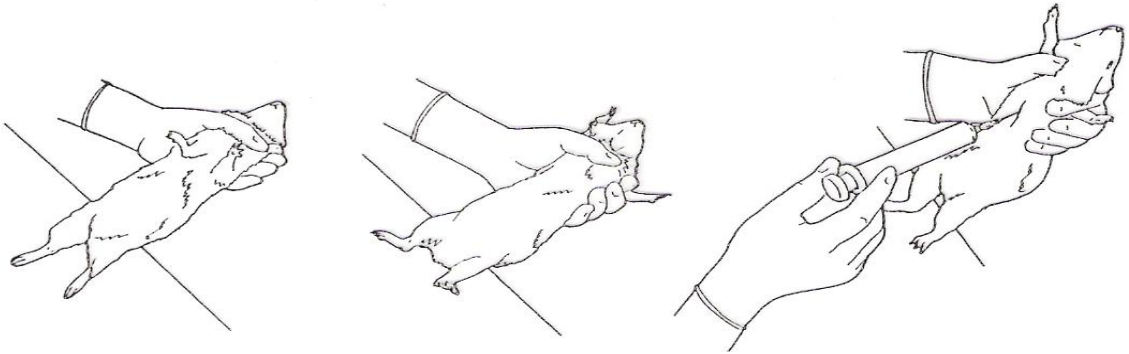
Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 07 de março de 2013

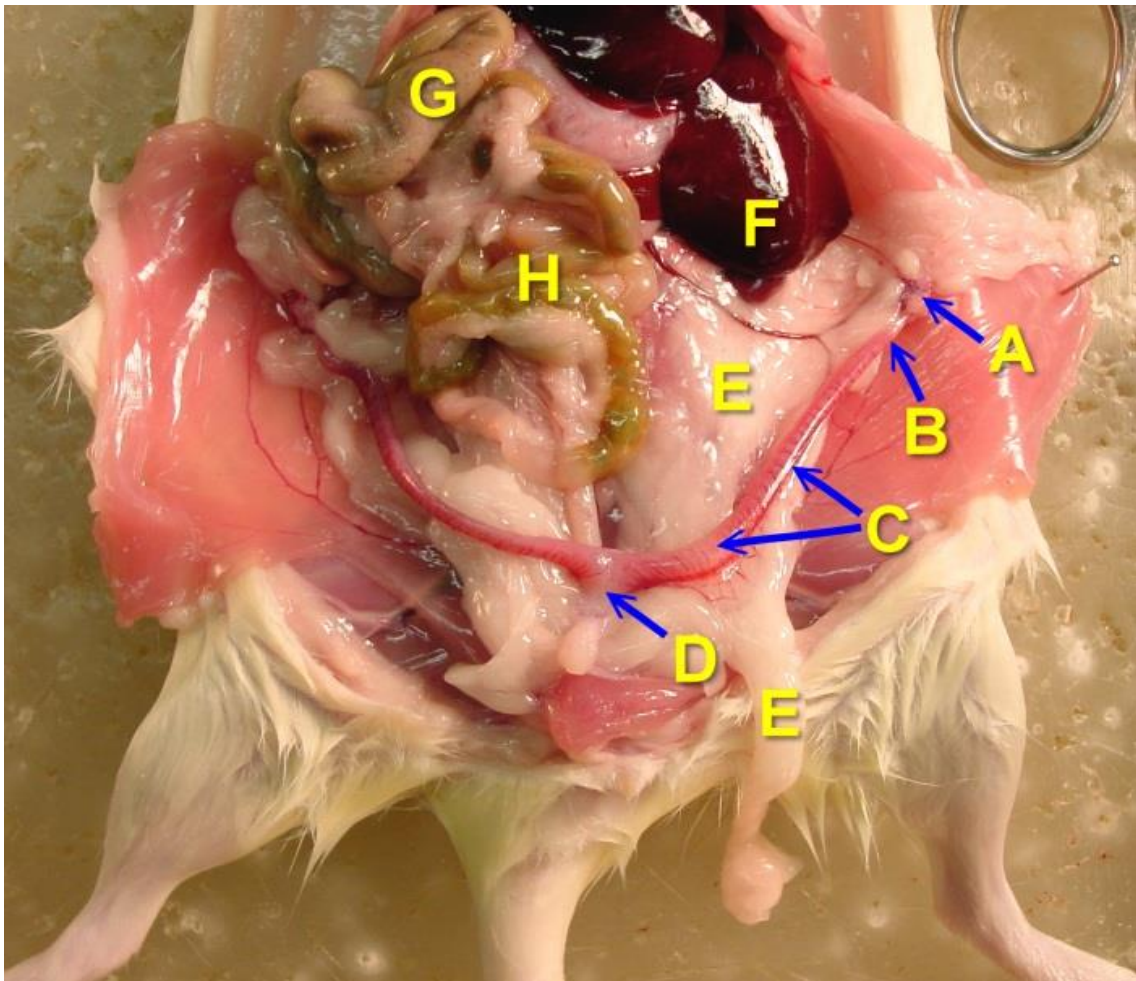
  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora da CEPADFF/FAMED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369

## ANEXO B- INJEÇÃO INTRAPERITONEAL EM RATA

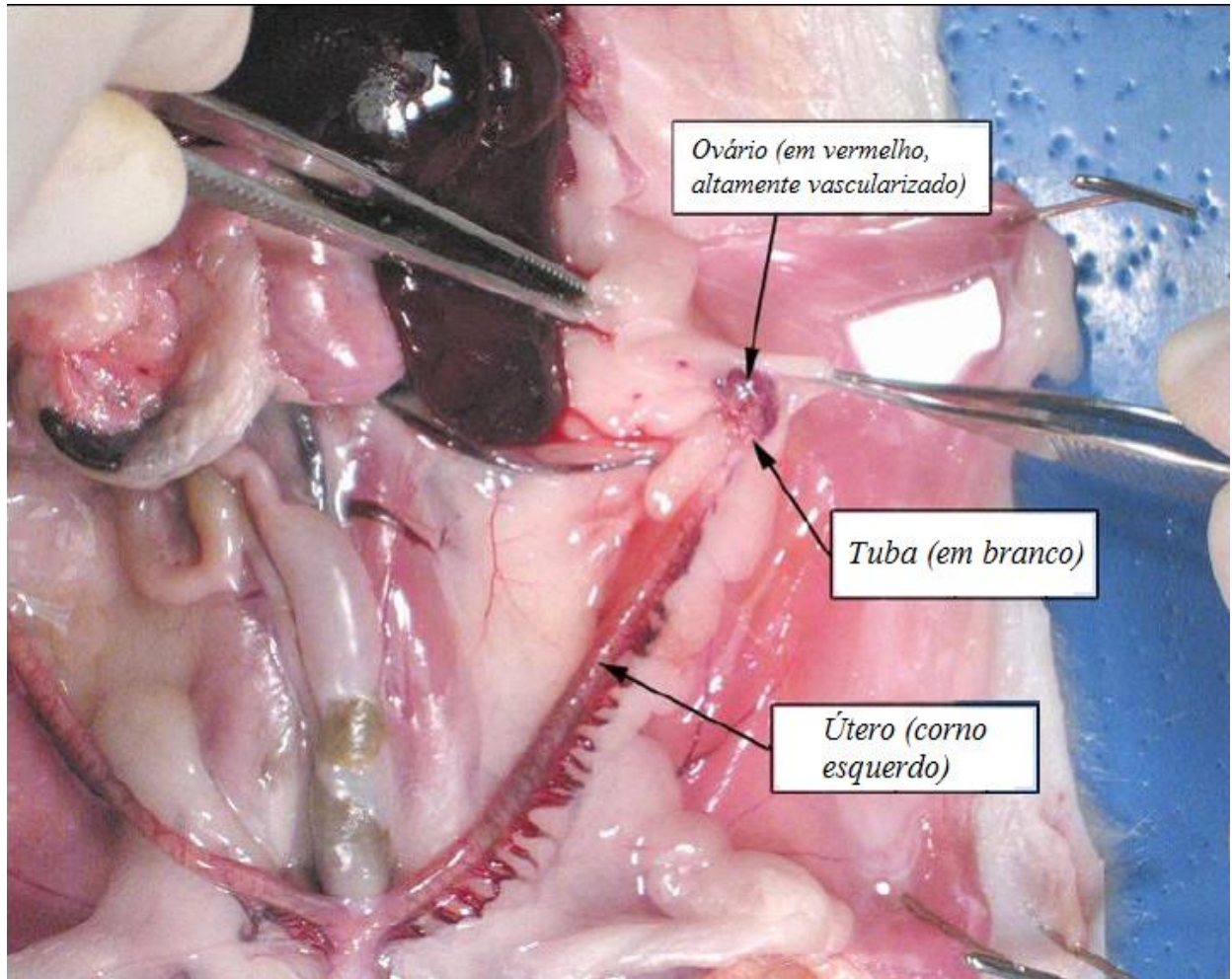


Fonte: Pinto (2008)

**ANEXO C- ANATOMIA DAS ESTRUTURAS DO ABDÔME E Pelve DA RATA**

Fonte: Pinto (2008).

A: útero; B: trompa uterina; C: útero (corno esquerdo); D: cérvix uterino; E: gordura abdominal; F: fígado; G: cécum; H: intestino delgado.

**ANEXO D- ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DE UMA RATA FÊMEA**

Fonte: Pinto (2008)

## ARTIGO

### ARTIGO SUBMETIDO PARA A REVISTA DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIÕES.

#### **7.1.1**      *Número do manuscrito 1577*

#### **7.1.2** *ARTIGO ORIGINAL*

---

### 7.2 TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO E RESTAURAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO EM RATAS CASTRADAS

#### *7.2.1.1 CRIOPRESERVED OVARIAN TISSUE TRANSPLANTATION AND RESTORATION OF BONE METABOLISM IN CASTRATED RATS*

Lígia Helena Ferreira Melo e **Silva**<sup>1</sup>, João Marcos de Meneses e **Silva**<sup>3</sup>, Mahmoud **Salama**<sup>9</sup>, Luiz Gonzaga Porto **Pinheiro**<sup>4</sup>, Franciele Osmarini **Lunardi**<sup>6</sup>, Paulo Goberlânio Barros da **Silva**<sup>5</sup>, Carlos Gustavo **Hirth**<sup>2</sup>, Igor Freitas de **Lucena**<sup>7</sup>, Glauco Jorge da Costa **Gomes**<sup>8</sup>, José Alberto Dias **Leite**<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Ginecologia - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará, Patologia - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Cirurgia - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>4</sup>Maternidade Escola Assis Chateaubriand, Departamento de Ginecologia - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>5</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Odontologia - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>6</sup>Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>7</sup>Unichristus, Faculdade de Medicina Unichristus - Fortaleza - Ceará - Brasil

<sup>8</sup>Hospital São Carlos, Hospital São Carlos - Fortaleza - Ceará - Brasil

ªCologne University, Departamento de Medicina Reprodutiva e Endocrinologia - Cologne  
- Cologne - Alemanha

---

## RESUMO

A criopreservação de tecido ovariano restaura fertilidade, mas não há artigos publicados abordando seu uso sobre o metabolismo ósseo. **Objetivos:** Este estudo tem como objetivos avaliar os níveis de estradiol e o efeito ósseo de tecido ovariano após vitrificação e reimplantação em ratas castradas. **Métodos:** Realizado experimento em 27 ratas com idade entre 11 e 12 semanas e pesando 200-300g. Todos os animais foram submetidos à ooforectomia bilateral e o ovário foi criopreservado. O autotransplante ocorreu em dois períodos de acordo o tempo de castração: após 1 semana (grupo A, n = 8) ou após 1 mês (grupo B, n = 19). Mensurações de estradiol sérico e análise histológica de ovário e tibia foram feitos: antes e após o período de ooforectomia (precoce ou tardio) e um mês após o reimplante. **Resultados:** Nos grupos A e B, as espessuras corticais médias da tibia foram  $0,463 \pm 0,14\text{mm}$  (média  $\pm$  DP) na linha de base,  $0,360 \pm 0,14\text{mm}$  após ooforectomia e  $0,445 \pm 0,17\text{mm}$  em 1 mês após o reimplante ( $p < 0,005$ ). As médias trabeculares foram  $0.050 \pm 0,08\text{mm}$  (média  $\pm$  DP) na linha de base,  $0,022 \pm 0,08\text{mm}$  após ooforectomia e  $0.049 \pm 0,032\text{mm}$  em 1 mês após o reimplante ( $p < 0,005$ ).

**Conclusões:** Não houve diferença estatística entre a variação do estradiol entre os dois grupos de estudo ( $p=0.819$ ).

Evidenciou-se que o transplante de tecido ovariano criopreservado restabeleceu os parâmetros ósseos. Estes resultados sugerem que a reimplantação ovariana em mulheres pode apresentar os mesmos efeitos benéficos sobre o metabolismo ósseo.

**DESCRITORES:** Menopausa. Osteoporose Pós-Menopausa. Estrogênios. Insuficiência Ovariana Primária

## ABSTRACT

Cryopreservation of ovarian tissue restores fertility, but there are no published articles addressing its use on bone metabolism. **Objectives:** This study aims to evaluate estradiol levels and the bone effect of ovarian tissue after vitrification and reimplantation in castrated rats. **Methods:** Experiment was performed in 27 rats aged 11 to 12 weeks and weighing 200-300g. All animals were submitted to bilateral oophorectomy and the ovary was cryopreserved. Autotransplantation occurred in two periods according to castration time: after 1 week (group A, n = 8) or after 1 month (group B, n = 19). Serum estradiol measurements and histological analysis of ovary and tibia were made: before and after the oophorectomy period (early or late) and one month after reimplantation. **Results:** In groups A and B, mean cortical thickness of tibia was  $0.463 \pm 0.14$  mm (mean  $\pm$  SD) at baseline,  $0.360 \pm 0.14$  mm after oophorectomy and  $0.445 \pm 0.17$  mm at 1 month post reimplantation ( $p < 0.005$ ). The trabecular averages were  $0.050 \pm 0.08$  mm (mean  $\pm$  SD) at baseline,  $0.022 \pm 0.08$  mm after oophorectomy and  $0.049 \pm 0.032$  mm at 1 month after replantation ( $p < 0.005$ ).

**Conclusions:** There was no statistical difference between the estradiol variation between the two study groups ( $p = 0.819$ ).

It was evidenced that the cryopreserved ovarian tissue transplantation restored the bone parameters. These results suggest that ovarian reimplantation in women may have the same beneficial effects on bone metabolism.

**KEY WORDS:** Menopause. Osteoporosis, Postmenopausal. Estrogens. Primary Ovarian Insufficiency

---

**Autor de Correspondência:** Lígia Helena Ferreira Melo e Silva

E-mail 1: draligiahelena@hotmail.com

E-mail 2: drjoaomarcosmeneses@hotmail.com

Fonte de financiamento: Não

Conflito de interesses: Não

É Ensaio Clínico? Não

Número do comitê de ética: 79/2012.

## Conteúdo

### *7.2.1.1.1 Introdução*

---

Muitas estratégias foram desenvolvidas para prevenir a perda de fertilidade em mulheres jovens e meninas submetidas a tratamentos anticancerígenos gonadotóxicos porque isso melhora significativamente as taxas de sobrevivência para a maioria dos cânceres em 80% dos casos <sup>1</sup>. Várias opções estão disponíveis, incluindo a criopreservação de embriões, oócitos <sup>2,3</sup> e tecido ovariano, respectivamente e autotransplante <sup>4</sup>.

O envelhecimento do ovário e os tratamentos citotóxicos são as causas mais comuns de perda de fertilidade nas mulheres. De acordo com relatos recentes, 700.000 mulheres nos Estados Unidos e 300.000 mulheres no Brasil são diagnosticadas com câncer todos os anos. Aproximadamente 8% dessas mulheres têm menos de 40 anos e correm o risco de perda de fertilidade após tratamentos anticancerígenos gonadotóxicos agressivos <sup>5</sup>.

De acordo com publicações recentes, a criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano podem ser usados para restaurar a fertilidade em pacientes com câncer, em pacientes que não respondem aos tratamentos convencionais de maneira adequada e às pacientes com insuficiência ovariana prematura <sup>6,7</sup>.



Embora experimental, a criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano resultaram no nascimento de mais de 86 bebês saudáveis em todo o mundo <sup>8</sup> com uma taxa de natalidade viva de aproximadamente 25% por transplante <sup>5</sup>.

Uma das consequências da falha ovariana natural ou induzida é a osteoporose, caracterizada pela perda de massa óssea e densidade mineral, aumentando assim o risco de fratura óssea. A osteoporose é uma importante complicação da velhice em mulheres e está fortemente associada à deficiência dos hormônios sexuais, mas também pode ser causada por alcoolismo ou tratamento com doses elevadas de corticosteroides <sup>9</sup>. Nos Estados Unidos, a osteoporose causa aproximadamente 2 milhões de fraturas anualmente, incluindo 547 000 fraturas vertebrais, 300 mil fraturas de quadril e 135 mil fraturas pélvicas <sup>10,11</sup>.

Para estudar agentes capazes de preservar o metabolismo ósseo e prevenir a osteoporose, diversos modelos animais têm sido utilizados. De acordo com as diretrizes da Food and Drug Administration (FDA), estudos de metabolismo ósseo com base em modelos de ratos devem incluir avaliações da tíbia proximal, fêmur distal ou vértebras lombares <sup>12</sup>. O rato ooforectomizado fornece um excelente modelo animal pré-clínico que descreve com precisão as características clínicas importantes do esqueleto humano quadro de hipostrogenismo e pode ser usado para examinar respostas a agentes terapêuticos <sup>13</sup>.

O desenvolvimento específico do sítio de osteopenia / osteoporose esponjosa em ratos ooforectomizados é uma das respostas biológicas mais reprodutíveis na pesquisa esquelética <sup>14</sup>. Após a ooforectomia, ocorre a perda rápida de massa óssea esponjosa e da força óssea e, em seguida, prossegue-se uma taxa mais lenta de perda para enfim alcançar uma fase estável da massa óssea após 90 dias. As características desta perda óssea imitam as alterações ósseas após ooforectomia ou menopausa em humanos <sup>15</sup>.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos do autotransplante de tecido ovariano aquecido, após vitrificação, no metabolismo ósseo em ratas previamente ooforectomizadas bilateralmente.

#### 7.2.1.1.2 Métodos

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Este estudo incluiu 27 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com idades entre 11 e 12 semanas e pesando 200 a 300 g, período no qual havia maturidade hormonal e encerramento da placa de crescimento distal da tíbia, que ocorre após 3 meses de idade <sup>14</sup>. Os animais foram alojados em gaiolas individuais em um ambiente controlado (ciclo circadiano, 22 ± 2 °C, umidade constante e comida e água *ad libitum*). Todos os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, e arquivados sob a entrada número 79/2012



## Desenho Experimental

Um estudo experimental duplo-cego foi realizado em ratas adultas.

Para um modelo experimental com potência para o teste de 90% e um nível de significância de 0,05, considerando um desvio máximo de 0,2 (20%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,5 (50%), temos que o cálculo de amostra, deve ser de 4,36 animais, arredondando para o próximo número inteiro será de 5 animais por grupo. Em nosso estudo, utilizamos o número mínimo de 8 ratos no grupo A, respeitando esta regra com certa margem de segurança.

Foi realizada ooforectomia bilateral e os ovários extraídos foram criopreservados via vitrificação. Os ovários vitrificados foram então reimplantados para as ratas ooforectomizadas, quer uma semana (grupo A n = 8) ou um mês (grupo B, n = 19) após a ooforectomia. Foram realizados ensaios de estradiol sérico e análise histológica do tecido e da tibia antes da ooforectomia (parâmetros basais), no final do período da castração cirúrgica (castração cirúrgica) e um mês após o transplante (parâmetros de recuperação)

## Coleta de tecido ovariano e de tecido ósseo

Após 2h de jejum (para diminuir a quantidade de drogas necessárias administradas) realizou-se assepsia com uso de gase estéril e solução de Clorexidina (Riohex 0,2% Solução Clorexidina Aquosa Dermo Suave®) e tricotomia da região abdominal. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (40 mg/kg ou 5 mg/kg, respectivamente) no quadrante abdominal inferior direito, de acordo com as diretrizes da Federação de Associações de Ciência Animal de Laboratório<sup>16</sup>. Após efeito anestésico pleno, era injetada na região subcutânea do dorso do animal na quantidade de 10 ml de SF 0,9% para efeito de hidratação.

Então realizou-se a laparotomia exploradora, com exposição dos órgãos pélvicos e ooforectomia bilateral sendo os ovários foram dissecados, a fim de se retirar toda a gordura e todo o mesentério, e então fatiados em tamanho aproximado de 2 mm<sup>3</sup>.

Um ovário foi imediatamente submetido à análise histológica, enquanto o outro foi criopreservado por vitrificação (n = 27).

Finalmente, a parede abdominal foi suturada usando fio de nylon 5-0 em dois planos (o plano peritôneo-aponeurótico e a pele). No primeiro dia do pós-operatório, 120 mg/kg de acetaminofeno e 60 mg/kg de codeína foram administrados continuamente, por via oral, às ratas para reduzir a dor.

No procedimento foram usados: lupa cirúrgica (Lupa com Led®, Protécni Equipamentos, Araraquara, São Paulo, Brasil), microclampes vasculares de Acland, microclampes vasculares, material de sutura mononáilon 6-0, pinças de relojoeiro nº 3 e 5, tesouras curva e reta de microcirurgia e porta-agulhas Barraquier curvo.

A biópsia de tecido ósseo da parte tibial proximal da pata esquerda traseira também foi realizada.

Para tanto, após a anestesia, realizou-se a tricotomia da parte interna da coxa esquerda da rata com assepsia local. Realizou-se incisão de 1,5cm de comprimento com fácil retirada da pele em torno da coxa. Devido ao fato de a fáscia que recobre a musculatura desta área ser muito difícil de separar, divulsionou-se a musculatura dos músculos glúteo máximo e o bíceps femoral para visualização correta da musculatura profunda, (que não são revestidos de fáscia).

Uma vez exposta a musculatura profunda, divulsionou-se a musculatura com posterior exposição da parte proximal, anterior, cerca de 5,0 mm da inserção da tíbia.

A lesão óssea foi realizada com uma broca helicoidal de 2 mm de diâmetro acoplada a uma mini-broca (3i Implant Innovations Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA). com uma rotação de 12.000rpm e uma irrigação constante com solução salina.

A broca foi posicionada verticalmente e em uma posição perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso para penetrar no córtex, atingindo o canal medular profundo, mas sem atingir o lado contralateral. Em seguida, a pele foi suturada com monofilamento de nylon 3-0 (Shalon®) em pontos equidistantes.

#### Vitrificação de tecido ovariano

Após a excisão, os ovários (~2 mm<sup>3</sup>) foram dissecados para fora do tecido de gordura e mesentério, antes de serem seccionados em fragmentos de 2 mm<sup>3</sup>. Metade dos tecidos ovarianos foram submetidos a análise histológica, enquanto a outra metade foi criopreservada via vitrificação (n = 27). A vitrificação e o subsequente aquecimento foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Silva et al <sup>17</sup> anteriormente.

Resumidamente, os ovários foram inicialmente equilibrados em HEPES (Sigma-Aldrich / Merck) contendo 10% (v/v) de etilenoglicol e 10% (v/v) de DMSO durante 20min à temperatura ambiente (23 a 26 °C) e depois imerso em solução de vitrificação contendo 17% (v/v) de etilenoglicol, 17% (v/v) de DMSO e 0,75M de sacarose em HEPES durante 3min.

Os ovários foram então transferidos individualmente com solução de vitrificação mínima para a superfície de um cubo metálico flutuando em nitrogênio líquido. Os ovários vitrificados foram armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 30 a 60 min. Usando fórceps refrigerados, as amostras foram colocadas em crioviais refrigerados contendo nitrogênio líquido.

#### Aquecimento de tecido ovariano

Para descongelar o córtex ovariano, os criotubos foram removidos do vaso Dewar e mantidos à temperatura ambiente durante 2 min, seguido por imersão num banho de água a 37°C durante 2 minutos. Foi realizada então uma leve e suave agitação. Os conteúdos dos criotubos foram rapidamente esvaziados em placas de cultura com meio Leibovitz L - 15, e lavou-se 3 vezes com meio fresco para remover o crioprotetor residual antes do reimplante, de acordo com um protocolo adaptado de Lunardi *et al.* (2015) <sup>18</sup>. Cada amostra foi então submetida a um banho

de 3 a 5 min em soluções contendo meio essencial mínimo mais 10% de soro de vitelo fetal e concentrações decrescentes de sacarose (0,5M, 0,25M e 0,0M).

#### Autotransplante de tecido ovariano

Para comparar os efeitos precoce e tardio da castração cirúrgica, as ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos (A e B). O autotransplante de tecido ovariano vitrificado no omento maior foi realizado uma semana após a ooforectomia bilateral para o grupo A (n = 8) e um mês para o grupo B (n = 19) de acordo com o tempo em que o animal permaneceu sem os ovários.

Partes dos ovários foram implantadas no omento perto do estômago usando um ponto simples com uma sutura de nylon 4-0 sem anastomose vascular. Após o tratamento, o fechamento da parede abdominal foi realizado utilizando um fio de monofilamento de nylon 5-0 em dois planos: o músculo e a pele do peritônio-aponeurótico.

Um mês após a AO em ambos os grupos (A e B), realizou-se ooforectomia bilateral nas ratas. A cavidade abdominal foi aberta e os ovários transplantados foram identificados e avaliados macroscopicamente. O leito muscular também foi avaliado para avaliação de vascularização e possíveis adesões circundantes. Os enxertos foram posteriormente removidos e os animais foram submetidos a eutanásia com uma dose letal do anestésico anteriormente utilizado.

#### Parâmetros antes e depois do autotransplante de ovário

##### Análise Hormonal

##### Determinação do Estradiol

O nível sérico de estradiol foi medido para ambos os grupos (*Diagnostics Biochem Canada Inc.*, Sensibilidade do ensaio, 10 ng/mL) em vários pontos de tempo (antes da ooforectomia bilateral (nível basal), imediatamente antes do autotransplante (castração cirúrgica) e um mês após o autotransplante (reimplante). De acordo com o protocolo de nosso laboratório, foram colhidas amostras de sangue de 2,0 ml do plexo retro-orbital com o auxílio de um tubo de hematócrito capilar heparinizado. Após centrifugação do sangue a 2500 rpm durante 15 min, o plasma foi coletado e armazenado em um congelador para uso posterior em um ensaio hormonal. Foram utilizados kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (*Diagnostics Biochem Canada Inc.*, sensibilidade do ensaio, 10 ng/ml) para medir quantitativamente os níveis séricos de estrogênio.

##### Análise histológica

## **Tíbias**

Em ambos os grupos, as biópsias da tíbia foram coletadas antes da ooforectomia bilateral (linha de base), imediatamente antes do autotransplante (castração cirúrgica) e um mês após o autotransplante (reimplante). As amostras de biópsia da tíbia foram ressecadas, fixadas em 10% de formaldeído neutro tamponado e descalcificadas em solução de EDTA durante 2 semanas. Após a descalcificação, os espécimes foram submetidos ao processamento histológico de rotina e a incorporação de parafina. Posteriormente, secções de parafina de 5 µm da metáfise da tíbia foram desparafinadas e coradas com hematoxilina e eosina para exame de microscopia óptica <sup>19</sup>. A espessura trabecular e cortical, diâmetro do canal de Havers, contagem de osteoblastos e osteoclastos e presença de osteóide foram avaliadas.

A metodologia utilizada para tal foi:

- Medidas diretas da espessura trabecular, da espessura cortical e do diâmetro dos canais de Havers com uso de microscópio e régua milimetrada;
- Contagem de osteoblastos e osteoclastos na câmara de Neubauer 30 x 70 mm e 4 mm de espessura utilizando-se a técnica de zig-zag;
- Detecção simples de presença ou ausência de osteóides.

## **Ovários**

Em ambos os grupos, as amostras de ovários foram submetidas à análise histológica imediatamente após a ooforectomia e, imediatamente, após a eutanásia para avaliar as alterações histológicas nos ovários capturados com vitrificação transplantada. As amostras de tecido ovariano foram fixadas em paraformaldeído a 10% e incorporadas em parafina. As secções de 8 µm foram então preparadas para coloração com hematoxilina e eosina. As seções foram analisadas sob um microscópio de luz acoplado a um sistema de aquisição de imagem (LAZ 3.5, LEICA - modelos DM1000). O folículo qualitativo e as avaliações histológicas foram realizadas utilizando classificações convencionais <sup>20</sup>.

Para a realização deste protocolo foram utilizados os seguintes parâmetros de morfometria e histometria:

a) Contagem de número de folículos por amostra:

- Quantificação de folículos primordiais normais: definidos como aqueles que apresentam cavidade bem definida contendo um oócito com um núcleo;
- Quantificação de folículos primordiais atresícos: aqueles que apresentam células da granulosa em processo degenerativo e muitas vezes com aparente degeneração oocitária, de forma a apresentar ooplasma eosinofílico, contração e formação de grumos de cromatina ou membrana nuclear enrugada;

b) Presença ou não de corpo lúteo (CL).

#### Análise estatística

As análises estatísticas foram cegas e realizadas por especialista. Os achados foram analisados usando ANOVA e os testes t de amostras pareadas. Os graus de liberdade e o nível de significância estatística foram definidos em n-1 e 5% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. A tabela de Rosner <sup>21</sup> foi usada para referência.

As variáveis do estudo foram dicotômicas (presença/ausência). Os dados foram analisados com o teste exato de Fisher usando GraphPad Prism 5.0 e expressos como frequências e porcentagens absolutas. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

Para todas as variáveis estudadas, cada animal foi seu controle de forma a evitar possíveis erros com doenças prévias no animal. Por isso foram coletadas amostras antes de iniciados os procedimentos.

#### 7.2.1.1.3 Resultado (s)

---

## RESULTADOS

### Nível de estradiol plasmático

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a variação dos níveis de estradiol nos dois grupos de estudo ( $p=0.819$ ). Nos animais com menopausa precoce apesar da variação dos níveis basais ( $25.6\pm 0.8\text{ng/dL}$ ) para o pós-operatório imediato ( $19.0\pm 1.1\text{ng/dL}$ ) e pós-operatório de um mês ( $25.6\pm 3.9\text{ng/dL}$ ) não houve diferença significativa entre os três momentos de análise de estradiol ( $p=0.140$ ). Porém, o grupo com menopausa tardia apresentou uma redução significativa dos níveis de estradiol do pré-operatório ( $28.0\pm 1.1\text{ng/dL}$ ) para o pós-operatório imediato ( $19.7\pm 1.6\text{ng/dL}$ ) e recuperação dos níveis normais um mês após a cirurgia ( $25.8\pm 0.5\text{ng/dL}$ ) ( $p=0.001$ ).

### Enxerto ovariano

O enxerto foi bem-sucedido (presença de folículos) em 81,5% dos animais (grupo a:  $n = 7/8$ , 87%, grupo b:  $n = 15/19$ , 78,9%,  $p = 0,080$ ). No geral, aproximadamente 40,7% dos enxertos apresentaram folículos atréticos, 27,3% exibiram folículos atréticos e primordiais e 13,5% apresentaram folículos primordiais e o corpo lúteo. Nenhum enxerto de ovário foi encontrado nos restantes 18,3%; apenas esses animais foram encontrados em tecido inflamatório e cicatricial e/ou fibrose.

## Parâmetros ósseos

### Ossos corticais

Em geral, a espessura cortical média da tíbia foi de  $0,463 \pm 0,14$  mm na linha de base,  $0,354 \pm 0,14$  mm após ooforectomia e  $0,446 \pm 0,17$  mm no mês seguinte ao AO ( $p < 0,005$ ) (GRÁFICO 1).

O teste T pareado, adotando-se como grau de liberdade o valor (n-1) e tendo como "p" (probabilidade) o valor de 0,005, recebe valor de 2,977. Como em nossos cálculos encontramos o valor de 5,28, concluímos que:  $p < 0,005$ .

#### Osso trabecular

Além disso, a espessura trabecular média foi  $0,051 \pm 0,08$  mm na linha de base,  $0,021 \pm 0,08$  mm após ooforectomia e  $0,0448 \pm 0,032$  mm no mês seguinte ao AO ( $p < 0,005$ ) (GRÁFICO 2).

O teste T pareado, adotando-se como grau de liberdade o valor (n-1) e tendo como "p" (probabilidade) o valor de 0,05, recebe valor de 1,812. Como em nossos cálculos encontramos o valor de 0,472, concluímos que o p não foi significativo.

No osso cortical, antes da ooforectomia, observamos tecido mole e ósseo durante a transição metafisária-diáfise, bordas de osteoblastos e osteócitos em espaços compactos. A borda dos osteoblastos estava ausente no grupo A, uma semana após a ooforectomia. Um mês após o autotransplante, houve ausência de trabéculas (FIGURA 1).

No grupo B, 30 dias após a ooforectomia, observamos canais extensos ocasionalmente vazios (sem osteócitos) e focos de osteoblastos. No entanto, um mês após o AO, observamos a formação de osso cortical contendo uma borda de osteoblastos, canais e grandes lacunas contendo osteócitos (FIGURA 2).

Encontramos uma borda de osteoblastos e uma matriz hematopoiética no osso trabecular antes da ooforectomia. Posteriormente, o grupo A demonstrou uma irregularidade da trabécula, uma semana após a ooforectomia. Observamos uma matriz hematopoiética um mês após o AO (FIGURA 3).

No grupo B, um mês após a ooforectomia, observamos canais e lacunas extensas ocasionalmente vazias (isto é, sem osteócitos) e focos de osteoblastos. No entanto, um mês após o ao, observamos a formação óssea trabecular contendo uma borda de osteoblastos, canais e grandes lacunas contendo osteócitos (FIGURA 4).

Ao comparar o tempo de transplante, o grupo A apresentou espessura cortical ligeiramente melhorada, espessura trabecular e contagem de osteoblastos, mas essas alterações não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

Nossos resultados demonstram uma associação entre a atividade óssea e o reimplante de tecido de ovário criopreservado e contribuem com evidências potenciais dos benefícios do tecido de ovário criopreservado.

Uma possibilidade futura decorrente desses achados é a aplicação deste conceito à prática clínica.

#### 7.2.1.1.4 Discussão

---

### DISCUSSÃO

A criopreservação e autotransplante de tecido ovariano em mulheres jovens com câncer podem prevenir ou reduzir a osteoporose precoce e a insuficiência ovariana prematura induzida por drogas gonadotóxicas.

Usando os termos "criopreservação", "saúde óssea", "menopausa" e "metabolismo ósseo" em pesquisas no banco de dados da PubMed, Lilacs e Cochrane, não encontramos estudos publicados sobre os efeitos do autotransplante de tecido de ovário criopreservado no metabolismo ósseo.

Os estudos, com modelos animais, para osteopenia e osteoporose, evidenciam que, nos modelos de ratas ooforectomizadas, a perda óssea é gradual e irreversível tornando-se claramente mensurável a partir das primeiras semanas <sup>14</sup>.

Neste estudo, as ratas foram ooforectomizadas bilateralmente e seus ovários foram criopreservados via vitrificação. As amostras de biópsia de tecido ósseo e tibial foram analisadas uma semana (grupo A) ou um mês (grupo B) após o AO. O enxerto foi bem-sucedido na maioria das ratas. Em ambos os grupos, em comparação com os níveis basais, os níveis pós-OA de estradiol aumentaram em quase metade dos animais, sugerindo transplante bem-sucedido e recuperação da função ovariana endócrina. Além disso, a espessura cortical óssea média um mês após o AO foi semelhante à da linha de base. Além disso, a espessura cortical óssea média na linha de base foi semelhante à do mês após o AO.

A análise histológica mostrou que, em geral, as medidas da qualidade óssea pioraram após a ooforectomia bilateral e melhoraram após OA, sugerindo que os enxertos de tecido ovariano tiveram efeito no metabolismo ósseo. Este efeito foi evidente para espessura cortical, espessura trabecular e contagem de osteoblastos. No entanto, não foram observadas alterações para a deposição de osteóides. Observou-se melhora significativa para a espessura cortical e trabecular.

Esses resultados demonstram que a ooforectomia e a consequente diminuição da produção de estradiol nos ovários tem potencial papel na redução dos valores dos parâmetros ósseos desses animais. Após o reimplante dos ovários com aquecimento vitrificado, observamos a restauração da produção de hormônio sexual (estrogênio) nesses animais.

A restauração da produção hormonal, por sua vez, resultou em uma melhoria significativa dos valores dos parâmetros ósseos nesses animais. No entanto, não conseguimos medir com precisão os níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) porque os kits utilizados não eram sensíveis o suficiente para detectar variações nos

níveis de FSH; assim, todos os resultados foram os mesmos. Nossos achados sugerem que o autotransplante do tecido do ovário criopreservado pode restaurar a função hormonal e normalizar o metabolismo ósseo em ratas.

Alguns estudos já forneceram evidências sobre as mudanças no metabolismo ósseo após a perda de hormônios ovarianos devido à ooforectomia. Embora estes estudos tenham demonstrado claramente uma relação direta entre a duração da ausência hormonal e a diminuição dos parâmetros ósseos, resultando em osteopenia e osteoporose; eles não investigaram os efeitos hormonais sobre o metabolismo ósseo após o reimplante de ovários criopreservados.

A menopausa pode representar até 30-40% da vida de uma mulher e produz sequelas como a desmineralização pós-menopausa (isto é, osteoporose), aumento do risco de doenças cardiovasculares, deficiências cognitivas, perda de qualidade de vida e desejo sexual <sup>22</sup>. Esses achados sugerem que o autotransplante do tecido do ovário criopreservado pode restaurar a função hormonal e normalizar o metabolismo ósseo em ratas castradas. A qualidade do osso é monitorada clinicamente medindo a densidade mineral óssea; no entanto, informações adicionais, especialmente parâmetros histológicos, são necessárias para determinar com precisão a fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas <sup>23</sup>.

A conexão entre hormônios sexuais e metabolismo ósseo está bem documentada. Portanto, a osteoporose pós-menopausa é principalmente atribuível ao aumento da reabsorção óssea de osteoclastos associados à deficiência de estrogênio. Modelos de animais deficientes em estrogênio e estudos de seres humanos mostraram viabilidade de osteócitos reduzida na osteoporose pós-menopausa. Como o estrogênio melhora a apoptose dos osteoclastos maduros, o período de vida dos osteoclastos se prolonga à medida que os níveis de estrogênio diminuem <sup>23</sup>. O estrogênio mostrou dobrar ou triplicar a taxa de apoptose de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*, um efeito aparentemente mediado por Gab <sup>24</sup>. Em contraste direto com seu efeito pró-apoptótico sobre os osteoclastos, o estrogênio exerce um efeito antiapoptótico sobre osteócitos. Em outras palavras, a perda de estrogênio compromete a viabilidade dos osteócitos. Em um estudo imunohistoquímico que avaliou a caspase-3 ativada como marcador de apoptose em camundongos adultos ooforectomizados, a perda de estrogênio aumentou a apoptose dos osteócitos, o que é necessário para ativar a reabsorção osteoclástica <sup>25</sup>.

Tradicionalmente, os sintomas relacionados à menopausa foram tratados com terapia hormonal (TH). No entanto, a publicação de um relatório da *Women's Health Initiative* (WHI) na Califórnia em 2002 indicou uma associação entre TH e um risco aumentado de câncer de mama, o que convenceu muitas mulheres a interromper ou diminuir a posologia de TH. Embora vários autores tenham demonstrado posteriormente que a TH não aumenta significativamente o risco de câncer de mama e doenças cardiovasculares, a confiança na TH não foi totalmente restaurada. Quando a TH é limitada ao período de transição da menopausa (4-5 anos), muitas vezes simplesmente adia o início dos sintomas <sup>26</sup>. Portanto, as mulheres com menopausa prolongada (por exemplo, 30 anos) são susceptíveis de sentir sintomas independentemente da terapia <sup>22</sup>.

Recentemente, Satpathy, Patra e Ahirwar <sup>27</sup> descreveram o que eles acreditavam ser uma epidemia de osteoporose e pediram novas estratégias para a prevenção da osteoporose a longo prazo. Dez anos antes, uma meta-análise encontrou uma redução global de 27% nas fraturas vertebrais entre os usuários de estrogênio. Além



disso, o estudo WHI (2002) de estrogênio-progestina relatou reduções de 33%, 29%, 35% e 24% na incidência de fraturas do quadril, do braço/pulso, vertebral e total, respectivamente, entre as mulheres atribuídas ao estrogênio mais a progestina em comparação com aqueles atribuídos ao placebo durante um período de avaliação de 5,6 anos. No entanto, apesar da eficácia temporária da terapia hormonal exógena, a criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano estão ganhando terreno como método alternativo para atrasar a menopausa <sup>28</sup>.

A criopreservação do tecido ovariano foi desenvolvida há mais de duas décadas. Esta técnica preserva a grande reserva endógena de folículos ováricos que, de outra forma, passaria por atresia e agora é utilizada para a preservação da fertilidade para mulheres que enfrentam tratamentos gonadotóxicos, potencialmente, esterilizantes e também pode ser usada para adiar a menopausa <sup>27,29</sup>. Uma revisão dos desenvolvimentos tecnológicos nas técnicas de criopreservação e armazenamento para tecido ovariano foi recentemente publicada <sup>30</sup>. O tecido ovariano pode ser criopreservado quando uma mulher é jovem e depois transplantada após a menopausa para restaurar as funções ovarianas <sup>28</sup>.

Os ovários de uma menina recém-nascida contêm aproximadamente 2 milhões de folículos presentes em folículos de repouso. Esta loja de folículos protege fertilidade e ciclos menstruais desde a puberdade até a menopausa. Independentemente da idade, uma série de folículos de repouso são, continuamente, estimulados para crescer, mas apenas um folículo é selecionado para ovulação durante cada ciclo <sup>29</sup>. Em média, as mulheres ovulam aproximadamente 400 a 500 vezes desde a puberdade até a menopausa; conseqüentemente, 99,9% dos folículos degeneram. Muitos desses "folículos desperdiçados" possuem a capacidade de desenvolvimento (para secreção de esteroides sexuais), mas não podem conter oócitos adequados para reprodução <sup>31</sup>. Conforme demonstrado pela reprodução assistida, esses folículos podem ser poupados da degeneração e continuar a crescer e secretar hormônios sexuais <sup>32</sup>.

Além disso, a fertilidade não diminui significativamente com a perda de um ovário. Uma mulher com um ovário produzirá aproximadamente 20% menos oócitos maduros em comparação com uma mulher com ambos os ovários após a estimulação ovariana, indicando que a atresia do folículo no ovário restante é reduzida e mais folículos sobrevivem ao estágio pré-ovulatório <sup>33</sup>. Em mulheres saudáveis, a perda de um ovário avança a idade de início da menopausa por apenas um ano devido ao enorme excedente de folículos. Em outras palavras, as mulheres normais experimentam pouco ou nenhum efeito sobre a fertilidade ou a idade de início da menopausa após a remoção do tecido ovariano quando jovem.

#### 7.2.1.1.5 Conclusão

---

### CONCLUSÃO

A criopreservação e o autotransplante do tecido ovariano auxiliam a melhora da qualidade óssea em ratas castradas.

Apesar da expressiva variação nos níveis hormonais em grupos submetidos a diferentes períodos de castração cirúrgica, não houve diferença estatisticamente significativa entre a variação dos níveis de estradiol. ( $p=0.819$ ).

Há a reversão dos efeitos histológicos ósseos decorrentes da privação do estradiol após autotransplante do tecido ovariano criopreservado.

#### 7.2.1.1.6 Referências

---

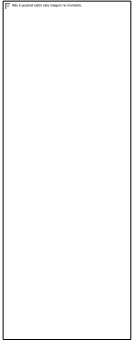
1. Romao RL, Lorenzo AJ. Fertility preservation options for children and adolescents with cancer. *Can Urol Assoc J.* 2017;11(1-2Suppl1):S97-S102.
2. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013;31(19):2500-10.
3. Koch J, Ledger W. Ovarian stimulation protocols for onco-fertility patients. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(2):203-6.
4. Bortoletto P, Confino R, Smith BM, Woodruff TK, Pavone ME. Practices and Attitudes Regarding Women Undergoing Fertility Preservation: A Survey of the National Physicians Cooperative. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 2017.
5. Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L. Female fertility loss and preservation: threats and opportunities. *Ann Oncol.* 2013;24(3):598-608.
6. Kawamura K, Cheng Y, Sun YP, Zhai J, Diaz-Garcia C, Simon C, et al. Ovary transplantation: to activate or not to activate. *Hum Reprod.* 2015;30(11):2457-60.
7. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(8):1167-70.
8. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(3):325-36.
9. Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-müllerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1336-43.

10. Hsu WL, Chen CY, Tsauo JY, Yang RS. Balance control in elderly people with osteoporosis. (0929-6646 (Print)).
11. Xiong Q, Tang P, Gao Y, Zhang L, Ge W. Proteomic Analysis of Estrogen-Mediated Signal Transduction in Osteoclasts Formation. *Biomed Res Int.* 2015;2015:596789.
12. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995;17(4 Suppl):125S-33S.
13. Lane NE, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat. *J Bone Miner Res.* 1999;14(2):206-14.
14. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(3):193-207.
15. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15(3):175-91.
16. Guillen J. FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012;51(3):311-21.
17. Silva JM, Pinheiro LG, Leite JA, Melo LH, Lunardi FO, Barbosa Filho RC, et al. Histological study of rat ovaries cryopreserved by vitrification or slow freezing and reimplanted in the early or late postmenopausal stage. *Acta Cir Bras.* 2014;29(5):299-305.
18. Lunardi FO, Chaves RN, de Lima LF, Araújo VR, Brito IR, Souza CE, et al. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. *Cell Tissue Res.* 2015;362(1):241-51.
19. H.H M, M.-C F. *ATLAS OF MINERALIZED BONE HISTOLIGY.* 1 edition ed1986. 136 p.
20. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques.* 6th ed. ed. [Edinburgh]: Churchill Livingstone; 2008.
21. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics.* 7 ed. Boston: Brooks/ Cole Engage Learning; 2006/2011  
first publication: November 1991. 655 p.
22. Lobo RA, Davis SR, De Villiers TJ, Gompel A, Henderson VW, Hodis HN, et al. Prevention of diseases after menopause. *Climacteric.* 2014;17(5):540-56.
23. McCreadie BR, Goldstein SA. Biomechanics of fracture: is bone mineral density sufficient to assess risk? *J Bone Miner Res.* 2000;15(12):2305-8.

24. Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 1996;11(2):150-9.
25. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med.* 1996;2(10):1132-6.
26. Emerton KB, Hu B Fau - Woo AA, Woo Aa Fau - Sinofsky A, Sinofsky A Fau - Hernandez C, Hernandez C Fau - Majeska RJ, Majeska Rj Fau - Jepsen KJ, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. (1873-2763 (Electronic)).
27. Satpathy S, Patra A, Ahirwar B. Experimental techniques for screening of antiosteoporotic activity in postmenopausal osteoporosis. *J Complement Integr Med.* 2015;12(4):251-66.
28. Andersen CY, Kristensen SG. Novel use of the ovarian follicular pool to postpone menopause and delay osteoporosis. *Reprod Biomed Online.* 2015.
29. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod.* 1997;12(5):1032-6.
30. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26(3):391-405.
31. Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163(1-2):125-9.
32. Behre HM, Howles CM, Longobardi S, Investigators PS. Randomized trial comparing luteinizing hormone supplementation timing strategies in older women undergoing ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2015.
33. Pelosi E, Simonsick E, Forabosco A, Garcia-Ortiz JE, Schlessinger D. Dynamics of the ovarian reserve and impact of genetic and epidemiological factors on age of menopause. *Biol Reprod.* 2015;92(5):130.

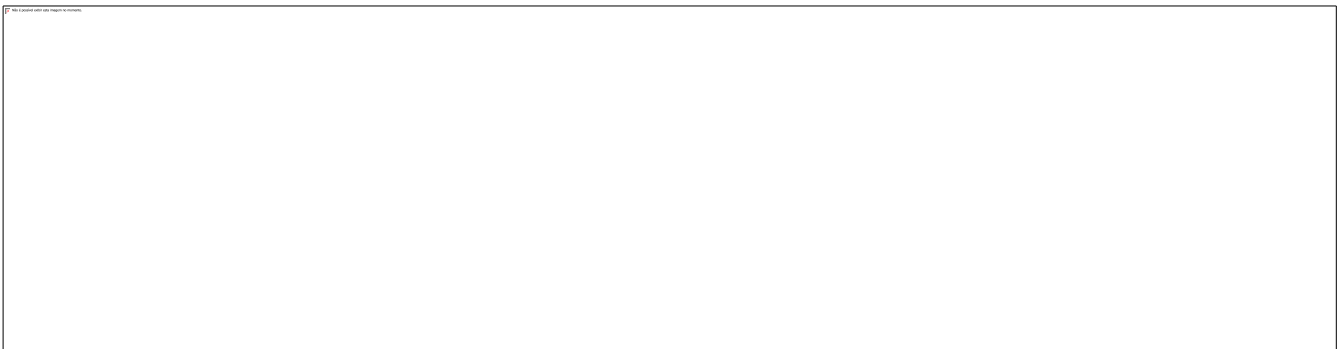
## Imagens

---



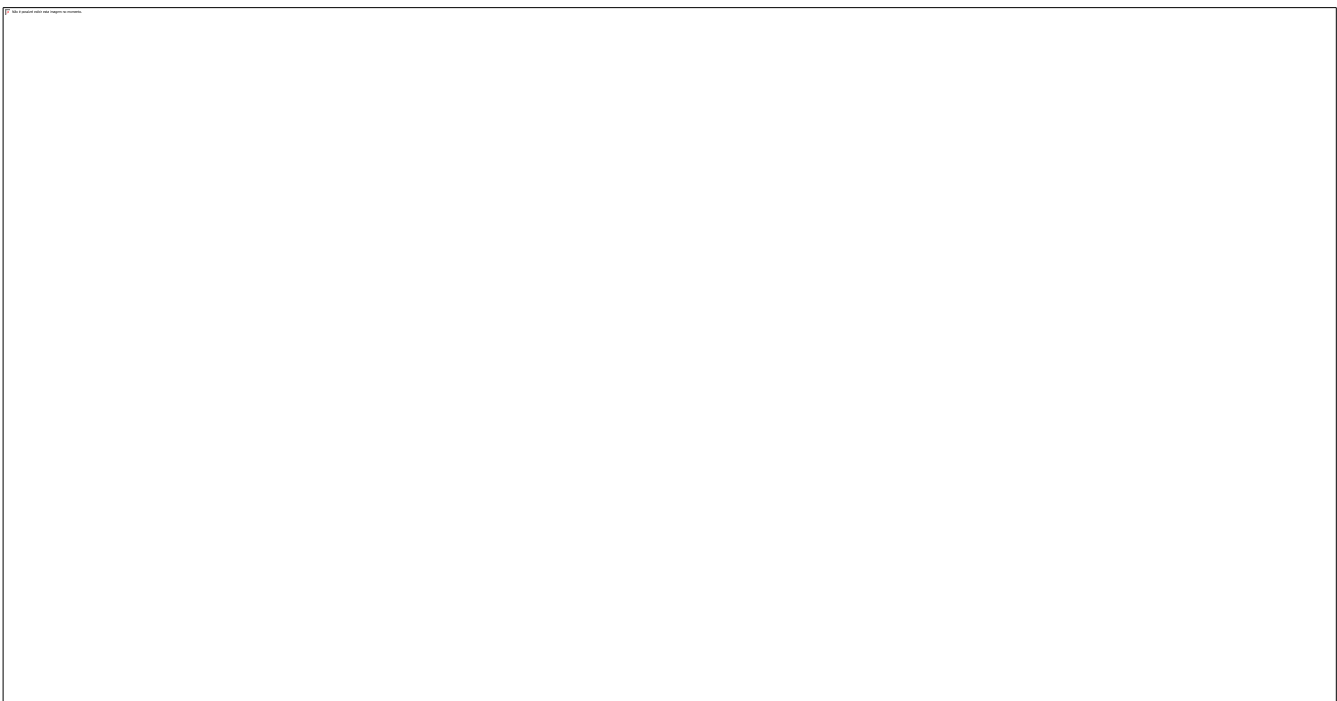
7.2.1.2 *Histología óssea cortical (H & E 100x)- Grupo A*

A) Basal B)Pós- ooforectomia C)Pós-reimplante



7.2.1.3 *Histología óssea cortical (H & E 100x)- Grupo B*

A)Basal B)Pós-ooforectomia C) Pós-reimplante



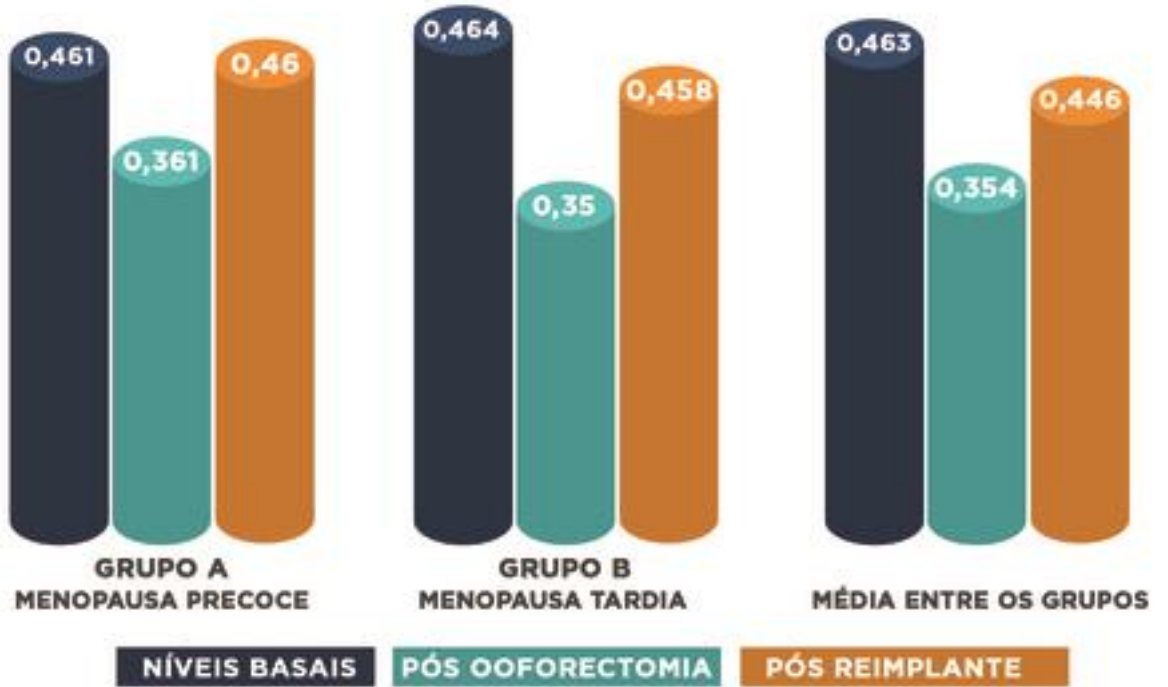
*7.2.1.4 Histología óssea trabecular (H & E 100x)-Grupo A*

A) Basal B) Pós-ooforectomia C) Pós-reimplante



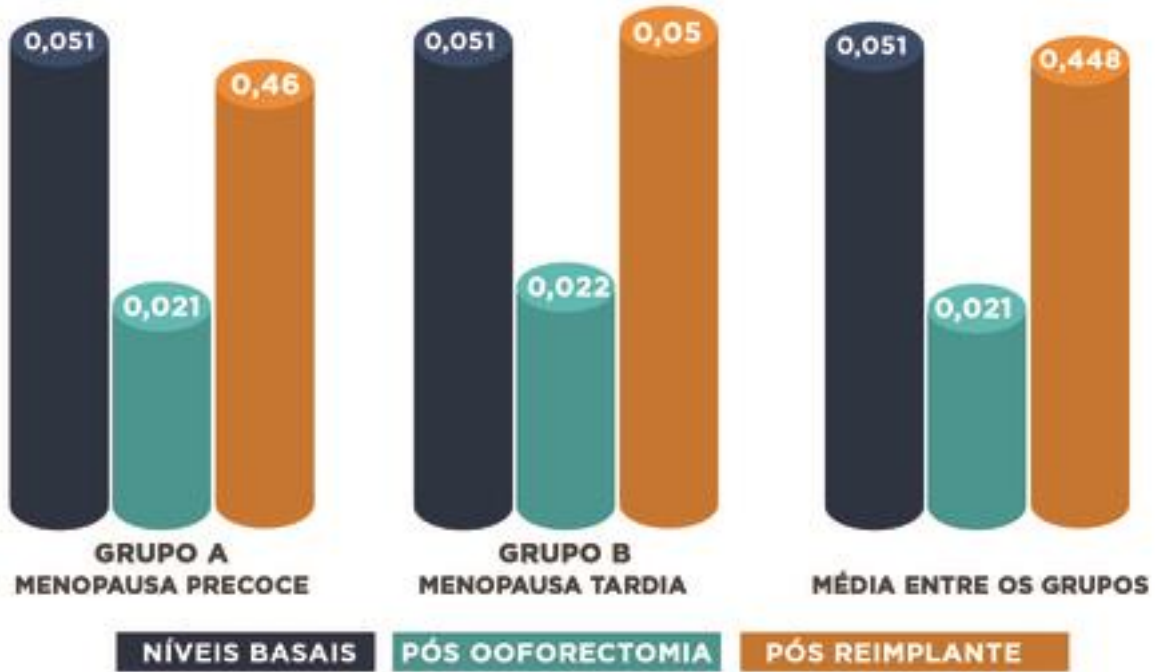
*7.2.1.5 Histología óssea trabecular (H & E 100x)-Grupo B*

A) Basal B) Pós-ooforectomia C) Pós-reimplante



7.2.1.6 Espessura cortical da tíbia (mm) ( $p < 0,005$ ).

Azul :basal; Verde:castração ; Laranja:reimplante



### 7.2.1.7 Espessura trabecular da tíbia (mm)( $p < 0,005$ )

Azul :basal; Verde:castração ; Laranja:reimplante

## 7.3